

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL

UNIDAD IRAPUATO

Departamento de Biotecnología y Bioquímica

“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 que presenta:

IBT América Tzitziki González Rodríguez

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

en la especialidad de Biotecnología de Plantas

Director de Tesis

Dr. John Paul Délano Frier

Irapuato, Guanajuato

Noviembre, 2016

El presente trabajo fue realizado bajo la asesoría del Dr. John Paul Délano Frier en el Laboratorio de Fisiología de la Defensa de Plantas, del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Cinvestav Unidad Irapuato, Guanajuato, México.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría (Beca número 339254).

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 proyecto bajo su asesoría y aceptarme en su grupo de investigación. Por proporcionarme no solamente un espacio en el laboratorio, sino también por compartir su conocimiento y curiosidad por la ciencia. Le agradezco su inmenso apoyo, su confianza y su tiempo.

Al Dr. **Jean-Philippe Vielle Calzada** y al Dr. **Juan José Peña Cabriales**, por sus valiosos consejos durante las reuniones tutoriales y por sus contribuciones a este trabajo.

Agradezco a todos los miembros del Laboratorio de Fisiología de la Defensa de Plantas:

A la auxiliar de investigación **QFB. Norma Martínez**, por su gran apoyo durante mi estancia en el laboratorio. Por facilitarme los materiales necesarios para realizar los experimentos, y por su ayuda en la medición de los azúcares y prolina.

A **Ismael Cisneros**, por brindarme todo el apoyo posible desde que hice rotación en el laboratorio. Por guiarme y enseñarme todas las técnicas necesarias para realizar este proyecto y por aclararme todas las dudas. Pero principalmente por tu amistad incondicional, tu honestidad y confianza.

A **Andrea Castellanos**, cuya alegría y dedicación son un ejemplo a seguir, gracias por tus palabras de aliento y tu amistad.

A **Gabriela Cabrales, Kena Casarrubias, Paula Castrillón, Claudia Portillo, Andrea Palmeros, Julio Massange** y **Josaphat Montero**, por su amistad, sus consejos, su alegría y su compañerismo dentro y fuera del laboratorio.

A **Isma, Gaby, Diego Rodríguez** y **Ale Reyes**, por su linda amistad, por su ayuda en las largas jornadas de trasplantes y colectas del invernadero, y por todos los momentos especiales que compartimos en Irapuato.

A todo el personal del Cinvestav Unidad Irapuato, porque en conjunto logran mantener funcionando todo en orden. A **Dora Anguiano** por su apoyo en todos los trámites académicos y al Sr. Ignacio Mondragón por su ayuda en el invernadero.

A mis roomies, **David** y **Ury Díaz**, porque además de ser mis amigos incondicionales, se han convertido en mi familia. Gracias por su compañía y apoyo durante los últimos meses en Irapuato, por toda la alegría, la cálida convivencia, por compartir sus ideales y por todas las cenas compartidas.

A mis amigos de la vida y a los que conocí durante esta etapa:

**Ale de la Cruz**, gracias por ser mi mejor amiga y que a pesar de la distancia me brindas tu apoyo incondicional. Gracias por tu cariño y por todos estos años de experiencias, reencuentros y consejos que hacen tan bella y única nuestra amistad.

**Ahiko Lara**, gracias por tu hermosa amistad, por hacernos reír, por llevarnos a tantos paseos y contagiarnos de tu energía y buena onda.

**Ale Castañeda**, por estar ahí en las buenas y en las malas, y por todos estos años de amistad y apoyo.

A **Miguel Morales, Felipe Ojeda, Ada Serna, Omar Yáñez, Matilde Pineda, Laura Hernández, Erika Landa, Claudia Ramírez, Diego Silva, Jessica Carreón, Agustín Álvarez**, gracias por todo el conjunto de momentos felices que he pasado a su lado, por los recuerdos que han sembrado en mi y por ser piezas clave en mi vida.

Por último, agradezco a las personas más importantes en mi vida:

A mis padres **América** y **Rolando**, por hacer que mis sueños se hagan realidad, por confiar en mí y apoyarme incondicionalmente. Por su generosidad y por impulsarme a ser mejor persona cada día. Por los valores que me han inculcado, por todo el amor que me han demostrado y porque nunca se han rendido por darme lo mejor, los amo.

A mis tíos, **Pine** y **David**, por preocuparse y cuidar de mí, por el apoyo que me han brindado siempre y por ser como mis padres a lo largo de mi formación.

A mi “mother” **Josefina**, por haber sido la mejor abuelita y la más cariñosa, por todas sus enseñanzas, por ser una mujer excepcional, que a través de su amor puro e incondicional nos impulsó a ser mejores. Porque con su ejemplo, su gran fortaleza, alegría, y con su hermosa sonrisa logró iluminar nuestros días.

A **Gil** por traer alegría a mi vida y por ser la persona excepcional que admiro. Por tus enseñanzas, paciencia, gentileza y disposición para apoyarme en todo. Gracias por tu amor y por creer en mí incluso a veces más que yo misma. Por motivarme a seguir cumpliendo y haciendo más grandes mis sueños. Porque has estado en momentos difíciles y has permanecido a mi lado, y por todos los momentos hermosos que has compartido conmigo.

A mi **familia** en general, a mis tíos y primos, por ser parte muy importante en mí.

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	I
RESUMEN .....	III
ABSTRACT .....	IV
1) INTRODUCCIÓN .....	1
2) ANTECEDENTES.....	2
2.1 ESTRÉS EN PLANTAS .....	2
2.1.1 Estrés Abiótico .....	3
2.1.1.1 Estrés por sequía .....	4
2.1.1.2 Respuestas de defensa a sequía en plantas .....	5
2.2 METABOLISMO DE TREALOSA.....	8
2.2.1 Biosíntesis de trealosa .....	10
2.2.2 Roles del metabolismo de trealosa en plantas .....	12
2.3 METABOLISMO DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DE LA FAMILIA DE LA RAFINOSA.....	14
2.3.1 Biosíntesis de los RFO .....	15
2.3.2 Rol de los RFO en respuesta a estrés abiótico .....	18
2.4 MODELO DE ESTUDIO: AMARANTO.....	20
2.4.1 Aspectos históricos .....	20
2.4.2 Generalidades .....	21
2.4.3 Características nutricionales.....	22
2.4.4 Respuestas del amaranto a condiciones de estrés .....	22
2.4.5 Información genómica y filogenética .....	23
3) JUSTIFICACIÓN.....	24
4) HIPÓTESIS.....	24
5) OBJETIVOS .....	24
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	24
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
6) MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1 MATERIALES .....	25
6.1.1 Material biológico.....	25
6.1.2 Sustrato y condiciones de crecimiento.....	25

6.2	MÉTODOS.....	26
6.2.1	Selección de especies y variedades de amaranto .....	26
6.2.2	Experimento de estrés hídrico .....	26
6.2.3	Extracción de ARN total .....	27
6.2.4	Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	27
6.2.5	Identificación de los transcritos de interés .....	28
6.2.6	Diseño de oligonucleótidos .....	28
6.2.7	Ensayos de PCR en tiempo real (qRT-PCR) .....	28
6.2.8	Ensayos enzimáticos.....	29
6.2.9	Determinación de prolina .....	30
6.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	30
7)	RESULTADOS .....	31
7.1	Selección de especies y variedades de amaranto.....	31
7.2	Experimento de estrés hídrico.....	31
7.3	Análisis de expresión de genes por qRT-PCR.....	32
7.4	Cambios en la expresión de genes del metabolismo de trealosa .....	33
7.5	Cambios en la expresión de genes codificantes de enzimas del metabolismo de RFO .....	53
7.6	Cambios en la expresión de genes asociados al ácido abscísico .....	61
7.7	Cambios en la expresión de genes codificantes para cinasas de la familia SnRK.....	68
7.8	Cambios en el contenido de carbohidratos no estructurales .....	74
7.9	Cambios en el contenido de almidón .....	79
7.10	Cambios en el contenido de prolina .....	81
8)	DISCUSIÓN .....	83
9)	CONCLUSIONES.....	98
10)	PERSPECTIVAS .....	100
11)	BIBLIOGRAFÍA.....	101
12)	APÉNDICES .....	113

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Rutas conocidas de biosíntesis y catabolismo de trealosa en eucariontes y procariontes.

**Figura 2.** Plantas de amaranto sometidas a distintos grados de sequía.

**Figura 3.** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas no catalíticas del metabolismo de trealosa en hojas de distintas especies de amaranto (I).

**Figura 4.** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas no catalíticas del metabolismo de trealosa en hojas de distintas especies de amaranto (II).

**Figura 5.** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas no catalíticas del metabolismo de trealosa en raíces de distintas especies de amaranto (I).

**Figura 6.** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas no catalíticas del metabolismo de trealosa en raíces de distintas especies de amaranto (II).

**Figura 7.** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas catalíticas del metabolismo de trealosa en hojas de distintas especies de amaranto.

**Figura 8.** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas catalíticas del metabolismo de trealosa en raíces de distintas especies de amaranto.

**Figura 9.** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas del metabolismo de RFO en hojas de distintas especies de amaranto.

**Figura 10.** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas del metabolismo de RFO en raíces de distintas especies de amaranto.

**Figura 11.** Expresión relativa de genes relacionados con el ácido abscísico en hojas de distintas especies de amaranto.

**Figura 12.** Expresión relativa de genes relacionados con el ácido abscísico en raíces de distintas especies de amaranto.

**Figura 13.** Expresión relativa de genes codificantes de cinasas de la familia SnRK en hojas de distintas especies de amaranto.

**Figura 14.** Expresión relativa de genes codificantes de cinasas de la familia SnRK en raíces de distintas especies de amaranto.

**Figura 15.** Contenido de glucosa en hojas de diferentes especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.

**Figura 16.** Contenido de fructosa en hojas de diferentes especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.

**Figura 17.** Contenido de sacarosa en hojas de diferentes especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.

**Figura 18.** Contenido de glucosa en raíces de diferentes especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.

**Figura 19.** Contenido de fructosa en raíces de diferentes especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.

**Figura 20.** Contenido de sacarosa en raíces de diferentes especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.

**Figura 21.** Contenido de almidón en hojas de diferentes especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.

**Figura 22.** Contenido de almidón en raíces de diferentes especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.

**Figura 23.** Contenido de prolina en hojas de diferentes especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.

**Figura 24.** Contenido de prolina en raíces de diferentes especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.

## RESUMEN

Las plantas son organismos sésiles incapaces de escapar de las condiciones ambientales cambiantes que son, en ocasiones, adversas. Es por eso que, para sobrevivir, han desarrollado una gran diversidad de mecanismos moleculares, fisiológicos y bioquímicos para adaptarse a la variabilidad ambiental. Uno de los tipos de estrés que las plantas enfrentan con mayor frecuencia es la sequía. Éste representa el principal factor que limita la productividad agrícola y se prevé que el efecto negativo causado por esta condición, será más grave en las próximas décadas. Por lo tanto, es de suma importancia entender los mecanismos que otorgan una mayor tolerancia a este tipo de estrés, con el fin de generar cultivos más tolerantes a la sequía. El amaranto de grano es una planta que no sólo genera semillas con alto valor nutricional, sino que además posee características agronómicas deseables, y ha mostrado ser sumamente tolerante a la deficiencia de agua. Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos responsables de su tolerancia a la sequía. En este trabajo, se realizó un análisis comparativo entre distintas especies de amaranto con tolerancia contrastante al estrés hídrico, con el fin de identificar respuestas comunes y/o divergentes ante este tipo de estrés. Se evaluaron los cambios en la expresión de genes asociados al metabolismo de los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO) y de la trealosa. También, se midió el contenido de carbohidratos no estructurales (CNE) y prolina. De todos los genes evaluados, se observaron patrones de expresión definidos en aquellos asociados a los RFO, y en algunos otros asociados al metabolismo de trealosa. Se encontró que la expresión de los genes codificantes de enzimas clave en la síntesis de RFO fue dependiente de la especie, órgano y grado de estrés aplicado. En condiciones de sequía severa se observó una alta inducción de estos genes, que fue mayor en las especies tolerantes (i.e., *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*) que en las susceptibles (i.e., *A. caudatus* y *A. hybridus*). Se observó también, que la deshidratación en amaranto, ocasionó la modificación diferencial de distintos tipos de CNE, en forma tejida específica, en las distintas especies. Parte de la respuesta incluyó una acumulación significativa de sacarosa, acompañada con una reducción en los niveles de almidón, principalmente en estrés severo. Asimismo, se detectó un aumento gradual de prolina dependiente de la intensidad del estrés y del genotipo. A nivel cualitativo, las respuestas activadas por estrés hídrico, fueron muy similares en amaranto de grano y en *A. hybridus*. Sin embargo, a nivel cuantitativo, las diferencias en estas respuestas, podrían estar asociadas a la tolerancia diferencial a la sequía observada en las distintas especies de amaranto analizadas.

## ABSTRACT

Plants are sessile organisms that are unable to escape from constantly changing environmental conditions. Thus, in order to survive they have developed a great diversity of molecular, physiological and biochemical responses. Drought stress occurs frequently and is the main hindrance affecting agricultural productivity in the world. Its negative effect is expected to be increasingly harmful in the coming decades. Therefore, it has become extremely important to understand how plants withstand drought and the mechanisms that confer greater tolerance to this particular stress condition. Progress in this respect will allow the generation of more drought-tolerant crops. Grain amaranths are plants that not only produce highly nutritional seeds, but also possess very desirable agronomic characteristics and have a drought-adapted nature. However little is known about the mechanisms responsible for their drought-tolerance. In this work, we compared four amaranth species that differed in their tolerance to water stress (WS) in order to identify common and/ or divergent responses to this condition. We evaluated the changes on the expression of genes related to the raffinose family oligosaccharides (RFO's) and to trehalose-related metabolism. We also measured the content of nonstructural carbohydrates (NSC) and proline. From the battery of genes evaluated, we found definite patterns in the expression of the RFO's genes and in some of the trehalose-related genes. We also found that the expression genes coding for key RFO biosynthetic enzymes was dependent of the genotype, tissue examined, and WS level applied. Under severe drought conditions, RFO biosynthesis genes were highly up-regulated, and this expression was higher in tolerant species (i.e., *A. hypochondriacus* and *A. cruentus*) than in susceptible ones (i.e., *A. caudatus* and *A. hybridus*). It was also observed that drought caused the tissue-dependent modification of the content of some NSCs in the different species examined. Part of the response included a significant accumulation of sucrose, accompanied by a reduction in starch levels, mainly in severe stress. Likewise, a gradual increase of proline, which was dependent on the intensity of the stress and on the genotype, was detected. At the qualitative level, the responses activated by WS were very similar in grain amaranth and in *A. hybridus*. However, at the quantitative level, the differences in these responses could be associated with the differential tolerance to drought observed in amaranth species.

## 1) INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la producción de cultivos está limitada por la escasez de agua más que por cualquier otro tipo de estrés ambiental, ya que casi todos los años alguna región de la Tierra es golpeada por la sequía. El cambio climático, que se pronostica que resultará en un aumento de la demanda de agua en los cultivos, en la disminución de la extensión de tierras cultivables y en un avance progresivo de la desertificación, exacerbará este problema. Se predice que el calentamiento global tendrá un efecto negativo general en el crecimiento de las plantas debido a que las altas temperaturas afectarán su desarrollo, resultando en una pérdida drástica de la productividad agrícola, que ocasionará una crisis en la producción de alimentos y por lo tanto episodios de hambruna entre la población (Cattivelli *et al.* 2008, Bitá *et al.* 2013). Los cultivos futuros y la seguridad alimentaria mundial se enfrentarán a retos adicionales por el aumento en la población que se estima alcance los 9.1 mil millones para el año 2050. Teniendo en cuenta este aumento, el rendimiento de los cultivos debe ser mejorado principalmente en las zonas donde es probable que ocurra escasez de agua para el año 2025 (Pennisi 2008). La agricultura global deberá aumentar de un 60-110% para satisfacer la demanda. Asimismo, es urgente aumentar la productividad agrícola con plantas de mayor calidad nutricional para 854 millones de personas (aproximadamente el 14% de la población) que se encuentran desnutridas de manera crónica (FAO 2003). En vista de este escenario, es fundamental entender como las plantas responden ante los factores ambientales adversos, ya que estas ofrecen el único recurso renovable, no sólo como alimentos, sino también como fuente de energía. El estudio de los mecanismos empleados por las plantas para hacer frente a diversos tipos de estrés, así como el desarrollo de las técnicas biotecnológicas, es una estrategia que puede ser utilizada para el mejoramiento de cultivos que tengan mayor adaptabilidad y tolerancia a la limitación de agua. Así también, el conocimiento de la biología de plantas es una poderosa herramienta para una mejor utilización de los recursos naturales, y podría contribuir significativamente a estabilizar la producción alimentaria en países en desarrollo o en regiones áridas o semiáridas (Athar & Ashrab 2009).

## 2) ANTECEDENTES

### 2.1 ESTRÉS EN PLANTAS

A través de su ciclo de vida, las plantas se enfrentan a múltiples tipos de estrés que alteran su fisiología, crecimiento y desarrollo. El estrés es el efecto negativo que un organismo puede sufrir, éste puede ser clasificado como interno y externo. El interno es derivado de mutaciones o divisiones celulares anormales que pueden provocar cambios metabólicos. El estrés externo puede tener un origen biótico o abiótico. El biótico es provocado por agentes biológicos, como hongos, herbívoros, virus o patógenos, mientras que el abiótico es causado por cambios físicos y químicos en el medio (Madlung y Comai 2004). Entre los tipos más comunes de estrés abiótico se encuentran la sequía, salinidad, altas y bajas temperaturas, oxidación, radiación y la presencia de toxinas contaminantes (e.g., metales pesados) en el ambiente (Bhatnagar-Mathur *et al.* 2008). Las plantas, al ser organismos sésiles, no pueden escapar de las condiciones ambientales desfavorables. Por lo tanto, son más propensas a los efectos perjudiciales de éstas y han desarrollado a través de la evolución respuestas únicas y sofisticadas, y como tal, su supervivencia depende de su capacidad para responder con rapidez al estrés ambiental. A pesar de que el estrés no necesariamente amenaza la supervivencia de la planta, éste puede alterar procesos fisiológicos en distintos niveles, que van desde la interrupción de las funciones vitales normales, hasta el colapso del tejido completo. Para contrarrestar estos daños, las plantas están equipadas con un amplio conjunto de mecanismos de defensa; algunos de éstos son constitutivos y otros sólo son activados cuando una señal específica es percibida. La cascada de eventos que ocurren en respuesta a ambas categorías consiste en: (a) la movilización de redes de transducción de señales; (b) la inducción de la expresión de un conjunto de genes; (c) la síntesis de proteínas específicas, y (d) acumulación de solutos compatibles, como ciertos azúcares y aminoácidos. Todo este conjunto de cambios representan el esfuerzo para superar la situación de estrés, mantener la homeostasis y lograr adaptarse (Hazen *et al.* 2003, Shao *et al.* 2007, Agrawal *et al.* 2010).

La supervivencia en ambientes hostiles implica el desarrollo de mecanismos de tolerancia, resistencia o escape. Las plantas que desarrollan tolerancia a un factor dado, superan con el tiempo, los efectos de este factor sin sufrir lesiones y pueden reproducirse bajo condiciones adversas. El desarrollo de resistencia refleja la capacidad de superar al

entorno adverso mediante la activación de ciertos mecanismos de respuesta. A su vez, el escape evita que las plantas se expongan al estrés antes de haber asegurado el éxito reproductivo. Sin embargo, el grado de adaptabilidad es distinto entre una planta a otra y varía de bajo a alto grado. En ocasiones, éstas son incapaces de ajustarse a determinada condición y se vuelven sensibles o no sobreviven (Wang *et al.* 2003). Dependiendo del grado de plasticidad que una planta posee para hacer frente a una nueva condición ambiental y en respuesta a algún tipo de estrés, pueden ocurrir cambios morfológicos, anatómicos y fisiológicos. Estos cambios pueden afectar el crecimiento de la planta, su productividad, su perfil metabólico y su potencial nutricional (Altman 2003).

### **2.1.1 Estrés Abiótico**

Dentro de los tipos de estrés, el abiótico es el principal factor que limita la producción agrícola en el mundo. Particularmente la sequía y salinidad son devastadoras para el medio ambiente ya que limitan la productividad y distribución geográfica de las plantas, causando así una severa reducción en los rendimientos de los cultivos (Redondo-Gómez 2013).

Ya que las plantas están constantemente expuestas a estos tipos de estrés, desencadenan una serie de respuestas para afrontar el daño, que conducen a la activación de vías de señalización y la alteración de los niveles de expresión de genes. Las vías de señalización implican ciertos pasos clave, tales como la percepción y la transducción de la señal, y la capacidad de respuesta combinada con la activación fisiológica y de las reacciones metabólicas (Liu *et al.* 2014). En este proceso, las células vegetales primero perciben un estímulo de estrés a través de receptores localizados principalmente en la membrana celular. A continuación, las moléculas de señalización del receptor se activan a través de los segundos mensajeros intracelulares tales como iones de calcio, especies reactivas de oxígeno (ROS), nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc), azúcares y óxido nítrico. Posteriormente, estos segundos mensajeros inician las rutas de señalización correspondientes para la transducción de las señales (Bhargava y Sawant 2013). La fosforilación y desfosforilación de proteínas reguladas por proteínas cinasas y fosfatasas, respectivamente, es un mecanismo importante en varias vías de transducción de señales. Por ejemplo, las MAPK cinasas y las cinasas dependientes de calcio (CDPK) son bien conocidas por su papel en la sequía (Bartels y Sunkar 2005). Al final de la cascada de fosforilación, factores de transcripción (FT) se activan o se suprimen y regulan directamente

la expresión de un conjunto de genes río abajo mediante la interacción con los elementos cis-específicos en su región promotora (Danquah *et al.* 2014). Además, los FT mismos están regulados a nivel de transcripción por otros componentes (Hirayama y Shinozaki 2010) y después de varias modificaciones a nivel post-transcripcional, forman una red de regulación compleja que modula la expresión de genes de respuesta a estrés, y la regulación de diversos procesos fisiológicos y metabólicos (Mizoi *et al.* 2013).

Las respuestas de las plantas a nivel genómico pueden ser de tres tipos: (1) cambio en la expresión de genes que codifican proteínas que juegan un papel importante en las cascadas de señalización y del control de la transcripción (Zhu 2001); (2) cambio en la expresión de genes cuyos productos pueden conferir protección inmediata a membranas y proteínas (Bray 1997), y (3) cambio en la expresión de genes que están implicados en la absorción de agua y transporte de iones (Blumwald 2000). Uno de los mecanismos utilizados por las plantas para minimizar los efectos deletéreos causados por estrés abiótico es la síntesis de solutos compatibles. Aminoácidos, aminos cuaternarios, poliaminas y algunos azúcares como sacarosa y rafinosa, son algunos de los solutos compatibles más importantes acumulados bajo estrés (dos Santos *et al.* 2011).

#### **2.1.1.1 Estrés por sequía**

Más del 40% de la tierra está bajo condiciones climáticas áridas o semiáridas. En estos ambientes, el agua es el principal factor limitante para la producción de alimentos. El efecto de la sequía en plantas es complejo y se produce ya sea por la escasa cantidad de agua, causada por la falta de suficiente lluvia, o debido a la calidad insuficiente de la misma, es decir, cuando ésta se es parte de hábitats salinos (Cattivelli *et al.* 2008). Este es un proceso complejo que necesita ser entendido por muchas disciplinas con el fin de superar y minimizar el daño que causa. Las respuestas de las plantas a sequía también son muy complejas pues varían dependiendo de la frecuencia, el grado del estrés y los patrones de sequía, tanto atmosféricos como del suelo. Este es un tipo estrés que puede estar asociado a otros tipos de estrés como las altas temperaturas. Los modelos existentes sobre el cambio climático predicen que la sequía aumentará en severidad y frecuencia, lo que traerá consecuencias negativas en el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Walter *et al.* 2011).

### 2.1.1.2 Respuestas de defensa a sequía en plantas

El estrés por sequía, es una condición de restricción de humedad que es el resultado de una cantidad insuficiente de agua disponible para el mantenimiento de los procesos fisiológicos normales, tales como la fotosíntesis y la homeostasis global de la célula.

Las principales consecuencias de la falta de agua en las plantas son la deshidratación en las células y los tejidos. Esta carencia de agua causa una reducción en la tasa de división celular y lesión de las células a través de especies reactivas de oxígeno (ROS). También ocasiona un aumento en la temperatura interna, lo que resulta en una mayor viscosidad del contenido celular, alteraciones en la interacción proteína-proteína, la agregación de proteínas y su desnaturalización (Farooq *et al.* 2008).

Además, bajo deshidratación prolongada se observa una inhibición general del crecimiento, que puede surgir debido a la pérdida de turgencia celular derivada de la falta de disponibilidad de agua para las células en crecimiento. Asimismo, las plantas exhiben disminución en el tejido foliar, enrollamiento de las hojas y descoloramiento, así como una menor elongación del tallo y proliferación de la raíz. Muestran, también, una disminución en el uso eficiente del agua (UEA) y, por ende, se genera una reducción de la productividad entera de la planta (Li *et al.* 2009). La inhibición del crecimiento de raíz es una respuesta de adaptación que reduce la demanda energética y moviliza metabolitos para la síntesis de compuestos protectores requeridos para el ajuste osmótico. A su vez, la inhibición de las raíces laterales conduce a la promoción del crecimiento de la raíz primaria y permite la extracción de agua de las capas inferiores de suelo (Xiong *et al.* 2006).

En la naturaleza, algunas especies no están adaptadas a los ambientes secos. Debido a esto, en muchos casos el genotipo determinará la habilidad de la planta para sobrevivir y prosperar en entornos con baja disponibilidad de agua. La respuesta de cualquier cultivo al déficit de agua también dependerá de la etapa de desarrollo en el que se encuentre, del UEA y de la severidad del estrés al que esté sometido (Pareek *et al.* 2010). Por ejemplo, en la etapa reproductiva, las plantas son consideradas críticamente susceptibles (Moumeni *et al.* 2015). Igualmente, el estrés severo puede resultar en la alteración del metabolismo, el arresto de la fotosíntesis y, finalmente, la muerte de la planta.

Por lo que, para defenderse, las plantas responden mediante diversas estrategias, alterando la expresión de diversos genes, modificando la actividad hormonal, sintetizando nuevas proteínas, acumulando metabolitos protectores y azúcares, sintetizando

antioxidantes, entre otras (Joshi *et al.* 2016). También han desarrollado adaptaciones protectoras que les permiten afrontar la sequía con mayor éxito, por medio de evasión, de tolerancia, o escape. La evasión de la sequía se refiere a la habilidad de las plantas de mantener un estatus hídrico óptimo cuando el agua es escasa. Por ejemplo, las plantas desarrollan largas raíces para alcanzar la humedad del suelo profundo, o reducen la pérdida de agua cerrando los estomas en la superficie de la hoja (Comas *et al.* 2013). La tolerancia a sequía se refiere a la habilidad de las plantas de soportar la pérdida de agua y reestablecer el crecimiento cuando las condiciones de humedad vuelvan a ser óptimas, manteniendo, mientras tanto, la actividad fotosintética normal y la toma eficiente de agua. Esto lo logran mediante el ajuste osmótico y cambios en su metabolismo. Finalmente, el escape se presenta cuando las plantas sufren un acortamiento del ciclo vegetativo o de vida antes de la manifestación del estrés (Blum 2005, Clauw *et al.* 2015, Bhargava y Sawant 2013).

La acumulación de compuestos osmoprotectores y cambios en las fitohormonas, son algunas de las respuestas más comunes de todas las plantas ante el estrés hídrico (Hare *et al.* 1997). El ácido abscísico (ABA) es rápidamente producido durante la sequía, desencadenando una cascada de respuestas fisiológicas reguladas por una red de transducción de señales. Durante episodios de sequía, el ABA acumulado en la vasculatura de la planta es transportado a las células guardianas en respuesta a cambios de pH y por transportadores específicos, lo que ocasiona el cierre de los estomas, resultando en un ajuste que le permite a las plantas tolerar mejor la sequía. Así mismo, en respuesta al déficit hídrico, ABA estimula una ruta de señalización que activa la producción de ROS, que a su vez induce un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Osakabe *et al.* 2014). Sin embargo, si los estomas permanecen cerrados por largo tiempo habrá una disminución en la concentración de  $\text{CO}_2$  e inhibición de la fotosíntesis, y también se reducirá el oxígeno molecular, causando un daño irreversible a la maquinaria fotosintética (Bhargava *et al.* 2013). La tolerancia a sequía mediada por ABA se ha comprobado en diversos estudios. Por ejemplo, en variedades tolerantes de cebada, se observó un aumento de ABA de 5 veces más comparados con variedades susceptibles a sequía, indicando su papel en la tolerancia al estrés (Thameur *et al.* 2011). También se ha reportado el rol de ABA en la regulación de la actividad de acuaporinas, que contribuyen al mantenimiento del estatus hídrico en las plantas (Parent *et al.* 2009).

Asimismo, se ha visto que las auxinas, y en particular el ácido indol acético (AIA), también están involucradas en la respuesta a estrés hídrico. En hojas de trigo, la tolerancia a la sequía fue acompañada por una disminución en el contenido de AIA (Xie *et al.* 2003). En plantas de arroz se observó una regulación negativa de IAA, que facilitó la acumulación de proteínas de embriogénesis tardía (LEA, por sus siglas en inglés), permitiendo una mejor adaptación a la sequía (Zhang *et al.* 2009).

Igualmente, se encontró que los niveles endógenos de zeatinas y giberelinas disminuyeron en hojas de maíz sometidas a estrés hídrico, lo cual se correlacionó con altos niveles de daño celular e inhibición en el crecimiento de las plantas (Wang *et al.* 2008).

Otro mecanismo de defensa de las plantas a sequía, se basa en la síntesis de solutos compatibles, como polioles, glicina betaina y prolina, que al acumularse bajo estrés hídrico impiden la pérdida de agua de las células. El aminoácido prolina, está involucrado en el ajuste osmótico celular y en la protección de los componentes celulares durante la deshidratación (Zhang *et al.* 2015). El ajuste osmótico ayuda a mantener la turgencia de las células, lo que permite el alargamiento celular y el crecimiento de la planta durante el estrés hídrico. También, permite que los estomas se mantengan al menos parcialmente abiertos y que la asimilación del CO<sub>2</sub> continúe en situaciones en las cuales los potenciales de agua existentes serían, de otro modo, inhibitorios (Joshi *et al.* 2016). La prolina también funciona como eliminador de radicales libres y suprime el daño mediado por éstos durante el déficit de agua. Varios estudios han indicado que el contenido de prolina se incrementa durante la sequía, y que la acumulación está asociada a una mayor tolerancia a este tipo de estrés en diversas plantas (Zhang *et al.* 2015).

En numerosos estudios se han identificado la expresión de diversos genes responsivos a sequía y que son inducidos específicamente bajo estrés. Estos genes incluyen aquellos asociados a la síntesis de osmoprotectores y biosíntesis de ABA, acuaporinas, proteínas LEA y chaperonas, genes relacionados con la homeostasis de iones (e.g., SLAC1 y GORK), y genes de señalización, entre otros. Se ha reportado que el gen *NCED3*, en *Arabidopsis*, codifica a una enzima que cataliza un paso clave en la biosíntesis de ABA y su expresión es rápidamente inducida por estrés hídrico en tejido vascular (Osakabe *et al.* 2014). Además, los genes codificantes de factores de transcripción (FT) son particularmente

interesantes ya que actúan como sensores maestros y desencadenan la expresión simultánea de un gran número de genes responsivos a estrés (Okasabe *et al.* 2014). Mediante un análisis transcriptómico con plantas de *Arabidopsis* sometidas a sequía, se identificaron alrededor de 104 FT, cuya expresión se modificó tras la exposición al estrés (Rhizky *et al.* 2004). Ya que la sequía está acompañada por el incremento en los niveles de ABA, muchos de estos FT son específicamente activados por esta hormona. Algunos de los FT clave que regulan la respuesta al déficit hídrico pertenecen a diversas familias, como MYB, MYC, DREB, ERF, etc. (Osakabe *et al.* 2014). Los FT responsivos a ABA (ABF) pertenecen principalmente a la familia bZIP, y se unen a elementos llamados ABRE, presentes en los promotores de los genes inducibles por estrés (Yoshida *et al.* 2010). Por otro lado, la acción de SnRK2 representa uno de los mecanismos que regulan la respuesta rápida de adaptación a la sequía, pues activa a ABF mediante fosforilación, para directamente regular un complejo receptor de ABA (PYR/RCAR), considerado como sensor de estrés hídrico (Umezawa *et al.* 2010).

Se ha observado que proteínas receptoras y sensores localizados en las membranas también juegan un papel importante en diversas vías de señalización. Se ha planteado que la señalización de la membrana plasmática está involucrada en la percepción inicial del estatus hídrico del exterior de la célula. Un ejemplo que apoya esta posibilidad es AHK1, una histidina cinasa localizada en la membrana plasmática, que ha mostrado funcionar como un osmosensor. Además, la sobreexpresión de *AHK1* en *Arabidopsis* mejoró su tolerancia al estrés hídrico (Tran *et al.* 2007).

## 2.2 METABOLISMO DE TREALOSA

Las plantas censan y responden a cambios en los niveles de carbono y nitrógeno durante el desarrollo y crecimiento de acuerdo a sus necesidades internas y su metabolismo. El registro de los niveles de azúcares permite a las plantas alterar la fotosíntesis y apagarla cuando los carbohidratos son abundantes. Estos procesos involucran la regulación génica y la actividad de proteínas que permiten a las plantas el uso eficiente de la energía almacenada (Baena-González 2010). La trealosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-glucopiranosido), es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa. Es altamente soluble y dada su naturaleza no reactiva, es compatible con el metabolismo

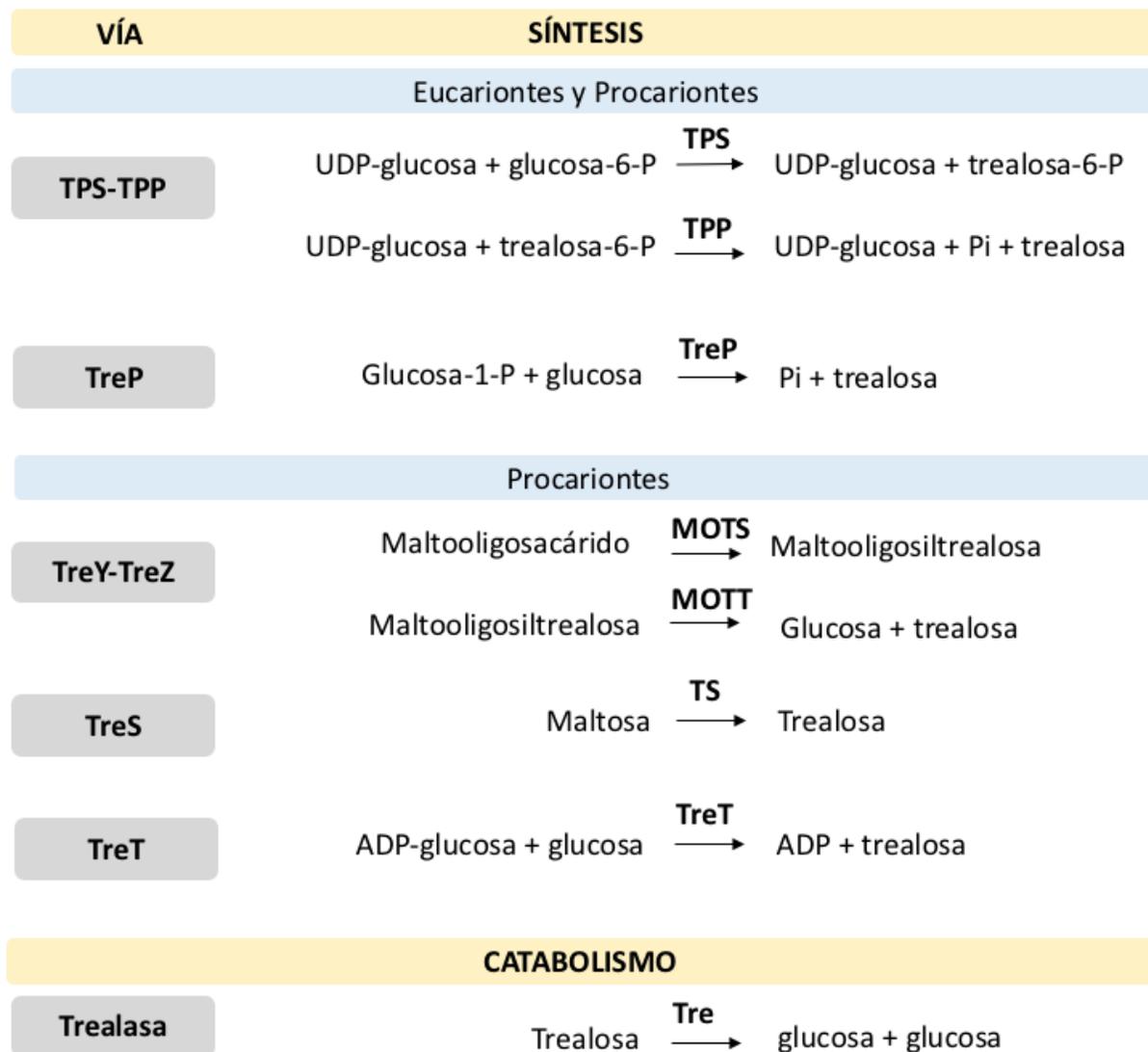
celular, incluso a altas concentraciones. Los disacáridos no reductores juegan un rol único en la biósfera, ya que proveen una fuente de energía soluble en forma de moléculas estables que pueden funcionar como compuestos protectores. La trealosa tiene múltiples funciones y algunas de ellas son especie-específicas (Elbein 1974).

En microorganismos parece actuar como una fuente de energía durante ciertas etapas de desarrollo, tales como la germinación de esporas (Elbein 2003). En organismos anhidrobióticos, se acumula en altas concentraciones y les permite sobrevivir en condiciones de deshidratación completa mediante la preservación de membranas durante periodos de sequía (Drennan *et al.* 1993). A la bacteria *Escherichia coli*, la protege contra estrés por frío, posiblemente mediante la estabilización de las membranas celulares y la prevención de la desnaturalización de proteínas, mientras que en levaduras desempeña un papel en la tolerancia a estrés osmótico, calor y desecación (Hounsa *et al.* 1998, Hottiger *et al.* 1987, Benaroudj 2001). Asimismo, nemátodos que sufren de deshidratación lenta, se convierten hasta un 20% de su peso seco en trealosa, lo que les ayuda a sobrevivir la pérdida de agua (Crowe *et al.* 1992). Además, la trealosa participa en la tolerancia a desecación en plantas de resurrección como *Selaginella lepidophylla*, *Myrothammus flabellifolius* y *Sporobolus atrovirens* fungiendo como molécula osmoprotectora (Iturriaga *et al.* 2000).

Sin embargo, en la mayoría de las plantas superiores este azúcar es sintetizado en cantidades en el rango micromolar, por lo que se ha puesto en duda el rol de la trealosa durante estrés. Al contrario, la función protectora en las plantas parece ser asumida por la sacarosa, ya que actúa como portador de carbono y energía en transporte de larga distancia. Asimismo, durante estrés por frío y sequía, las plantas acumulan sacarosa en lugar de trealosa (Salerno y Curatti 2003). De igual forma, la tolerancia a sequía en semillas y polen, está correlacionada con el contenido de sacarosa (Delorge *et al.* 2014). Debido a esto, se ha descartado su participación en el alivio de estrés abiótico, así como su papel como molécula osmoprotectora. Sin embargo, recientemente se ha determinado que la trealosa puede estar jugando un papel importante como una molécula de señalización en plantas y que es esencial para el desarrollo y crecimiento normal de estas (Fernández *et al.* 2010, Schluepmann *et al.* 2004, Bae *et al.* 2005).

### 2.2.1 Biosíntesis de trealosa

Actualmente, se conocen cinco vías de biosíntesis de trealosa (Figura 1). Algunos organismos poseen sólo una, mientras que otros utilizan múltiples vías, que son empleadas en función del tipo de estrés que afecta al organismo (Paul *et. al* 2008).



**Figura 1. Rutas conocidas de biosíntesis y catabolismo de trealosa en eucariontes y procariontes.** Se muestra la participación de TPS (trealosa fosfato sintasa), TPP (trealosa fosfato fosfatasa), MOTS (malto-oligosil trealosa sintasa), MOTT (malto-oligosil trealosa tetrahidrolasa), TS (trealosa sintasa), TreP (trealosa fosforilasa), TreT (trealosa glicosiltransferasa sintasa), Tre (trealasa) en diferentes rutas anabólicas o catabólicas.

La biosíntesis de trealosa en plantas sólo ocurre por la vía TPS-TPP (también conocida como *OtsA-OtsB*). Se lleva a cabo mediante tres reacciones enzimáticas: la primera, catalizada por la enzima trealosa-6-fosfato sintasa (TPS), involucra la unión de glucosa-6-fosfato a UDP-glucosa para producir trealosa-6-fosfato (T6P). En la segunda, interviene la enzima trealosa-6-fosfato fosfatasa (TPP), que desfosforila la T6P para formar trealosa y fosfato inorgánico. Y por último la trealosa es descompuesta en dos moléculas de glucosa por la trealasa (TRE) (Lunn 2014).

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han encontrado 11 genes codificantes para TPS (*AtTPS1-11*), 10 para TPP (*AtTPPA-J*) y sólo un gen codificante para TRE (*AtTRE*). Además, el análisis de otros genomas vegetales reveló la presencia de familias multigénicas que son capaces de sintetizar trealosa y que parecen estar presentes en todas las plantas (Leyman *et al.* 2001, Eastmond y Graham 2003).

Los genes TPS se dividen en dos clases de acuerdo a su homología con *S. cerevisiae*: los de clase I son similares al gen TPS1 (*ScTPS1*), y los de la Clase II al gen TPS2 (*ScTPS2*) que en levadura codifica para una TPP. Ambas clases contienen un dominio glicosiltransferasa similar a enzimas TPS de levadura. En *A. thaliana*, la clase I consiste de cuatro enzimas TPS (*AtTPS1-4*). De éstas 4, sólo *AtTPS1* codifica para una sintasa activa. Esta contiene una extensión N-terminal específica de plantas, que está ausente en enzimas de microorganismos (Vandesteene *et al.* 2010). Las proteínas de clase II (*AtTPS5-11*) no muestran actividad catalítica bajo expresión heteróloga en *S. cerevisiae*, pues son incapaces de complementar las mutantes *tps1* y *tps2* (Ramon *et al.* 2009). El dominio TPS de estos genes carece de los sitios de unión necesarios para la UDP-glucosa y Glucosa-6-fosfato lo que puede explicar su incapacidad de sintetizar T6P. No obstante, la parte C-terminal, contiene cajas de fosfatasas conservadas, típicas de enzimas activas del tipo TPP, pero singularmente, éstas no actúan como fosfatasas (Ramon *et al.* 2008). La falta de actividad enzimática cuantificable y de patrones de expresión localizados en tejidos específicos, sugiere que éstas están desempeñando funciones regulatorias, posiblemente como sensores de los niveles de T6P (Vandesteene *et al.* 2010). Por otro lado, los genes TPP de plantas no muestran homología con los genes biosintéticos de bacterias, ya que únicamente comparten los dominios catalíticos propios de las TPP. Todas las proteínas TPP

son activas bajo expresión heteróloga, tanto en levadura como en *E. coli* (Vandesteene *et al.* 2012), mientras que su gran abundancia señala que éstas son necesarias para una regulación estricta de los niveles de trealosa y T6P (Delorge *et al.* 2014).

### 2.2.2 Roles del metabolismo de trealosa en plantas

Debido a sus excelentes características y su capacidad de actuar como molécula osmoprotectora en microorganismos y plantas de resurrección, se han efectuado numerosos intentos por construir plantas que produzcan más trealosa. Ésto, con el fin de mejorar su tolerancia al estrés y su rendimiento bajo condiciones adversas (Lunn *et al.* 2014). La expresión heteróloga de genes de trealosa de origen fúngico o bacteriano en tabaco, papa, arroz y *Arabidopsis*, mostró una tolerancia incrementada al estrés. Sin embargo, en todos los casos estas plantas mostraron anomalías fenotípicas, y en algunos casos, menor biomasa. La expresión heteróloga de genes TPS resultó en fenotipos opuestos a los producidos en plantas sobreexpresantes de TPP, indicando que el nivel de la molécula intermediaria T6P, podría ser la responsable de los fenotipos aberrantes (Schluepmann *et al.* 2003). Esta hipótesis se comprobó, ya que la sobreexpresión combinada de TPS y TPP, ya sea de manera separada, o como un gen híbrido, no resultó en anomalías fenotípicas (Garg *et al.* 2002, Karim *et al.* 2007). El efecto positivo en la tolerancia al estrés observado en plantas con expresión TPS y/o TPP, también se comprobó mediante análisis *in silico*, donde se vio una respuesta muy clara de genes de trealosa ante sequía, salinidad y estrés por frío (Iordachescu e Imai 2008). Así mismo, estudios similares mostraron que la expresión de *TPS1* es inducida por sequía en hojas y raíces de algodón, y en arroz *OsTPS1* y *OsTPS2*, son transitoriamente reguladas por frío, sequía y ABA, tanto en raíces como en tallos (Kosmas *et al.* 2006, Pramanik e Imai 2008,).

El metabolismo de trealosa no sólo está asociado a la tolerancia al estrés abiótico, también está implicado en el desarrollo y crecimiento. Se ha visto que *AtTPS1*, es constitutivamente expresado en distintos órganos, como partes aéreas, semillas e hipocotilos, y presenta una alta expresión en órganos consumidores, como hojas jóvenes, semillas y embriones en maduración. Estos patrones de expresión extendidos parecen ser esenciales a través del ciclo de vida, pues de manera interesante, mutantes “knockout” de *TPS1* causan la

letalidad del embrión, y bajo recuperación con inducción transitoria de este gen, las plantas exhiben crecimiento anormal, hojas pequeñas, desarrollo retardado y son incapaces de generar floración. Además, estos fenotipos rescatados muestran acumulación de azúcares solubles y almidón, así como inducción de genes involucrados en la señalización por ABA. Estos resultados sugieren que la T6P podría actuar a través de un mecanismo que involucra ABA y el metabolismo de azúcares para coordinar la maduración del embrión y el crecimiento (van Dijken *et al.* 2004, Eastmond *et al.* 2002, Gómez *et al.* 2006). T6P también actúa como un regulador global del metabolismo y de la transcripción, promoviendo el crecimiento vegetal y desencadenando transiciones en fases de desarrollo tales como la germinación y la floración, en respuesta a la disponibilidad de azúcares (Tsai y Gazzarrini 2014).

Además de su papel en el desarrollo de las plantas, el metabolismo de trealosa, específicamente la T6P, participa en la regulación del metabolismo de carbohidratos. Se ha demostrado que existe una alta correlación entre el nivel de T6P y sacarosa, que es altamente regulada. Esta regulación parece ser crítica para las plantas para mantener sus niveles de azúcares en ciertos tipos celulares y/o durante ciertas etapas de desarrollo (Lunn *et al.* 2014). En este sentido, se encontró que líneas transgénicas de *Arabidopsis* capaces de expresar los genes TPS (*ostA*) y TPP (*otsB*) de *E. coli*, mostraron diferencias en la acumulación de T6P y respondieron diferencialmente a sacarosa exógena. En general, se observó un rápido incremento de T6P al suplementar a las plantas con sacarosa (Shluepmann *et al.* 2004). Otro experimento con plántulas de *Arabidopsis* que fueron privadas de fuentes de carbono, y que posteriormente fueron suplementadas con sacarosa, confirmó que la T6P actúa como un sensor para la sacarosa disponible, ya que después de un lapso de tres horas de haber agregado el azúcar, se observó un elevado aumento en el contenido de T6P (Lunn *et al.* 2006). Del mismo modo, este hecho se comprobó con la suministración de diversos tipos de azúcares, así como análogos de azúcares, y otros compuestos como nitrógeno, azufre y potasio a plántulas de *Arabidopsis*, observándose que bajo ninguna condición hubo un aumento de T6P, excepto cuando estas plantas fueron suministradas con sacarosa (Yadav *et al.* 2014). Por otro lado, la T6P ha mostrado regular el metabolismo de almidón en plantas. En *Arabidopsis*, la aplicación de trealosa exógena induce la acumulación de almidón aumentando la actividad de ADP-

glucosa pirofosforilasa (AGPasa), la enzima clave que controla la síntesis de almidón (Wingler *et al.* 2000).

Aparte de su rol en la regulación de carbohidratos, la T6P ha mostrado inhibir la actividad catalítica de SnRK1 (de *Sucrose non-fermenting 1-related protein kinase1*). Esta cinasa actúa como un sensor de energía en todos los eucariontes, y es activado bajo condiciones de reducción de energía o estrés metabólico para inhibir el crecimiento y conservar la energía para la supervivencia de la célula (Baena-González *et al.* 2007). De manera interesante, la actividad de SnRK1 parece ser específica para T6P, ya que ningún otro azúcar ha logrado inhibirla (Zhang *et al.* 2009). Esto sugiere un mecanismo de regulación en el que la T6P inducida por sacarosa, inhibe SnRK1 cuando este azúcar es abundante. Cuando el contenido de sacarosa disminuye, así como la T6P, SnRK1 es activada y conduce a la inducción de genes involucrados en procesos fotosintéticos, de modo que más carbono está disponible para reponer el déficit de carbono en las células en crecimiento (Delatte *et al.* 2011).

### **2.3 METABOLISMO DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DE LA FAMILIA DE LA RAFINOSA**

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO, por sus siglas en inglés) son extensiones  $\alpha$ -1,6-galactosil de la sacarosa y son el grupo de oligosacáridos más ampliamente distribuidos en plantas superiores. A pesar de que son generalmente caracterizados como solutos compatibles, tienen un amplio rango de usos, ya que participan en funciones celulares cruciales incluyendo transporte y almacenamiento de carbono, transducción de señales, transporte de membrana y exportación de mRNA (Stevenson *et al.* 2000, Thole & Nielsen 2008, Sengupta *et al.* 2015). Pueden ser sintetizados y almacenados en semillas, protegiéndolas así de la desecación, y se acumulan en tejidos vegetativos en respuesta a un amplio rango de estrés abiótico (Downie *et al.* 2003). Además, actúan como moléculas señalizadoras en respuesta a ataques por patógenos y se ha sugerido que tienen un papel central como moléculas reguladoras de la respuesta a estrés en plantas, ya que han mostrado ser antioxidantes y estabilizadores de membrana (Hincha *et al.* 2003, Zuther *et al.* 2004).

### 2.3.1 Biosíntesis de los RFO

Los principales metabolitos de la vía de los RFOs son los galactociclitoles galactinol (Gol) y *mio*-inositol. La síntesis de Gol es un paso indispensable para entrar a la vía de biosíntesis de los RFO, ya que este es el donador de residuos galactosilo. La enzima clave de este proceso es la galactinol sintasa (GOLS; EC 2.4.1.123), ya que controla en el flujo de RFO, al sintetizar Gol en plantas, usando UDP-galactosa y L-*mio*-inositol. GOLS sirve como un enlace entre el metabolismo central del inositol (Ino) y la síntesis de RFO, y también controla la entrada de Ino en el proceso.

Dentro de esta vía, las otras dos enzimas principales son: la rafinosa sintasa (RAFS; EC 2.4.1.82) que transfiere un residuo galactosilo de Gol a sacarosa para sintetizar rafinosa (Raf), y la estaquiosa sintasa (STCS; EC 2.4.1.67) que produce el tetrasacárido estaquiosa (Sta) (Tanner & Kandler 1968; Keller & Pharr 1996). Adicional a esta ruta bien establecida, existen otros RFO de mayor grado de polimerización que están presentes en algunas plantas, y pueden producirse por la acción de enzimas Gol-independientes llamadas galactan: galactan galactosiltransferasas (o GGT, Bachman *et al.* 1994).

De manera resumida, los RFOs son sintetizados de la siguiente forma:

1. UDP-galactosa + *mio*-inositol → galactinol + UDP (galactinol sintasa, [Gols])
2. galactinol + sacarosa → rafinosa + *mio*-inositol (rafinosa sintasa, [RafS])
3. galactinol + rafinosa → estaquiosa + *mio*-inositol (estaquiosa sintasa, [StcS])
4. galactinol + estaquiosa → verbascosa + *mio*-inositol (estaquiosa sintasa, [StcS])

El catabolismo de los oligosacáridos de la familia de la rafinosa ha sido poco estudiado, pero es igualmente importante comparado a su síntesis. Estos son digeridos secuencialmente por  $\alpha$ -galactosidasas ácidas y alcalinas, hasta remover los residuos terminales de galactosa (Sengupta *et al.* 2015). La sacarosa puede ser digerida a fructosa y glucosa por la enzima invertasa, o a fructosa y UDP-glucosa por la sacarosa sintasa. Fructosa, glucosa y UDP-glucosa pueden ser fácilmente utilizadas en otras rutas metabólicas. Algunas proteínas de inhibición de semillas son homólogas de las  $\alpha$ -

galactosidasas y junto con las invertasas pueden estar involucradas en la degradación de los RFO (Van den Ende 2013).

Una característica notable de la síntesis de RFO es que esta vía se limita a plantas superiores. En un estudio filogenético donde se utilizaron secuencias proteicas de los RFO, se encontró que las monocotiledóneas se agrupan en un pequeño clado de la base del árbol en donde las dicotiledóneas divergen y forman clusters bien definidos de muchas familias distintas. La configuración filogenética de GOLS y RAFS está correlacionada y muestra patrones similares de diversificación evolutiva. Por otro lado, la STCS es desordenada y no se correlaciona con las otras dos enzimas. La similitud entre GOLS y RAFS indica un patrón evolutivo similar, mientras que STCS o RFO superiores pueden no haber coevolucionado con ellos (Sengupta *et al.* 2012).

En la mayoría de las especies reportadas, se han encontrado múltiples isoformas de RFO con expresión diferencial, localizada en tejidos específicos o en respuesta a estrés. En contraste con la Raf, que es universalmente encontrada en todas las plantas, la Sta y otros oligosacáridos de mayor grado de polimerización como la verbascosa y ajugosa, se acumulan en la vacuola de sólo algunas especies de plantas (Peters & Keller 2009).

En *Arabidopsis* se han identificado siete miembros de GOLS (*AtGOLS1-7*), de los cuales, las isoformas *AtGOLS1*, 2 y 3 fueron detectadas en semillas maduras y fueron inducidas bajo estrés en las plantas (Taji *et al.* 2002). El análisis filogenético y las secuencias de aminoácidos mostraron que *AtGOLS1*, 2 y 3 comparten homología con genes provenientes de especies cultivadas tales como *Zea mays* (*ZmGOLS1*, 2 y 3), *Oryza sativa* (*OsGOLS3*) y *Triticum aestivum* (*TaGoIS*) (Zhao *et al.* 2004). En *Ajuğa reptans*, existen dos genes GOLS, ambos inducibles por frío, y cuya transcripción ocurre en localizaciones específicas: *GOLS1*, en células del mesofilo, y *GOLS2*, en células acompañantes del floema. Además, en esta planta existen dos tipos de RFO, los de almacenamiento (sintetizados por *GOLS1*) y los de transporte (por *GOLS2*). La separación funcional se consigue por medio de la expresión localizada. Por otro lado, la transcripción de GOLS en frijol es abundante en los tejidos vegetativos cuando las plantas están expuestas a estrés por frío (Elsayed *et al.* 2014). Tres isoformas de maíz (*ZmGOLS1*, 2 y 3) se han asociado a la abscisión de semillas en desarrollo y callo (Zhao *et al.* 2004). En algodón, *GhGOLS* mostró un patrón de expresión

específico en hojas y anteras, y fue localizado en la membrana celular (Zhou *et al.* 2012). En plantas de arroz, hubo un aumento considerable del contenido de Gal y Raf bajo estrés por bajas temperaturas, el cual se observó que fue mayor en las láminas que en las vainas de las hojas (Saito y Yoshida 2011). De igual forma, un gen GOLS específico de semilla (*LeGoIS1*) confirió tolerancia a la desecación, en jitomate (Downie *et al.* 2003).

La RAFS es altamente específica para galactinol y sacarosa, actuando como donador y aceptor respectivamente. También se han encontrado múltiples isoformas de esta enzima en las plantas. Secuencias de RAFS o *RAFS-like* se han reportado tanto en plantas antiguas como superiores. Se identificaron seis genes putativos codificantes de RAFS en el genoma de *Arabidopsis*, dos de los cuales fueron sobreexpresados en tabaco, donde se asociaron a una mayor tolerancia al estrés oxidativo (Nishizawa *et al.* 2008). Reportes de la estructura de STCS son menos comunes, ya que la secuencia es muy parecida a la de RAFS. Un ejemplo, es una STCS multifuncional que cataliza la síntesis de estaquiosa y verbascosa que ha sido caracterizada a partir de semillas de guisantes en desarrollo (Peterbauer *et al.* 2001).

La expresión de GOLS puede ser regulada por tres tipos de FT, dos de los cuales se encuentran en *Arabidopsis*: factores de choque térmico (HSF) y factores de unión responsivos a deshidratación y a frío (DREB1/CF1, por sus siglas en inglés). Se observó que cuando *Arabidopsis* es expuesta a estrés por calor, la expresión de *AtGOLS1* y *AtGOLS2* es regulada por HSF. También, se encontró que los HSF están asociados con la expresión de estos dos genes durante déficit de agua y condiciones de alta salinidad, mientras que la expresión de *AtGoIS3*, es regulada por los FT DREB1/CBF1. El tercer FT es WRKY, que está implicado en la regulación de la expresión de GOLS y RAFS en *Boea hygrometrica*. Este FT contiene elementos cis-específicos que son blancos inducibles por ABA, por lo que GOLS y RAFS podrían estar río abajo de la señalización por esta fitohormona (Panikulangara *et al.* 2004, Wang *et al.* 2009, Taji *et al.* 2002).

Se ha demostrado una estrecha relación entre la expresión de GOLS y la concentración de RFO. Sin embargo, también existen algunas excepciones; por ejemplo, no hubo relación significativa entre la actividad de GOLS y la cantidad de RFO acumulados en semillas de

cebada. Se observó que la acumulación de éstos, fue controlada por los niveles de los sustratos iniciales, *mio*-inositol y sacarosa, y no sólo por la actividad de GOLS (Karner *et al.* 2004). En semillas de jitomate, la cantidad de transcritos de GOLS tampoco se correlacionó con el contenido de rafinosa durante el desarrollo (Downie *et al.* 2003).

### 2.3.2 Rol de los RFO en respuesta a estrés abiótico

En condiciones normales y en algún momento determinado, todas las plantas sintetizan RFO, pero en muchas de éstas, como *Arabidopsis* o arroz, no se transportan ni se acumulan en grandes cantidades en sus tejidos o en sus órganos (Elsayed *et al.* 2014). Sin embargo, cuando sufren algún daño causado por estrés, sintetizan y acumulan solutos compatibles, incluyendo varios tipos de azúcares y RFO, que bajo condiciones de sequía, funcionan como osmolitos para mantener la turgencia celular, estabilizan las proteínas, y/o actúan como antioxidantes para contrarrestar la acumulación de ROS (Sengupta *et al.* 2015).

En hojas de tomate y en plántulas de *Arabidopsis*, los niveles de transcripción de GOLS aumentaron bajo estrés ambiental, como el frío y la desecación (Downie *et al.* 2003). En el caso de *Arabidopsis*, las isoformas GOLS1 y 2 fueron inducidas por sequía y salinidad, mientras que GOLS3 se indujo por frío. La sobreexpresión de estos genes resultó en acumulación aislada o combinada de Gol, Raf y Sta y subsecuentemente una mayor tolerancia a sequía, salinidad o estrés por frío (Taji *et al.* 2002). En algunas especies de plantas de resurrección, el aumento de los niveles de RFO durante la desecación contribuyó a la estabilización de la membrana fosfolípida (Elsayed *et al.* 2014). Por ejemplo, en *Boea hygrometrica*, *BhGOLS* fue inducido por sequía y por ABA, y confirió tolerancia a la deshidratación en plantas transgénicas de tabaco (Wang *et al.* 2009).

En 2011, dos Santos y colaboradores, estudiaron la expresión de tres isoformas de GOLS en *Coffea arabica* en respuesta al estrés abiótico. La isoforma *CaGOLS1* presentó la mayor actividad transcripcional en hojas, tanto en condiciones sin estrés, como en sequía, salinidad y estrés por calor. *CaGOLS2* aumentó la abundancia de sus transcritos únicamente en condiciones de déficit de agua severo y estrés salino, por lo que se creyó que este podría tener un papel más específico. Además, esta isoforma tiene un punto isoelectrico más básico, lo que sugirió que las diferencias podrían estar asociadas con la

localización subcelular, polimerización y conformación. Igualmente, los transcritos de *CaGOLS3* fueron detectados bajo todos los tipos de estrés aplicados, pero a niveles más bajos que *GOLS1*, indicando que esta isoforma juega un papel menor en el alivio de estrés en las plantas de café. Además, se observó que la magnitud del estrés tuvo una influencia directa sobre la cantidad y el tipo de RFO que se acumularon en las hojas de café (dos Santos *et al.* 2015)

Así también, en plantas de alfalfa, se estudiaron las respuestas a sequía severa y recuperación, de dos variedades con tolerancia contrastante a estrés hídrico. Parte de la respuesta ante este tipo de estrés, involucró la presencia de una variedad de osmolitos, azúcares y destacadamente la acumulación de RFO, ya que se observó la acumulación de *mio*-inositol, Raf y Gol, principalmente en el genotipo tolerante (Kang *et al.* 2011).

En contraste, el estrés por sequía en *Coleus blumei* causó una reducción en los niveles de RFO. Sin embargo, se observó la activación de la enzima *mio*-inositol 6-O-metiltransferasa y la acumulación de O-metil inositol (OMI) en los tejidos fotosintéticos. Los bajos niveles de RFO podrían ser el resultado de la reducción en la tasa de fotosíntesis causada por el déficit de agua, provocando la disminución en la actividad enzimática de GOLS y la inducción de la síntesis de OMI, que desvía el *mio*-inositol de la ruta de los RFO. En *Coleus*, se sugirió que los RFO, no juegan un papel directo en la tolerancia a la sequía de los tejidos vegetativos (como osmoprotectores), pero son parte de una estrategia de respuesta, en donde hay un interruptor metabólico que dirige la síntesis de OMI para servir como una molécula de tolerancia al estrés (Pattanagul y Madore 1999).

Aunque se ha propuesto que los RFO funcionan como osmoprotectores cuando los tejidos son expuestos al frío y a la desecación, también pueden representar simplemente un mecanismo de almacenamiento de carbono en la vacuola. En el caso particular de estrés por salinidad en plantas de *C. blumei*, la conversión de los azúcares a formas de alto peso molecular, puede ser una estrategia adecuada para almacenar carbono debido a la existencia de altas concentraciones de sales y otros iones (Gilbert *et al.* 1997). También se ha hipotetizado que la descomposición de los oligosacáridos durante la deshidratación, pudiera proporcionar los esqueletos de carbono necesarios para la síntesis de sacarosa

para proteger las plantas a la desecación inducida (Elsayed *et al.* 2014). Por ejemplo, la planta de resurrección, *Xerophyta viscosa*, en condiciones de déficit de agua, acumula tanto sacarosa como Raf en sus hojas (Peters *et al.* 2007).

## 2.4 MODELO DE ESTUDIO: AMARANTO

### 2.4.1 Aspectos históricos

El amaranto (*Amaranthus spp.*) llamado *hauhtli* en náhuatl, *xtes* en maya, *ahparie* en purépecha o *guegui* en rarámuri, ha sido consumido desde las civilizaciones antiguas (Velasco y Villela 2016). Los restos arqueológicos mesoamericanos más antiguos identificados como *Amaranthus spp.*, son semillas desecadas e inflorescencias recuperadas en excavaciones en el valle de Tehuacán, Puebla, y corresponden a periodos largos de tiempo que van desde hace 9 mil años hasta el siglo XVI. Así también, se han encontrado otros ejemplares en Tlapacoya (5000 a.C.), Tlaltenco (400-200 a.C.), Loma Torremonte (650-300 a.C.), Cuanalan (300 a.C.-120 d.C.), y Teotihuacán (100-650 d.C.), así como en otros sitios del Posclásico ubicados en la Cuenca de México (McClung *et al.* 2013).

El amaranto, junto con el maíz, formaban parte muy importante en la dieta cotidiana del hombre de Mesoamérica. Éste, además, representaba un elemento simbólico, ya que se utilizaba en las fiestas del calendario ritual y en ceremonias relacionadas con la fertilidad y el ciclo agrícola. Con sus semillas reventadas se hacía una masa utilizada para figurar deidades y objetos rituales, por lo que su uso fue censurado por la llegada de los conquistadores. Por otro lado, su consumo también se vio mermado ya que los españoles consideraban que este carecía de valor y lo llamaban *bledo*; incluso se le clasificaba como mala hierba en los sembradíos, lo que de alguna manera contribuyó para que a partir de la conquista no fuera importante y se desalentara su cultivo (Espitia-Rangel *et al.* 2010).

No fue hasta la década de 1980, cuando la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos, comenzó a estudiar el amaranto y descubrió el alto valor nutritivo del grano y su elevado potencial agronómico (Ulbricht *et al.* 2009).

### 2.4.2 Generalidades

El amaranto pertenece al orden *Caryophyllales*, a la familia *Amaranthaceae* y al género *Amaranthus*, dentro del cual se encuentran alrededor de 800 especies agrupadas en 60 géneros con un rango de variabilidad genética y fenotípica muy grande (Sauer 1967). Se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo, en particular en regiones tropicales, subtropicales y de clima templado. Crecen en latitudes que van de 0° a 30°, aunque también son capaces de crecer a mayores altitudes. Muchas de estas son malezas agresivas (e. g., *A. retroflexus* L., *A. hybridus* L., *A. powellii*, *A. spinosus* L.) y otras son especies cultivadas que pueden ser usadas como alimento de grano, vegetal, forraje y como plantas ornamentales. De acuerdo a su uso para consumo humano puede dividirse en amaranto de grano y vegetal. El amaranto de grano es considerado un pseudocereal ya que produce semillas tipo granos sin ser una gramínea. Dentro de este grupo de plantas se incluyen, además de *Amaranthus spp.*, *Chenopodium quinoa* y *Fagopyrum esculentum*. De acuerdo a la taxonomía reportada por Sauer en 1967 existen tres principales especies de amaranto productoras de grano: *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus*.

El amaranto es una de las pocas dicotiledóneas con metabolismo tipo C<sub>4</sub>, lo que resulta en una mejor eficiencia en el uso del CO<sub>2</sub> bajo un amplio rango de temperaturas, intensidades de luz y humedad variables. Todo esto contribuye a su amplia distribución geográfica y su adaptabilidad a diversas condiciones ambientales (Kigel 1994). Son capaces de crecer óptimamente en diversos tipos de suelo, a un rango de pH de neutro a alcalino, y bajo condiciones limitadas de nutrientes. Su ciclo de vida es muy variable, ya que va desde los 70 a los 240 días (Espitia-Rangel *et al.* 2010).

Son plantas herbáceas anuales de crecimiento rápido y con una gran diversidad de características, tipo de inflorescencia, color de la semilla, resistencia a plagas y enfermedades. Los colores del tallo y las hojas van de rojo a verde, con una gama de matices intermedios. Los tallos son gruesos con apariencia acanalada y su altura oscila entre los 40 cm y los 3 metros (Mújica *et al.* 1997). La inflorescencia consiste en panojas muy vistosas, terminales o axilares, que pueden variar de ser erectas hasta decumbentes; su tamaño va de 50 a 90 cm y presentan diversas formas. La raíz es de abundante ramificación y puede extenderse considerablemente, lo que le facilita la absorción del agua. El amaranto produce pequeñas semillas lisas (1-1.5 mm) y ligeramente aplanadas.

### **2.4.3 Características nutricionales**

El amaranto es un alimento considerado altamente nutritivo ya que sus granos y hojas poseen valiosos componentes. Las semillas contienen altas cantidades de proteína (16-18%) y un balance óptimo de aminoácidos (sobre todo de lisina y metionina), que supera en calidad a cualquier otro cereal o leguminosa. También presentan un alto contenido de fibra (4.2%) y escualeno (2.4-8%), y un contenido variable de lípidos (1.9-9.7%) principalmente compuestos por ácido palmítico (19%) oleico (26%) y linoleico (47%) (Berger *et al.* 2003, Rodas y Bressani 2009).

Así también, los granos son fuente de numerosos nutrientes que han mostrado ser benéficos para la salud humana, ya que poseen actividades antialérgicas, antioxidantes, antidiarreicas y anticancerígenas. Otros de los beneficios que se le atribuyen están la disminución de los niveles de colesterol en el plasma sanguíneo, estimulación del sistema inmunológico y reducción de glucosa en sangre. Además, han mostrado mejorar condiciones de anemia e hipertensión. También se ha destacado al amaranto por poseer vitaminas tales como niacina, riboflavina y ácido ascórbico; minerales como magnesio, calcio y hierro; y compuestos fenólicos como ácido gálico, vanílico e hidroxibenzoico (Huerta-Ocampo y Barba de la Rosa 2011, Caselato-Sousa y Amaya-Farfán 2012).

### **2.4.4 Respuestas del amaranto a condiciones de estrés**

El amaranto no sólo se ha destacado por sus excelentes cualidades nutricionales, sino que también posee características agronómicas altamente deseables. Tiene capacidad de crecer bajo condiciones ambientales desfavorables, tales como suelos salinos, altas y bajas temperaturas y en condiciones limitantes de agua (Brenner *et al.* 2000). Así también, el amaranto ha mostrado una alta capacidad de recuperarse después del daño causado por ataque de diversos herbívoros masticadores (Espitia-Rangel *et al.* 2010) y muestra una tolerancia excepcional ante defoliación severa (Castrillón-Arbeláez *et al.* 2012). Esta característica ha sido asociada a una utilización eficiente de las reservas de carbono almacenadas en tallo y raíz (Vargas-Ortiz *et al.* 2013). También es conocido por su respuesta rápida ante inductores químicos de defensa como ácido jasmónico (Délano-Frier *et al.* 2004) y benzotiadiazol (Casarrubias-Castillo *et al.* 2014).

La alta tolerancia del amaranto a ambientes desfavorables, particularmente a la sequía, ha sido atribuida a su fisiología C<sub>4</sub>, a la generación de extensas raíces principales y un vasto

sistema de raíces laterales en el suelo (Johnson y Henderson 2002). La habilidad de esta planta para hacer frente a la sequía está relacionada con su uso eficiente del agua, que ha mostrado ser superior a cultivos como el maíz, sorgo, algodón y trigo (Weber 1990).

Así también, se sabe que raíces de *A. hypochondriacus* sometidas a estrés hídrico, responden mediante cambios en la acumulación de proteínas y transcritos, y aumentan el contenido de prolina libre y azúcares totales. Dichas proteínas diferencialmente expresadas son SOD<sup>Cu-Zn</sup>, proteínas de choque térmico y otras ricas en glicina. También se vieron inducidos transcritos relacionados con defensa, señalización (Ser, Tyr cinasas), transporte de agua (acuaporinas y nodulinas) y se identificaron dos factores de transcripción DOF1 y MIF1. Las raíces de amaranto responden a la sequía a través de vías de señalización coordinadas que controlan el crecimiento celular, detoxificación celular y estabilización de ARN y proteínas (Huerta-Ocampo et al. 2011).

#### 2.4.5 Información genómica y filogenética

El origen del amaranto de grano no ha sido estudiado con gran detalle. En 1967, Sauer propuso que este fue el resultado de la domesticación de una única especie progenitora que fue hibridada con otros amarantos silvestres, produciendo las distintas especies. También sugirió que varias domesticaciones independientes pudieron originar las especies de grano. Posteriormente se realizaron diversos trabajos filogenéticos, que trataron de resolver la relación entre los amarantos silvestres y los de grano. En 2014, Kietlinski et al. realizaron un estudio extensivo, en el cual lograron identificar que *A. hybridus* es el progenitor de las especies de amaranto de grano en al menos dos eventos de domesticación independientes. *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* están estrechamente relacionados y *A. cruentus* pudo haberse originado por separado, ya que parece ser más diversa genéticamente. Además, observaron que *A. quitensis* es una especie distinta de *A. hybridus*, lo que permitió resolver con mayor exactitud la relación filogenética entre los amarantos de grano.

El amaranto, es un organismo dipolide ( $2n=32$ ) con un tamaño de genoma estimado en 466 Mb. Recientemente se ensambló el genoma, el cual consistió de 377 Mb en 3518 scaffolds con un N<sub>50</sub> de 371 kb. Se estimó que el 48% se encuentra comprendido por secuencias repetitivas. En la anotación se identificaron 23,059 genes codificantes de proteínas. Además, se reportó el primer mapa físico de amaranto, que consistió de 619 mapas individuales que abarcaron 340 Mb (73% de cobertura del genoma), este mapa duplicó el N<sub>50</sub> estimado anteriormente (Clouse et al. 2016).

### 3) JUSTIFICACIÓN

El estudio de los perfiles de expresión génica es una importante herramienta para investigar como los organismos responden a cambios ambientales. Las plantas, por su naturaleza sésil, tienen la habilidad de alterar los patrones de expresión en respuesta a cambios ambientales como temperatura, presencia de organismos patógenos, disponibilidad de agua, etcétera. Muchos de estos cambios transcripcionales son adaptaciones exitosas que les permiten tolerar condiciones que en otras circunstancias no serían capaces de afrontar. El estudiar la respuesta a nivel transcripcional de rutas biosintéticas asociadas a la respuesta al estrés, puede generar indicios sobre los mecanismos responsables de la tolerancia de las plantas a condiciones de crecimiento adversas. Se espera que estos perfiles de respuesta, den información que resulte útil para generar nuevas herramientas y métodos biotecnológicos para mejorar la tolerancia al estrés en plantas. Así también los datos generados darán lugar a nuevas perspectivas sobre cómo afecta el estrés en la fisiología de las plantas, particularmente como afecta el estrés hídrico en amaranto.

### 4) HIPÓTESIS

El déficit de agua en variedades de amaranto con distinta tolerancia a estrés hídrico, provoca cambios en el nivel de expresión de genes implicados en la síntesis de trealosa y oligosacáridos de la familia de la rafinosa, y estos cambios son dependientes del tejido y del grado de estrés aplicado.

### 5) OBJETIVOS

#### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios en los niveles de expresión de genes implicados en la síntesis de trealosa y oligosacáridos en diferentes variedades de amaranto sometidos a distintos niveles de estrés hídrico.

## 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar las variedades de amaranto con mayor y menor tolerancia a estrés por sequía.
- b) Analizar los niveles de expresión de genes de biosíntesis de trealosa: trealosa fosfato sintasa (TPS), trealosa fosfato fosfatasa (TPP) y trealasa (TRE); y genes del metabolismo de los oligosacáridos de la familia de la rafinosa: galactinol sintasa (GOLS), rafinosa sintasa (RAFS) y estaquirosa sintasa (STCS).
- c) Analizar las concentraciones de metabolitos: carbohidratos no estructurales, trealosa-6-fosfato, trealosa, galactinol, rafinosa y estaquirosa.

## 6) MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 MATERIALES

#### 6.1.1 Material biológico

Se utilizaron cuatro genotipos de amaranto con distintas respuestas a estrés hídrico: *Amaranthus hypochondriacus* variedad Gabriela, *A. cruentus* var. Amaranteca, *A. hybridus* var. 1330 y *A. caudatus* (Dr. Eduardo Espitia Rangel, INIFAP, México). Los primeros tres genotipos corresponden a amarantos de grano, mientras que *A. hybridus* es una especie herbácea (Apéndice 1).

#### 6.1.2 Sustrato y condiciones de crecimiento

El material vegetal descrito anteriormente fue obtenido sembrando semillas de las distintas variedades en charolas de poliestireno de 60 pozos, previamente llenadas con mezcla de germinación que consiste en una parte de mezcla general y una parte de fibra de coco (Humert de México, México). La mezcla general está compuesta por 3 partes de *Sunshine Mix 3* (SunGro Horticulture, EUA), una parte de limo, dos partes de hoja, una parte de vermiculita (SunGro Horticulture, EUA) y una parte de perlita (Termolita S.A., México). Las charolas con las semillas fueron colocadas en un cuarto de crecimiento con condiciones de fotoperiodo, temperatura y humedad controladas (16 h luz/ 8 h oscuridad, 26°C y 75% respectivamente). Transcurridas dos semanas, las plántulas fueron trasplantadas a macetas de plástico de 1.3 litros con 250 g de sustrato general previamente pesado y fueron regadas con 200 mL de una dilución del fertilizante 20-10-

20 (Peters Professional, EUA) al 0.2% (p/v). Se mantuvieron con 90% de humedad en el sustrato aproximadamente 3 semanas (10-12 hojas verdaderas) hasta el comienzo del estrés.

## **6.2 MÉTODOS**

### **6.2.1 Selección de especies y variedades de amaranto**

Se realizó un experimento en el que se sembraron distintas especies y variedades de amaranto: *A. hypochondriacus* variedad Gabriela, var. DGTA y var. Revancha; *A. cruentus* var. Amaranteca, var. Dorada y var. Tarasca; *A. hybridus* var. 1330 y *A. caudatus*. Una vez obtenidas las plantas se sometieron a dos tratamientos de estrés hídrico, estrés moderado (7 días sin riego) y estrés severo (10 días sin riego); al finalizar el tratamiento se observaron los fenotipos y se midió el potencial hídrico de hojas maduras (Hoja 9 a 11) usando un *WP4 Dewpoint Potentiometer* (Decagon Devices, EUA). Posteriormente, se aplicó un riego y se observaron los patrones de recuperación.

### **6.2.2 Experimento de estrés hídrico**

Los experimentos de sequía se llevaron a cabo durante los meses de mayo a agosto del 2015 en un invernadero comercial (Modelo baticentral, ACEA, México) con condiciones de temperatura que oscilaron entre los 15-38° C. El material se obtuvo como se menciona en la sección 6.2.2. 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, y se les comenzó a aplicar los tratamientos. A través de los experimentos las macetas se pesaron diariamente 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 en sustrato con 30% de humedad o estrés

hídrico moderado (EM), y el tercero, a plantas crecidas en sustrato con 10% de humedad, o estrés severo (ES). El cuarto grupo correspondió a las plantas que alcanzaron el ES y se les aplicó un riego de recuperación (REC). Estas 12 plantas fueron colectadas en 3 pozas de 4 plantas cada una, de las cuales se colectaron raíz, hoja y tallo para cada tipo de estrés. El material se colectó y se congeló de inmediato en N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente se almacenó a -70° C hasta su utilización.

### **6.2.3 Extracción de ARN total**

El ARN total fue extraído empleando el reactivo TRIzol® (Life technologies, EUA) a partir de 100-200 mg de tejido congelado previamente molido con N<sub>2</sub> líquido. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con modificaciones. Estas modificaciones consistieron en la adición de una mezcla de sales (citrato de sodio 0.8 M y cloruro de sodio 1.2 M), así como 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 hora a 4°C. Una vez finalizada la extracción, se verificó la integridad del ARN por medio de electroforesis en gel de agarosa bajo condiciones desnaturalizantes (i. e. usando formaldehído-formamida) y visualizada 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), la concentración y pureza fueron determinadas por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA).

### **6.2.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc)**

La primera cadena de ADNc fue sintetizada a partir de 4 µg de RNA total utilizando 200 unidades de la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, EUA), oligo(dT)<sub>20</sub> y desoxirribonucleótidos (dNTPs), acorde a las instrucciones del fabricante. La amplificación del gen endógeno actina (*Ah-ACT7*, isotig 10321) se utilizó para corroborar la síntesis de ADNc, el cual se almacenó a -70° hasta su utilización.

### 6.2.5 Identificación de los transcritos de interés

Las secuencias de interés fueron obtenidas mediante la búsqueda por nombre en la base de datos del transcriptoma de amaranto (Délano-Frier 2011). Posteriormente las secuencias elegidas fueron traducidas *in silico* en ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>) donde se eligió el polipéptido con el marco de lectura abierto más extenso para cada una de las secuencias. Para la búsqueda de identidad de estas se utilizó la herramienta bioinformática Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### 6.2.6 Diseño de oligonucleótidos

Con el fin de obtener oligonucleótidos óptimos para cuantificar la expresión mediante qRT-PCR, se diseñaron siguiendo la metodología descrita por Thornton y Basu en 2011. Las características de éstos se encuentran en el Apéndice 3. Los oligonucleótidos empleados que corresponden al metabolismo de trealosa y oligosacáridos de la familia de la rafinosa, fueron obtenidos de Cisneros-Hernández (2016).

### 6.2.7 Ensayos de PCR en tiempo real (qRT-PCR)

Para la cuantificación de la expresión génica mediante qRT-PCR, se utilizó como ADN templado el ADNc sintetizado como se describe en la sección 6.3.4 y diluido 25 veces con agua desionizada destilada estéril (dd). La amplificación se realizó en placas de 96 pozos en el equipo *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad, EUA) y como indicador de la amplificación iQSYBR Green Supermix (Bio-Rad, EUA). Para cada reacción de PCR se empleó un volumen total de 20  $\mu$ L que contenían 8  $\mu$ L de SYBR Green, 2  $\mu$ L de ADNc (1:25), 2  $\mu$ L de cada oligonucleótido a 2  $\mu$ M (directo y reverso) y 6  $\mu$ L de agua dd. El protocolo de amplificación empleado fue el siguiente: un paso de desnaturalización a 95° C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de dos pasos, el primer paso de desnaturalización a 95° C por 15 s y el segundo de alineamiento-elongación a 60° C durante 1 min. La especificidad de los amplicones fue verificada con una curva de disociación, después de los 40 ciclos a 60°C incrementando la temperatura hasta 90°C en intervalos de 0.5°C cada 3 s. Los niveles de expresión relativa se calcularon utilizando el parámetro  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak y Schmittgen 2001) donde  $\Delta\Delta C_t$  representa:

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T_{GT}} - C_{T_{RT}}) - (C_{T_{GC}} - C_{T_{RC}})$$

$C_{T_{GT}}$ : Ciclo umbral del gen de interés con tratamiento

$C_{T_{ET}}$ : Ciclo umbral de los genes de referencia con tratamiento

$C_{T_{GC}}$ : Ciclo umbral del gen de interés en condiciones control

$C_{T_{RC}}$ : Ciclo umbral de los genes de referencia en condiciones control

Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando la media aritmética de tres genes endógenos: *Ah-ACT7* (actina, isotig 10321), *AhEF1 $\alpha$*  (factor de elongación, isotig 13098) y *Ah- $\beta$ tub5* ( $\beta$ -tubulina, isotig05486). Todos los ensayos de amplificación se realizaron por cuadruplicado para cada uno de los genes empleados.

## 6.2.8 Ensayos enzimáticos

### 6.2.8.1 Extracción de azúcares

La preparación de los extractos para la determinación de los carbohidratos no estructurales fue realizada según Wright *et al.* (1998), con algunas modificaciones. Para ello se pesaron 50 mg de tejido liofilizado de hoja y raíz de *Amaranthus spp.* en tubos de 2 mL. Posteriormente se resuspendió en 500  $\mu$ L de buffer de extracción (Hepes KOH 50 mM, pH 7.4; MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EtOH 80%) y se mantuvo en agitación durante 10 min. Después se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min y se colectó el sobrenadante en tubos nuevos, la pastilla se almacenó. El sobrenadante colectado se concentró utilizando un equipo de centrifugación al vacío Maxi Dry Lyo Freeze-dryer (Heto-Holten, Dinamarca). El concentrado obtenido se disolvió en 500  $\mu$ L de buffer Hepes (KOH 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) el cual contenía la sacarosa, glucosa y fructosa.

### 6.2.8.2 Determinación de azúcares

Se tomaron 10  $\mu$ L de muestra del extracto por triplicado y se colocaron en una caja Elisa de 96 pozos, se adicionaron 200  $\mu$ L de mezcla de reacción (NADP, ATP, G6PH, buffer Hepes) y se introdujo en un lector de placas (xMark Microplate Spectrophotometer, BioRad, EUA) a una temperatura de 30° C. Se fue tomando la lectura de esta mezcla a una absorbancia de 340 nm cada min hasta alcanzar la estabilidad de la misma. Una vez

alcanzada se adicionaron 2  $\mu\text{L}$  de la enzima hexocinasa (HK) y se tomó la lectura cada 2 min para la cuantificación de la glucosa. Una vez que la lectura fue constante se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de la enzima fosfoglucosa isomerasa (PGI) para la determinación de la fructosa, de igual forma se tomó la lectura cada dos min hasta que fue constante. Finalmente se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de invertasa (I) para medir el contenido sacarosa presente en los extractos.

#### 6.2.8.3 Extracción y digestión de almidón

La pastilla almacenada en la sección 6.3.8.1 contenía el almidón. A ésta se le agregó 1 mL de EtOH 80%, se incubó durante 10 min a 80° C, después se agitó por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12 mil rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante. Se disolvió la pastilla en 500  $\mu\text{L}$  de KOH 10 mM y se incubó a 99° C durante dos horas en un *termomixer*. Pasado el tiempo se colocó en hielo y se adicionó 500  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 50 mM y 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla de degradación de almidón (*amyloglucosidase* 59.9 U/ mg, Fluka 10115;  $\alpha$ -amylase Type VI-B, SIGMA, y acetato de sodio pH 5) y se incubó a 37° C durante toda la noche. Se centrifugó a 12 mil rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante. Para la determinación de almidón se utilizó el mismo protocolo descrito para la cuantificación de azúcares solubles, pero en este caso únicamente se llevó a cabo la primera reacción con HK para la determinación de glucosa.

#### 6.2.9 Determinación de prolina

Para cuantificar el contenido de prolina se utilizaron 50  $\mu\text{L}$  del extracto obtenido como se menciona en la sección 6.3.8.1, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de ácido acético glacial al 60%, ninhidrina al 1% y etanol al 20%, se mezcló y se puso en ebullición durante 20 min. Se enfrió a temperatura ambiente y se transfirió a una placa Elisa para ser leída a una absorbancia de 520 nm.

### 6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el software R con sus respectivos paquetes estadísticos (R Development Core Team, <https://www.r-project.org/>).

## 7) RESULTADOS

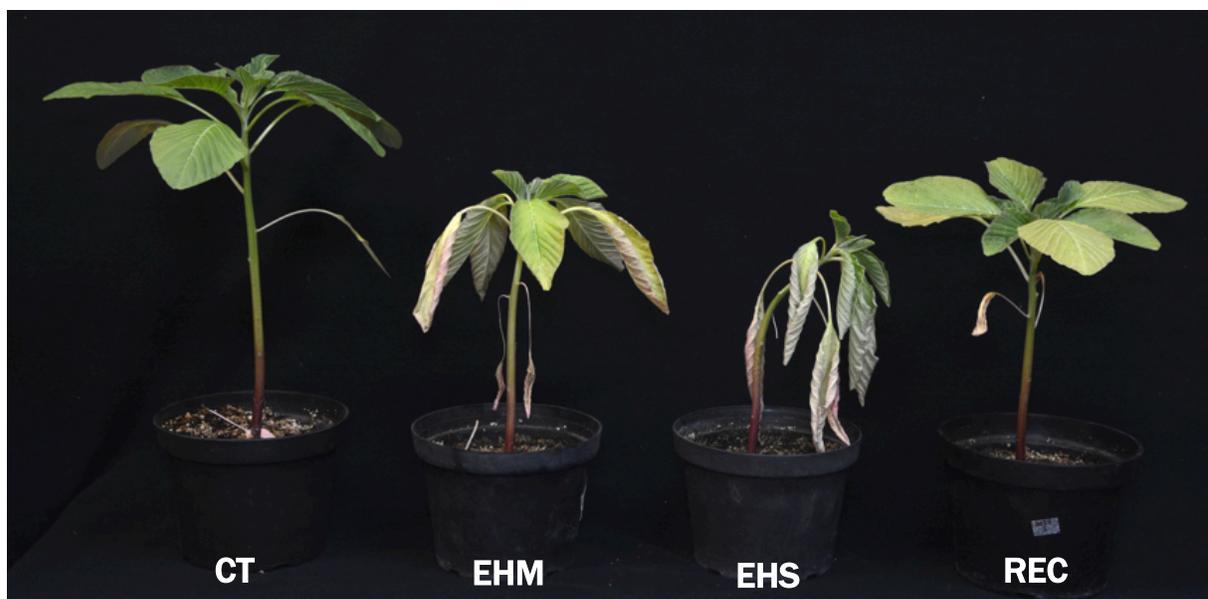
### 7.1 SELECCIÓN DE ESPECIES Y VARIEDADES DE AMARANTO

El agua es una necesidad vital para todos los organismos. Sin embargo, cada uno tiene requerimientos específicos, por lo que cualquier deficiencia en esa cantidad en particular impondrá condiciones estresantes. Así mismo, el requerimiento de agua es variable a través de los tejidos y en las etapas de crecimiento, por lo que, con el fin de determinar las variedades de amaranto con mayor y menor tolerancia a deficiencia de agua, se realizó el experimento descrito en la sección 6.3.1. Los resultados indican que *A. hypochondriacus* variedad Gabriela presentó mayor contenido de agua en las hojas tanto en estrés medio y severo (-3.41 MPa y -41.59 MPa, respectivamente), seguido de *A. cruentus* variedad Amaranteca (-4.02 MPa y -60.20 MPa, respectivamente). Por otro lado, la especie más susceptible a los tratamientos de estrés hídrico fue *A. caudatus* (-6.14 MPa y -122.63 MPa, respectivamente). En la especie *A. hybridus* no fue posible medir el potencial hídrico pues las plantas se secaron en su totalidad. No obstante, esta especie presentó un patrón de recuperación distinto y superior al resto de las especies (Apéndice 4). Por lo tanto, para el presente estudio se eligieron las variedades antes mencionadas, considerando a Gabriela y Amaranteca como los genotipos tolerantes, *A. caudatus* como la especie susceptible, y *A. hybridus* var. 1330 con un comportamiento distinto al resto de las especies, ya que fue susceptible a sequía, pero superior en su capacidad de recuperación.

### 7.2 EXPERIMENTO DE ESTRÉS HÍDRICO

Para la obtención del material vegetal para el análisis de expresión génica, se realizó el experimento descrito en la sección 6.2.2. Las plantas de amaranto sufrieron una pérdida de agua en el sustrato que correspondió al 70% para el caso de estrés hídrico moderado (EHM), y de un 90% para el estrés hídrico severo (EHS). Estos niveles de sequía se alcanzaron aproximadamente después de 5-6 días y de 9-10 días sin riego, respectivamente. Otro grupo de plantas se dejó secar hasta niveles de EHS, posteriormente se les aplicó un riego de recuperación durante 24 h. En la figura 2 se muestra el aspecto que presentaron las plantas de amaranto bajo los tratamientos de estrés aplicados durante los experimentos de sequía. Como se puede observar, dichas plantas mostraron una pérdida en la turgencia del tejido foliar, la cual fue más evidente en condiciones severas

de sequía, así como enrollamiento y pérdida en la coloración de las hojas. Además, se observó una menor elongación del tallo a diferencia de las plantas bien regadas o control.



**Figura 2. Plantas de amaranto sometidas a distintos grados de sequía.** Imagen que muestra los fenotipos observados en *Amaranthus cruentus* bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación).

### 7.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES POR qRT-PCR

Para el análisis de expresión génica se utilizaron secuencias provenientes de la base de datos del transcriptoma de *A. hypochondriacus*. Las secuencias utilizadas correspondientes al metabolismo de trealosa fueron las siguientes: nueve de trealosa fosfato sintasas (TPS), tres de trealosa fosfato fosfatasas (TPP) y una de trealasa (TRE). Las del metabolismo de RFO encontradas correspondieron a dos de galactinol sintasa (GolS), una de rafinosa sintasa (RafS) y una de estaquiosa sintasa (StcS). También se cuantificó la expresión de cuatro *sucrose non-fermenting related kinases* (SnRAK, SnRK1 $\alpha$ , SnRK2.1 y SnRK2.2), y de cinco genes asociados a ABA (RAB18, ABI1, ABI5, DREB2C y LEA14). Se comprobó la eficiencia de amplificación de todos los oligonucleótidos correspondientes a las secuencias antes mencionadas, siendo ésta de un 90-110% y mostrando solamente un producto de amplificación en qRT-PCR.

El efecto de distintos grados de sequía sobre la expresión de las secuencias de los genes antes mencionados fue determinado en cuatro especies de amaranto: *A. hypochondriacus*, *A. cruentus*, *A. caudatus* y *A. hybridus* y en órganos fuente (hojas) y sumidero (raíces). Dichos cambios en la expresión se estimaron utilizando el parámetro  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ , indicando la abundancia relativa de los transcritos, para este caso en particular, de plantas sometidas a estrés hídrico respecto a plantas control o bien regadas. Los valores de expresión en condiciones control fueron normalizados a 1.0, mientras que valores menores a 0.5 indican represión en la expresión génica y valores mayores a 2 indican que hay una inducción en la expresión de los genes estudiados.

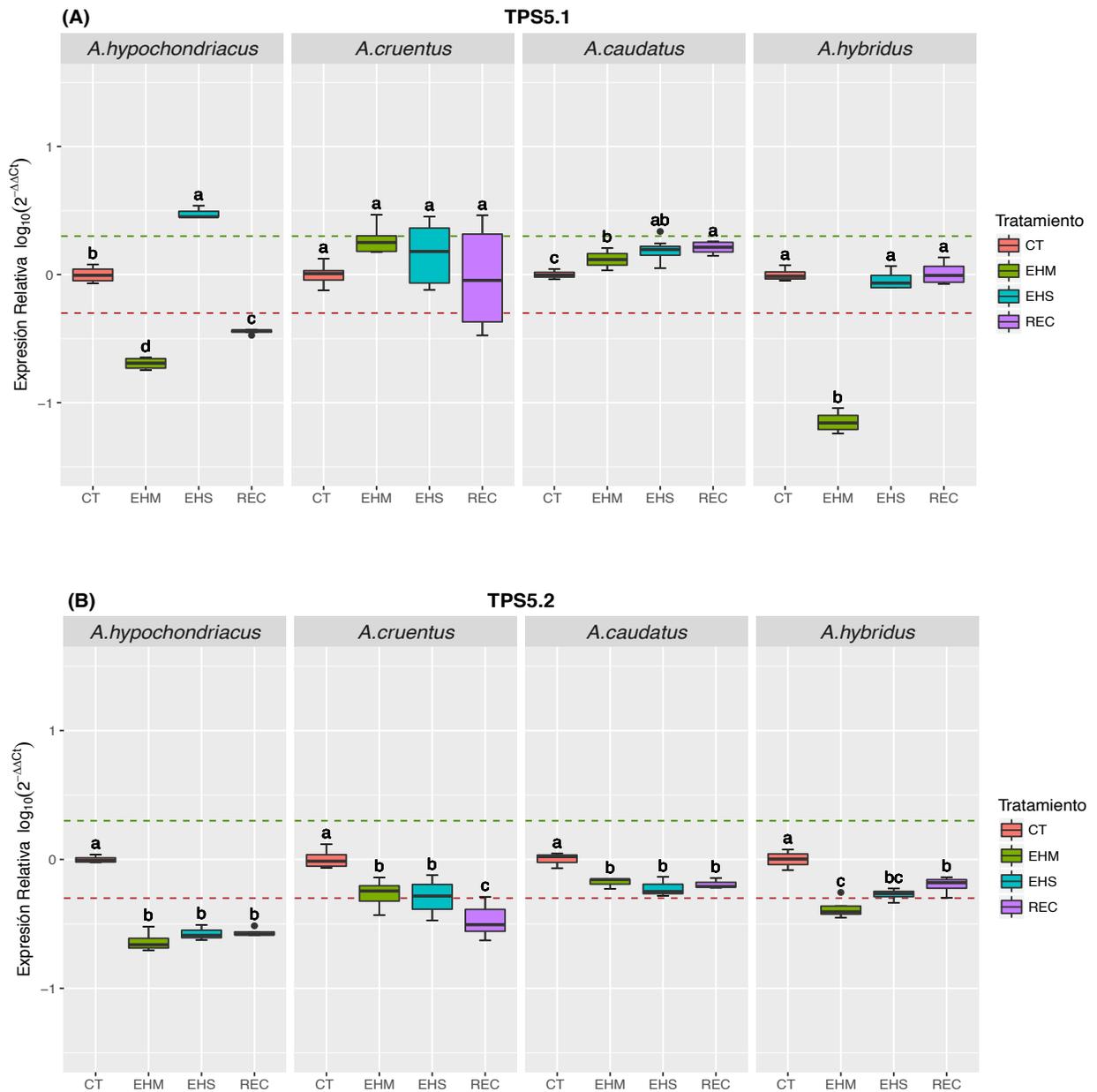
Los resultados se muestran en gráficos de “caja y bigotes” o *boxplots*, donde para fines comparativos se representan con una escala transformada con logaritmo base 10. En éstos se graficaron los valores obtenidos en el análisis de dos experimentos independientes, con cuatro réplicas técnicas cada uno. Así también, para representar las diferencias estadísticas de los tratamientos con respecto a los valores de plantas control, se muestran los resultados de éstos, así como los límites de inducción (i. e., 0.3) y represión (i. e., -0.3).

#### **7.4 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES CODIFICANTES DE ENZIMAS CLAVE DEL METABOLISMO DE TREALOSA**

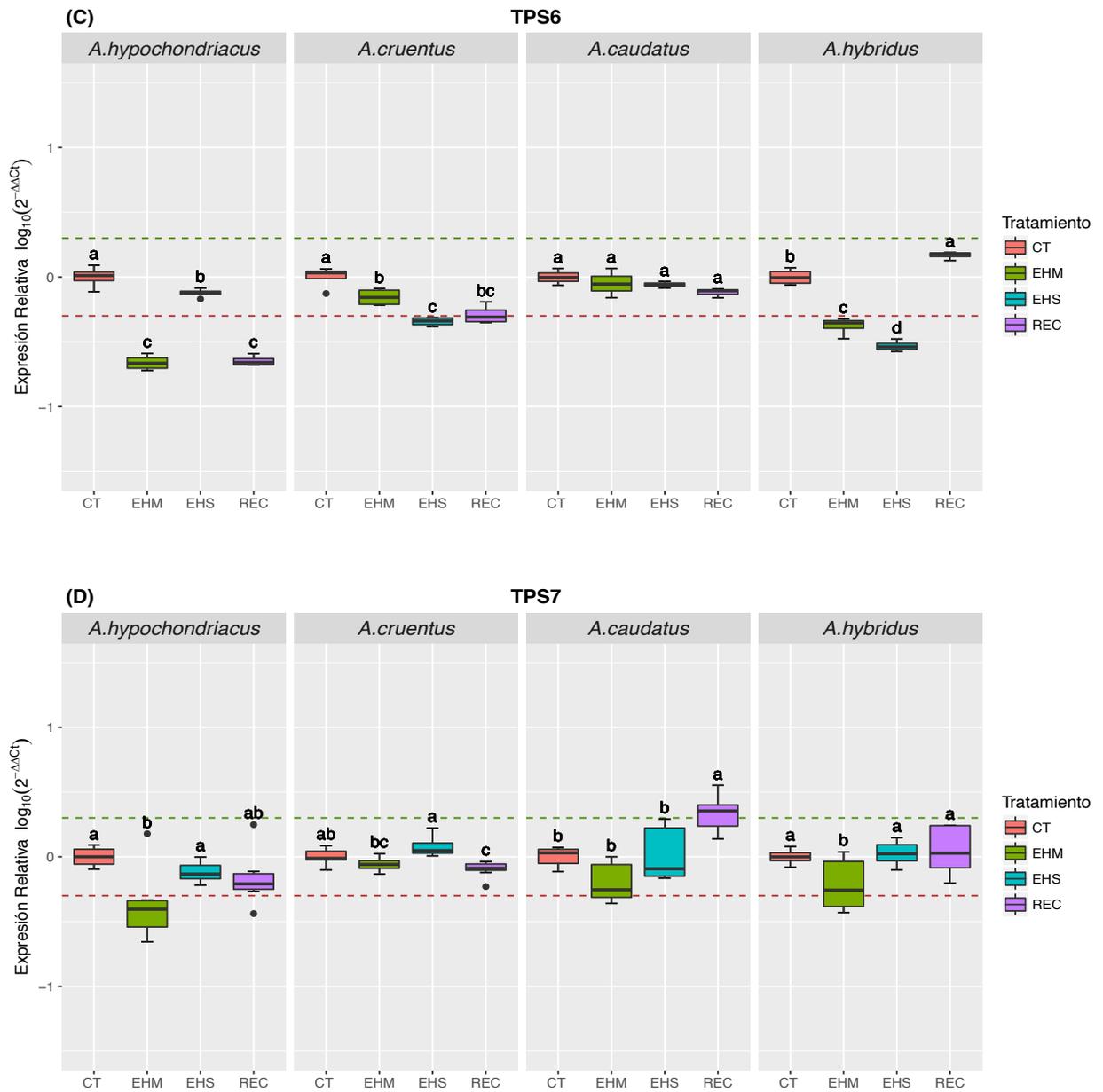
El estrés por sequía ocasionó cambios en la abundancia relativa de transcritos en algunos de los genes asociados al metabolismo de trealosa. Éstos cambios fueron dependientes de la especie, órgano y grado de estrés aplicado. La expresión génica de los transcritos con identidad TPS de la clase II fue evaluada en hojas y raíces de distintas especies de amaranto con tolerancia contrastante a sequía.

En hoja, el déficit hídrico provocó la represión del gen TPS5.1 bajo estrés moderado en *A. hypochondriacus* y *A. hybridus* mientras no cambió su expresión en *A. cruentus* y en *A. caudatus*. En estrés severo se observó una inducción de este gen en *A. hypochondriacus*,

mientras que no hubo cambios en el resto de las especies. De igual forma, plantas recuperadas o rehidratadas no mostraron cambios, únicamente en *A. hypochondriacus* hubo represión de este gen. A pesar de que TPS5.1 en *A. caudatus* no mostró estar inducido o reprimido bajo ninguna condición de estrés, éste mostró cambios estadísticamente significativos respecto a plantas control, estando cerca del límite de inducción (Figura 3A). Para el caso del gen codificante para TPS5.2, en *A. hypochondriacus* se reprimió en todos los tratamientos. En *A. cruentus*, la abundancia de este transcrito fue menor a 1 en estrés hídrico moderado y severo, alcanzando los límites del umbral de represión y rebasándolo en recuperación. La expresión de TPS5.2 en la especie *A. caudatus* no rebasó los límites de inducción o represión, pero sí tuvo un valor menor al control y estadísticamente diferente en condiciones de estrés. Así también la expresión relativa de este gen en *A. hybridus* se vio reprimida en condiciones de estrés moderado, mientras que en severo y recuperación fue menor y distinto que el control (Figura 3B). Las isoformas, TPS6 y TPS7 también mostraron cambios en su expresión. Por ejemplo, la primera de éstas se vio reprimida en estrés moderado y recuperación en *A. hypochondriacus*, mientras que en sequía severa no sobrepasó los límites de inducción o represión, pero sí fue diferente del control. La especie *A. cruentus* disminuyó su expresión bajo los tratamientos aplicados, reprimiéndose en estrés severo, y llegando a los límites de represión en recuperación. En *A. caudatus* no se observaron cambios en ninguna de las condiciones estudiadas. En *A. hybridus*, este gen se reprimió de manera significativa en estrés hídrico moderado y aún más en severo, y en condiciones de recuperación su expresión fue mayor que el control y cercana al límite de inducción (Figura 3C). Así también, el gen TPS7, mostró estar reprimido en sequía moderada en *A. hypochondriacus*, mientras que no se observaron cambios en la abundancia de transcritos en las demás condiciones estudiadas. En hojas de *A. cruentus*, no hubo ningún cambio en la abundancia de transcritos, mostrando valores estadísticamente similares entre sí; del mismo modo el estrés no afectó a la especie *A. caudatus*, únicamente mostrando valores en el límite de inducción bajo condiciones de rehidratación; así también este comportamiento se observó en *A. hybridus* donde sólo hubo cambios el nivel más bajo de estrés observándose valores cercanos al límite de represión (Figura 3D).

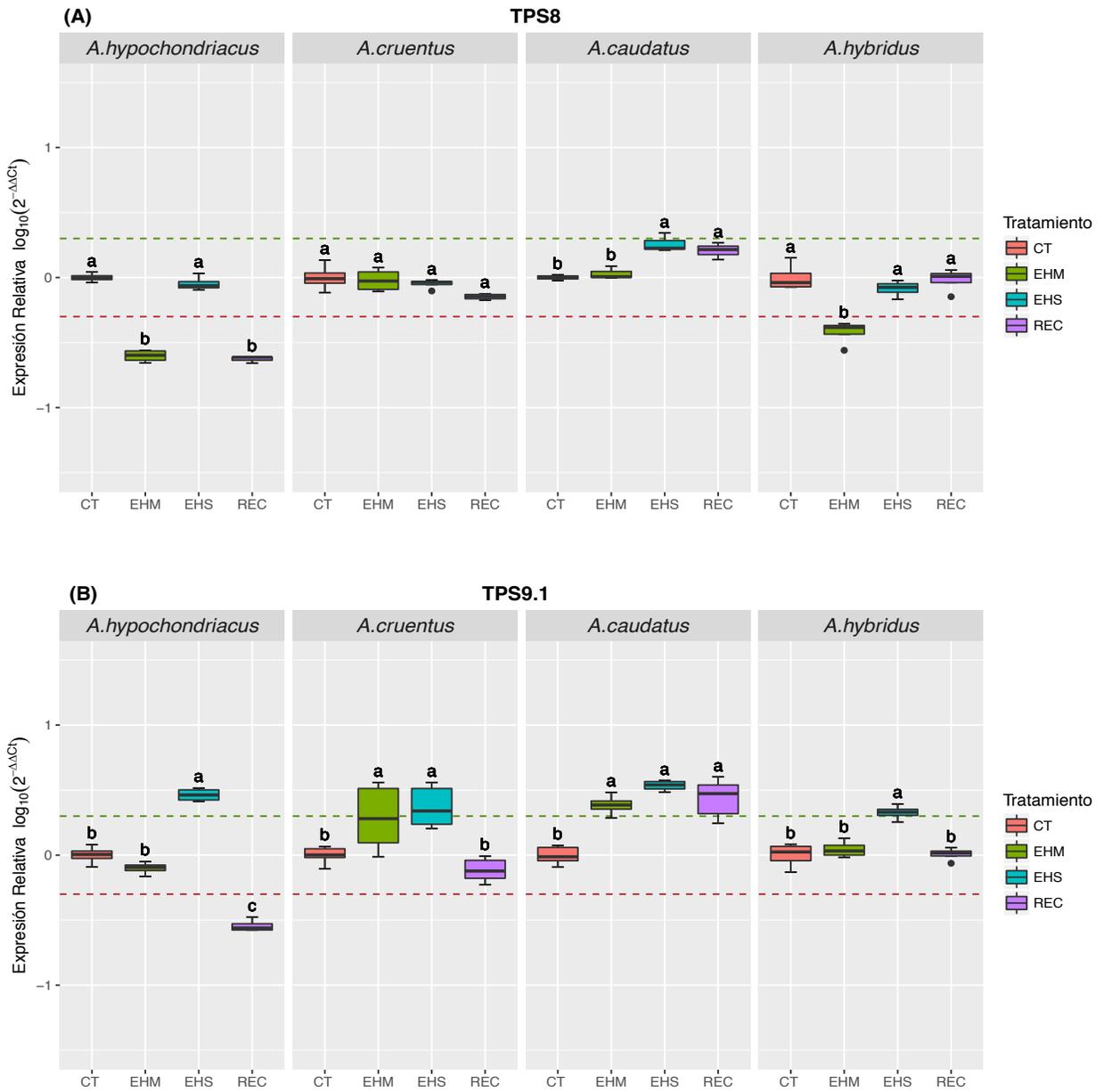


**Figura 3. Expresión relativa de genes codificantes para enzimas no catalíticas del metabolismo de trealosa en hojas de distintas especies de amaranto (I).** Box-plots de la abundancia de transcritos con identidad TPS Clase II: (A) TPS5.1 y (B) TPS5.2, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).



**Figura 3 (continuación).** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas no catalíticas del metabolismo de trealosa en hojas de distintas especies de amaranto (I). *Box-plots* de la abundancia de transcritos con identidad TPS Clase II: (C) TPS6 y (D) TPS7, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

De la misma manera, el gen TPS8 no mostró ser inducido o reprimido bajo ninguna condición estudiada, en hojas de *A. cruentus* y en *A. caudatus*. Sin embargo, en esta última especie sí hubo un aumento significativo de expresión bajo estrés severo y recuperación, más no superó el umbral de inducción. Así también, en *A. hybridus* se reprimió en estrés moderado y en *A. hypochondriacus*, tanto en este tipo de estrés como en recuperación (Figura 4A). De manera interesante, se observaron patrones de expresión importantes para la TPS9.1, ya que mostró una inducción significativamente mayor en todas las especies bajo estrés severo respecto a plantas control. Esta inducción fue aproximadamente de 3 veces mayor y 2.45 veces en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* respectivamente, así como de 2.7 en *A. caudatus* y 2.15 en *A. hybridus*. La sequía moderada modificó la expresión en *A. cruentus*, alcanzando valores mayores a 2 y en *A. caudatus* sobrepasando el límite de inducción tanto en este grado de estrés como en recuperación. Este gen estuvo por debajo del umbral de represión únicamente bajo condiciones de recuperación de *A. hypochondriacus* (Figura 4B). Para el caso de la TPS9.2, también se observaron patrones muy claros de expresión en todas las especies estudiadas, ya que dicha expresión fue dependiente del grado de sequía aplicada, aumentando significativamente en estrés moderado y siendo aún más evidente el aumento bajo estrés severo. El incremento en expresión observado en sequía severa fue mayor en *A. caudatus* y *A. hybridus* que en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*. En condiciones de recuperación, este incremento en la abundancia de transcritos se vio mermado hasta valores cercanos al control en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, y alcanzando valores en el límite del umbral de inducción en las otras dos especies (Figura 4C). Por último, de los genes TPS de clase II cuantificados en hoja, el gen TPS10 mostró estar inducido en sequía moderada y recuperación en *A. caudatus* y reprimido bajo esas mismas condiciones en *A. hypochondriacus*. En *A. cruentus* se indujo en estrés severo y recuperación, pero de manera singular, la inducción observada en estrés severo no representó diferencia significativa respecto control. Finalmente, *A. hybridus* manifestó cambios en la abundancia de transcritos en forma de represión únicamente en estrés hídrico moderado, y siendo ligeramente mayor a uno en estrés severo (Figura 4D).



**Figura 4.** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas no catalíticas del metabolismo de trealosa en hojas de distintas especies de amaranto (II). *Box-plots* de la abundancia de transcritos con identidad TPS Clase II: (A) TPS8 y (B) TPS9.1, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

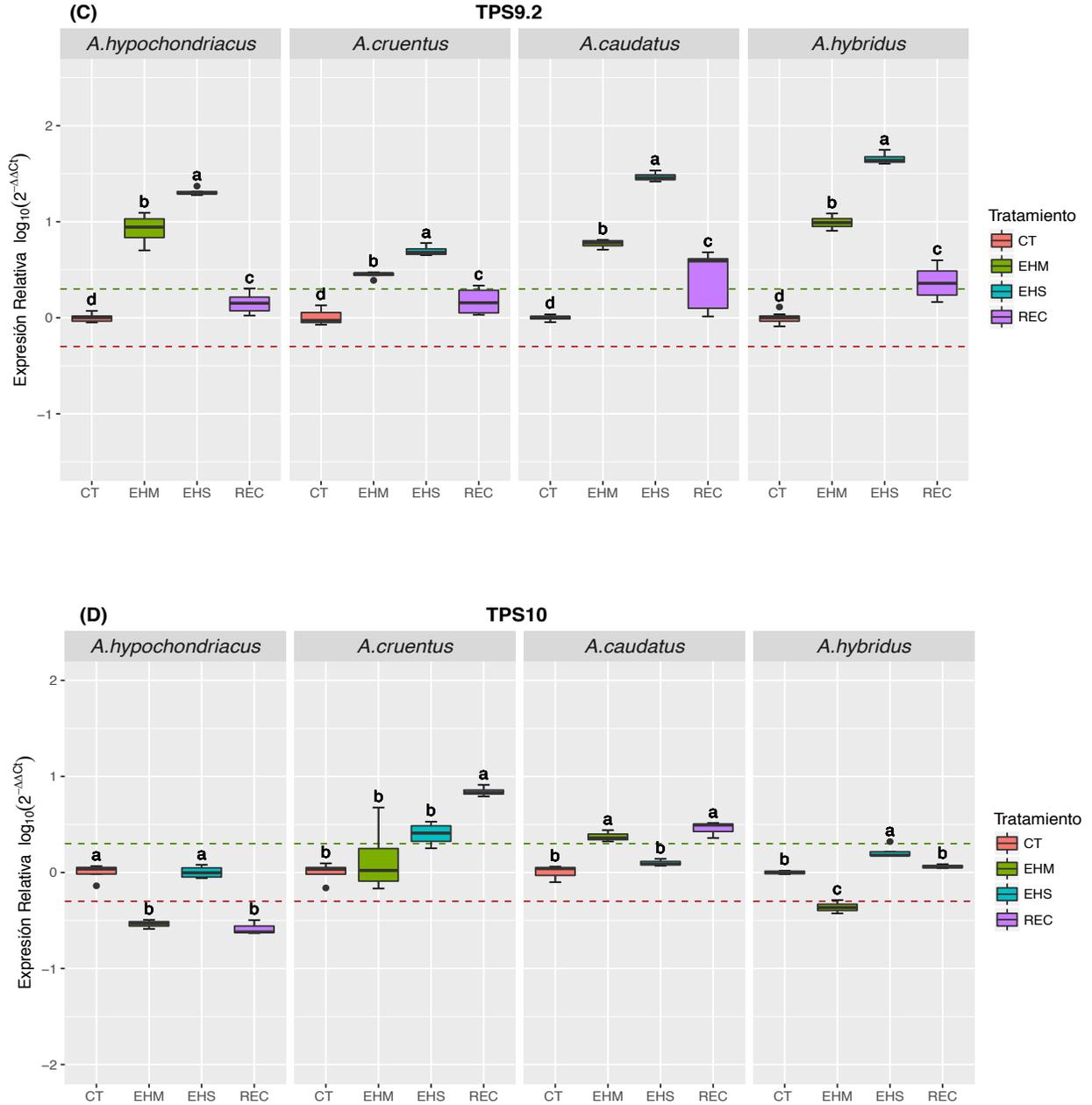
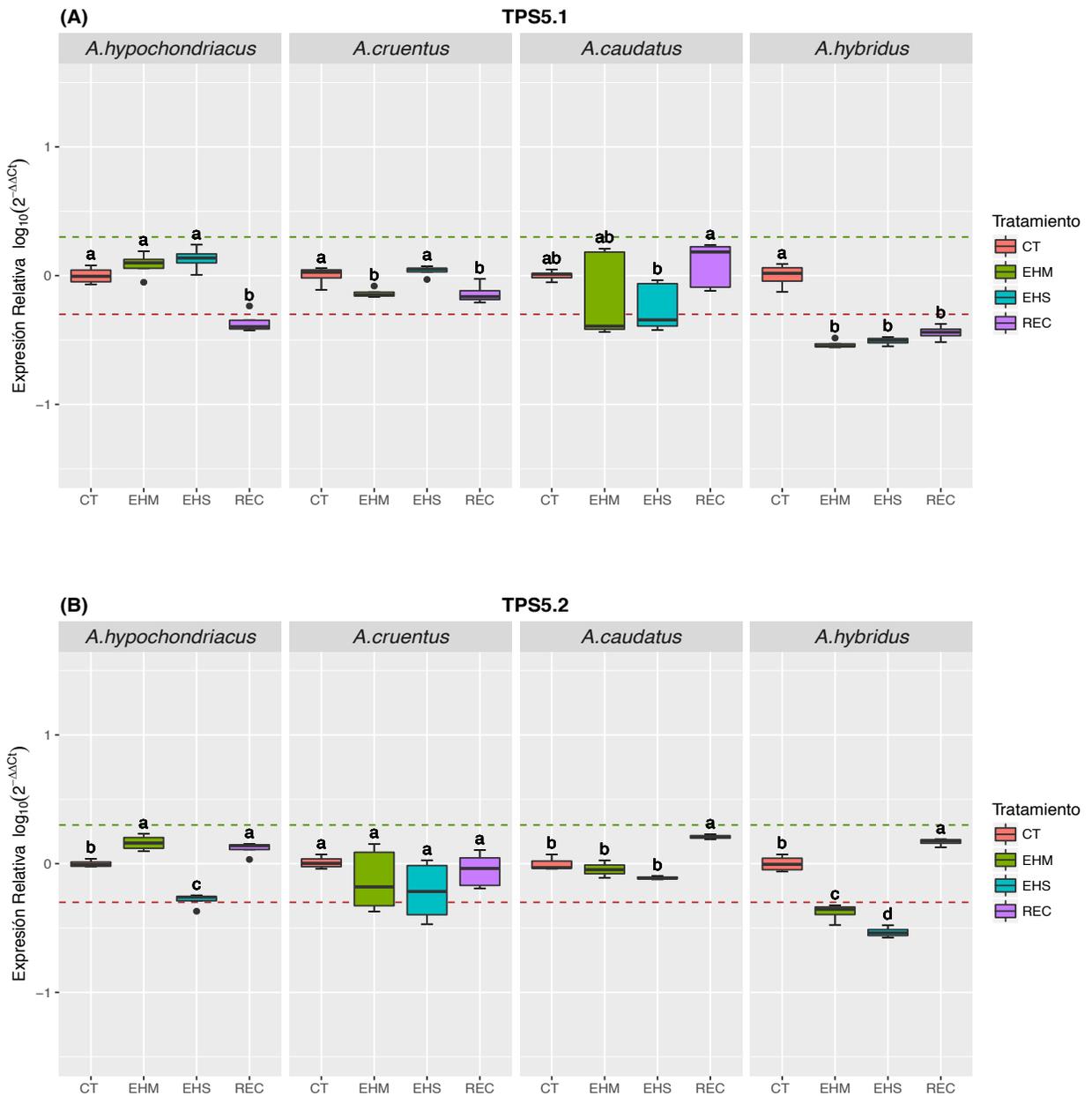
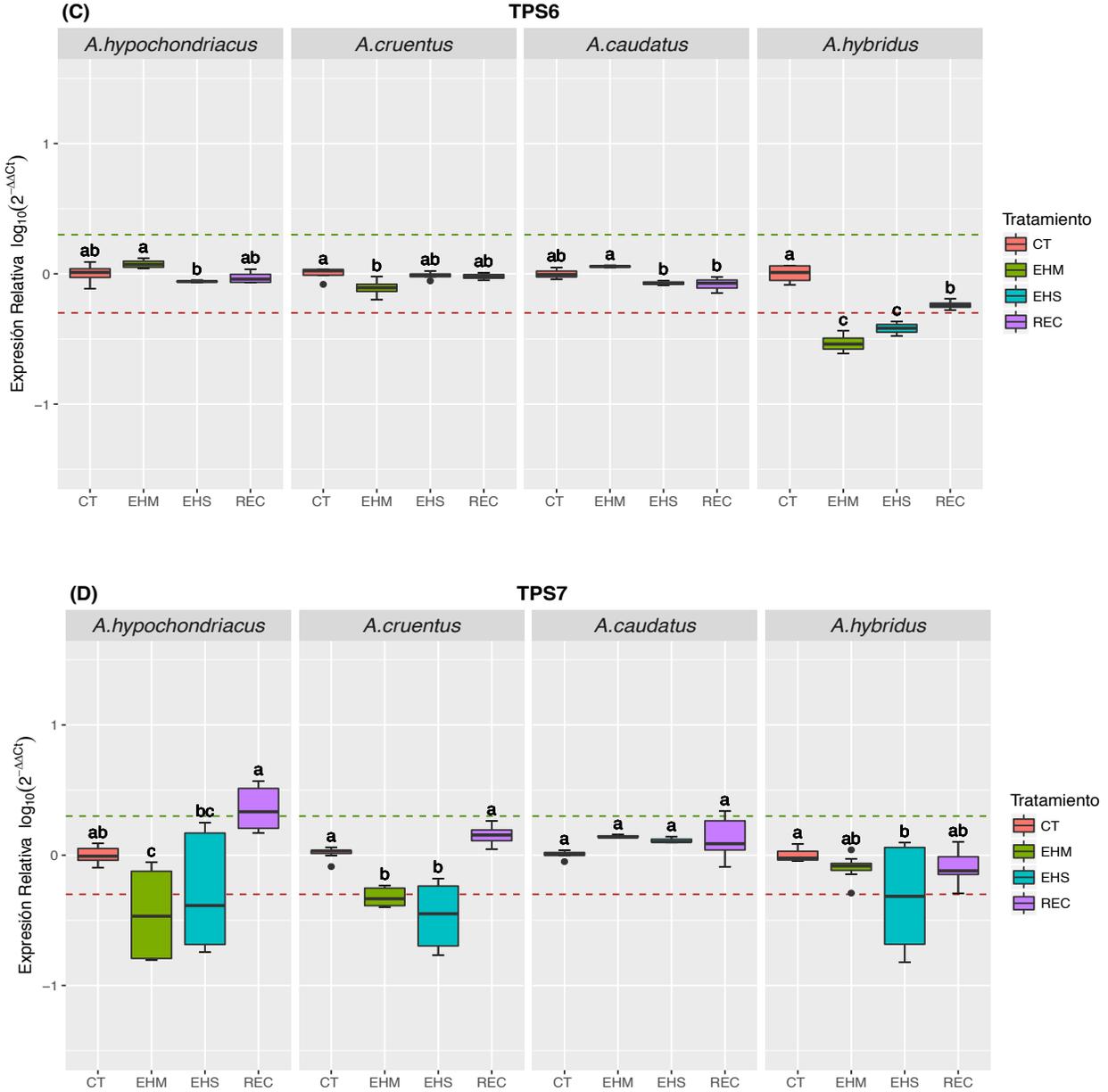


Figura 4 (continuación). Expresión relativa de genes codificantes para enzimas no catalíticas del metabolismo de trealosa en hojas de distintas especies de amaranto (II). *Box-plots* de la abundancia de transcritos con identidad TPS Clase II: (C) TPS9.2 y (D) TPS10, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

Por otro lado, la expresión relativa de transcritos con identidad TPS de clase II, carentes de actividad sintasa, también fue afectada a causa del estrés por sequía en raíces de amaranto. El gen TPS5.1 en general se mantuvo sin cambios en todas las especies estudiadas, exceptuando a la especie *A. hypochondriacus* donde en condiciones de recuperación alcanzó valores por debajo del límite de represión, y en *A. hybridus* se reprimió bajo todos los tratamientos (Figura 5A). Aunque el estrés hídrico modificó la abundancia de transcritos correspondientes a TPS5.2 y TPS6 en algunas condiciones, ninguna de las especies estudiadas superó el límite de inducción o represión, a excepción de *A. hybridus*, especie en la cual estos genes se reprimieron bajo estrés severo y moderado (Figura 5B y 5C). Así también, la TPS7 mostró alta variabilidad entre los resultados obtenidos entre experimentos bajo condiciones de estrés severo en casi todas las especies. En raíces, mostró patrones semejantes en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, en donde disminuyó su expresión en estrés hídrico moderado y severo alcanzando valores por debajo del umbral de represión y aumentando estos niveles por encima del control en plantas recuperadas. Por otro lado, en *A. caudatus* no hubo cambios, mientras que *A. hybridus* alcanzó valores que sobrepasaron el límite de represión bajo condiciones de sequía severa (Figura 5D).



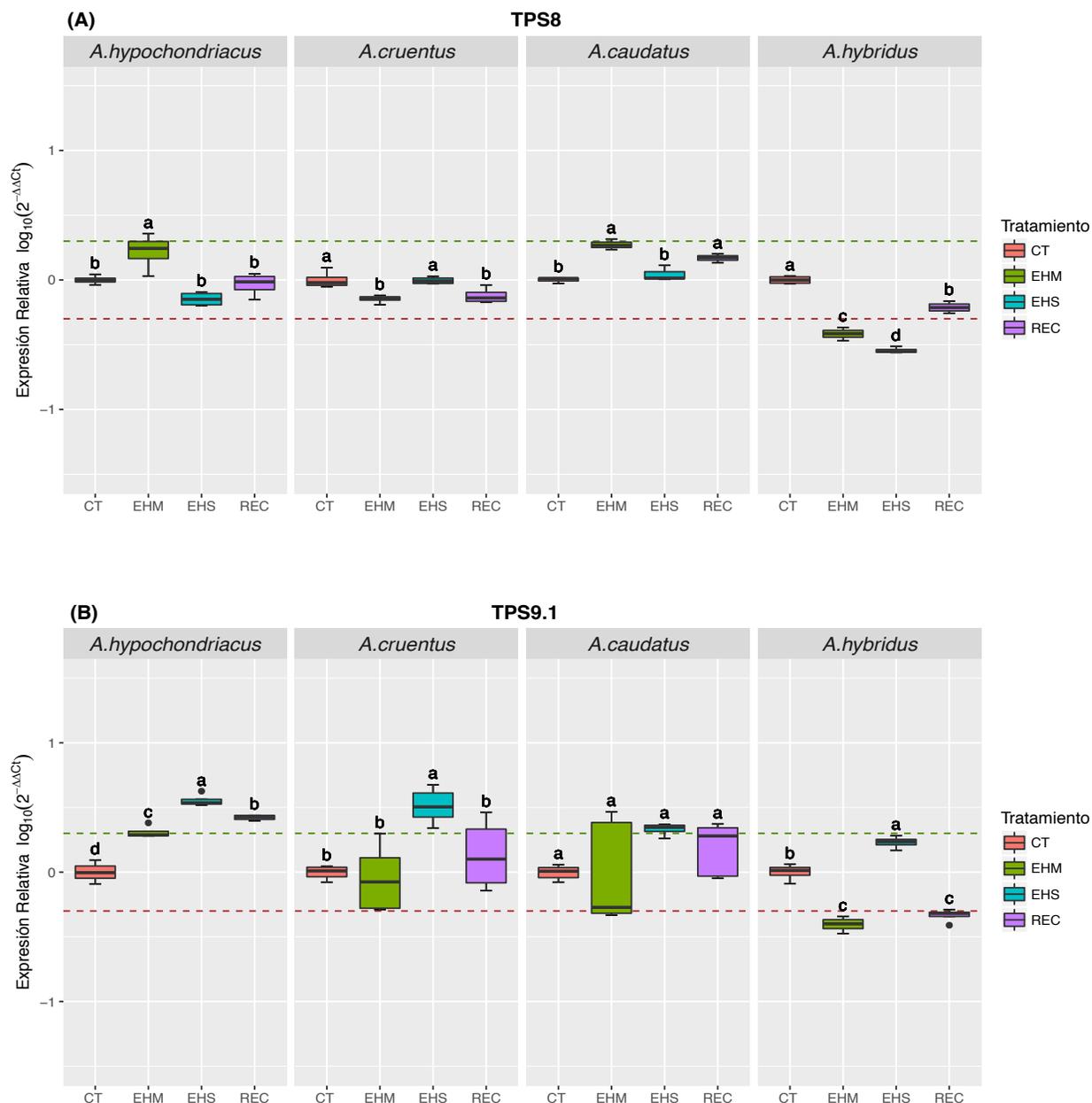
**Figura 5. Expresión relativa de genes codificantes para enzimas no catalíticas del metabolismo de trealosa en raíces de distintas especies de amaranto (I).** *Box-plots* de la abundancia de transcritos con identidad TPS Clase II: (A) TPS5.1 y (B) TPS5.2, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).



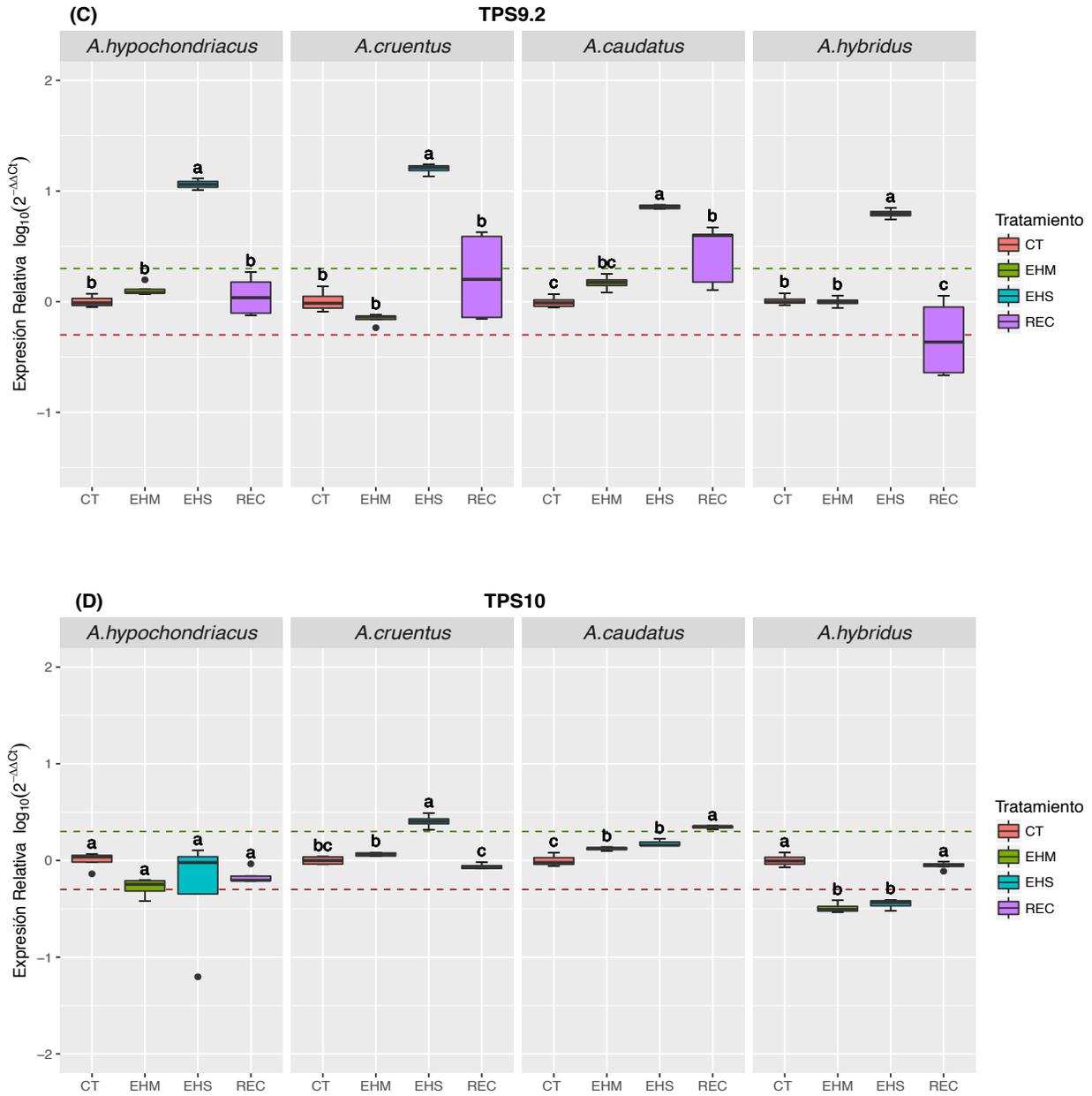
**Figura 5 (continuación). Expresión relativa de genes codificantes para enzimas no catalíticas del metabolismo de trealosa en raíces de distintas especies de amaranto (I).** *Box-plots* de la abundancia de transcritos con identidad TPS Clase II: (C) TPS6 y (D) TPS7, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

La abundancia de transcritos para la isoforma TPS8 en *A. hypochondriacus*, mostró un aumento significativo en estrés moderado, aunque por debajo del límite de inducción. En raíces de *A. cruentus* y *A. caudatus* se obtuvieron resultados similares a lo observado en hojas de las respectivas especies, ya que no hubo ni inducción ni represión de este gen bajo ninguna condición. Sin embargo, en este caso hubo diferencias significativas en sequía moderada y recuperación respecto a las plantas control. De la misma forma, tanto en hoja como en raíz, la TPS8 se reprimió en sequía moderada en *A. hybridus*, y para este órgano también se vio una mayor represión en estrés severo. En recuperación, la expresión fue menor a la unidad, pero no rebasó el límite de represión (Figura 6A). Notoriamente el patrón de expresión de TPS9.1 en raíces de amaranto, se asemejó a lo observado en hojas, ya que la abundancia de transcritos fue dependiente del grado de estrés aplicado, ya que bajo estrés severo se incrementó significativamente en todas las especies estudiadas. De modo que mostró una alta inducción en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, seguido de *A. caudatus* y, por debajo del umbral de inducción, *A. hybridus*. En sequía moderada los valores de expresión obtenidos se mantuvieron sin cambios en *A. cruentus* y *A. caudatus*, alcanzaron el límite de inducción en *A. hypochondriacus*, y disminuyeron hasta valores de represión en la especie *A. hybridus*. Para el caso de plantas recuperadas, la expresión se indujo en *A. hypochondriacus*, se reprimió en *A. hybridus* y permaneció estadísticamente igual al control en *A. cruentus* y *A. caudatus* (Figura 6B). Asimismo, la expresión de TPS9.2 fue claramente incrementada en estrés severo en todas las especies, principalmente en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, con valores de expresión relativa de 11.54 y 15.90, respectivamente, seguido de *A. caudatus* y *A. hybridus* con valores de 7.19 y 6.26, respectivamente. La sequía moderada no causó cambios significativos en ninguna especie; únicamente en *A. caudatus* los valores fueron estadísticamente parecidos a los obtenidos en plantas recuperadas. El resto de las especies, después del tratamiento de recuperación, no mostraron superar los umbrales de represión o inducción. Por ejemplo *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* permanecieron sin cambios, siendo que la primera se mantuvo igual al control y la segunda alcanzó valores por encima del umbral de inducción. *A. caudatus* y *A. hybridus* mostraron cambios respecto a plantas bien regadas, alcanzando valores en el rango de inducción y de represión respectivamente (Figura 6C). Finalmente, el gen TPS10 en *A. hypochondriacus* no cambió su expresión en ninguna condición de estrés. A su vez, *A. cruentus* elevó la cantidad de transcritos en estrés severo, mientras que

*A. caudatus* aumentó su expresión en estrés hídrico moderado y severo y se indujo en recuperación. Finalmente, este gen se reprimió en *A. hybridus* en sequía moderada y severa (Figura 6D).



**Figura 6. Expresión relativa de genes codificantes para enzimas no catalíticas del metabolismo de trealosa en raíces de distintas especies de amaranto (II).** Box-plots de la abundancia de transcritos con identidad TPS Clase II: (A) TPS8 y (B) TPS9.1, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).



**Figura 6 (continuación).** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas no catalíticas del metabolismo de trealosa en raíces de distintas especies de amaranto (II). *Box-plots* de la abundancia de transcritos con identidad TPS Clase II: (C) TPS9.2 y (D) TPS10, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

De la misma manera, fue cuantificada la expresión génica de las enzimas catalíticamente activas del metabolismo de trealosa en hojas y raíces de las cuatro especies de amaranto. La TPS1, que corresponde a la única sintasa con actividad catalítica reportada, mostró estar inducida en condiciones de recuperación en *A. caudatus* y *A. hybridus*, y no manifestó cambios en los demás tratamientos de las mencionadas especies. Por otro lado, en *A. hybridus* y *A. cruentus* este gen no sobrepasó ninguno de los límites de inducción o represión, excepto el tratamiento severo en *A. cruentus* (Figura 7A). También se cuantificaron las tres isoformas con identidad fosfatasa, la primera correspondiente a la TPPA, no mostró grandes cambios en hojas de amaranto. Por ejemplo, en la Figura 7B, se observa que la especie *A. hypochondriacus* bajo estrés hídrico moderado, alcanza el umbral de represión y en condiciones de recuperación el umbral de inducción, pero dichos cambios no son significativamente diferentes al control. Por su parte, en *A. cruentus*, los valores de expresión en plantas recuperadas se encuentran justamente en el límite de represión, más no lo superan. En *A. caudatus*, todos los tratamientos causaron un comportamiento similar para la abundancia de la TPPA, al igual que *A. hybridus*, pero mostrando valores por debajo del límite de represión únicamente en sequía moderada. La segunda TPP, que corresponde a la TPPD, mostró patrones similares entre *A. cruentus* y *A. caudatus*, aumentando su expresión en sequía moderada, pero sin llegar a valores de inducción, y disminuyendo su expresión en recuperación. Por otro lado, en *A. hypochondriacus* disminuyó su expresión en sequía severa y se reprimió en recuperación. En *A. hybridus*, llegó al límite de represión en estrés moderado y de inducción en severo (Figura 7C). La última isoforma, la TTPI no mostró estar inducida en ninguna especie bajo ningún tratamiento, pero se reprimió en estrés hídrico moderado y severo en *A. hypochondriacus* y *A. hybridus*, y en condiciones de recuperación en *A. cruentus* (Figura 7D). Finalmente, se midió la abundancia del único gen del catabolismo de trealosa, la trealasa o TRE. La abundancia del transcrito, apareció con alta variación en su expresión en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, principalmente bajo estrés severo. La primera, mostró valores desde el rango de inducción hasta el de represión, pero que no resultaron ser significativamente diferentes al control. A su vez, en *A. cruentus*, los valores variaron desde el umbral de represión hasta valores muy por debajo de este límite. La expresión relativa de TRE en *A. caudatus*, resultó ser menor a la unidad en sequía severa y moderada,

pero sin estar reprimida. Por último, *A. hybridus* se mantuvo sin cambios a pesar de los tratamientos de sequía aplicados (Figura 7E).

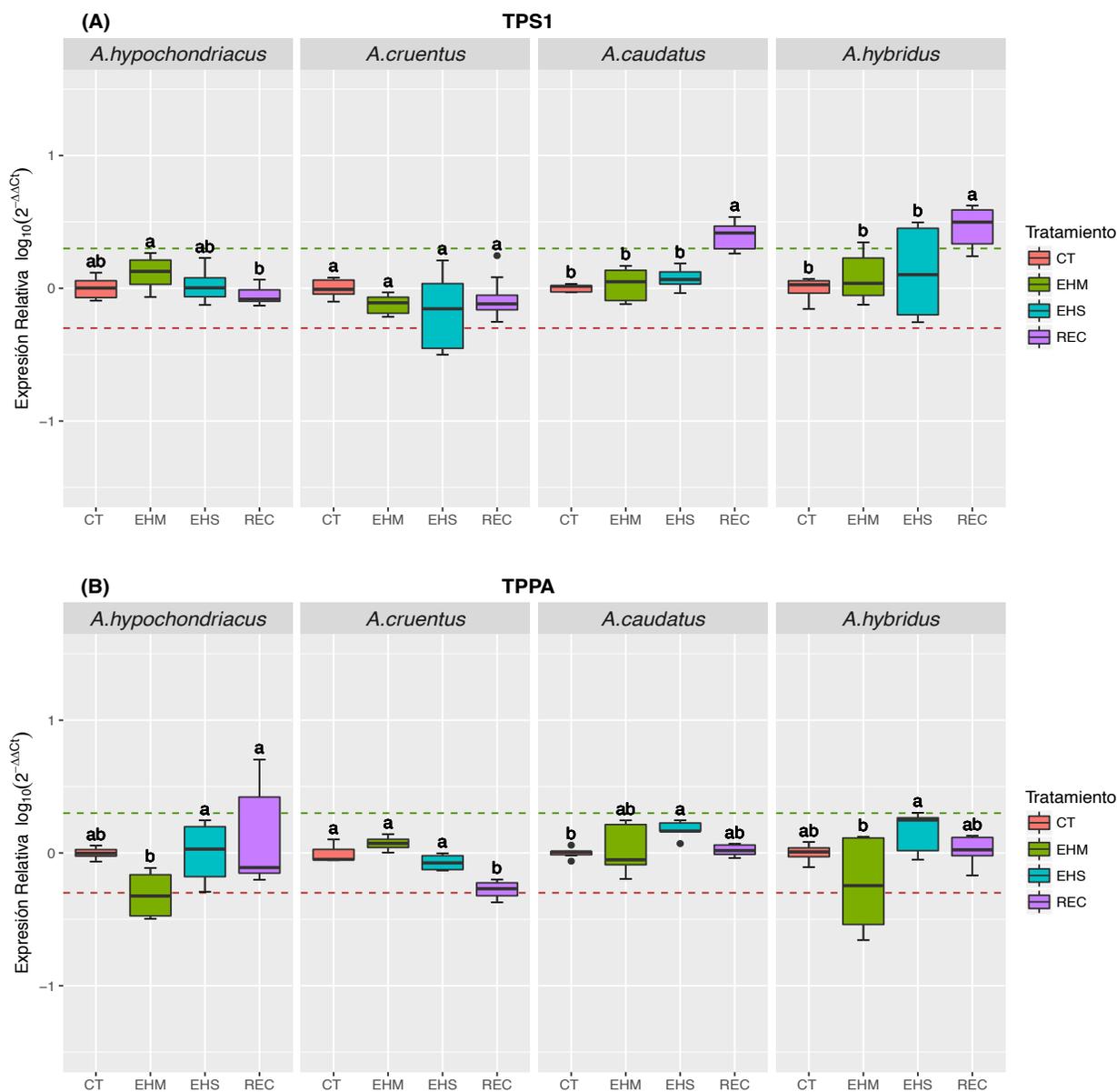
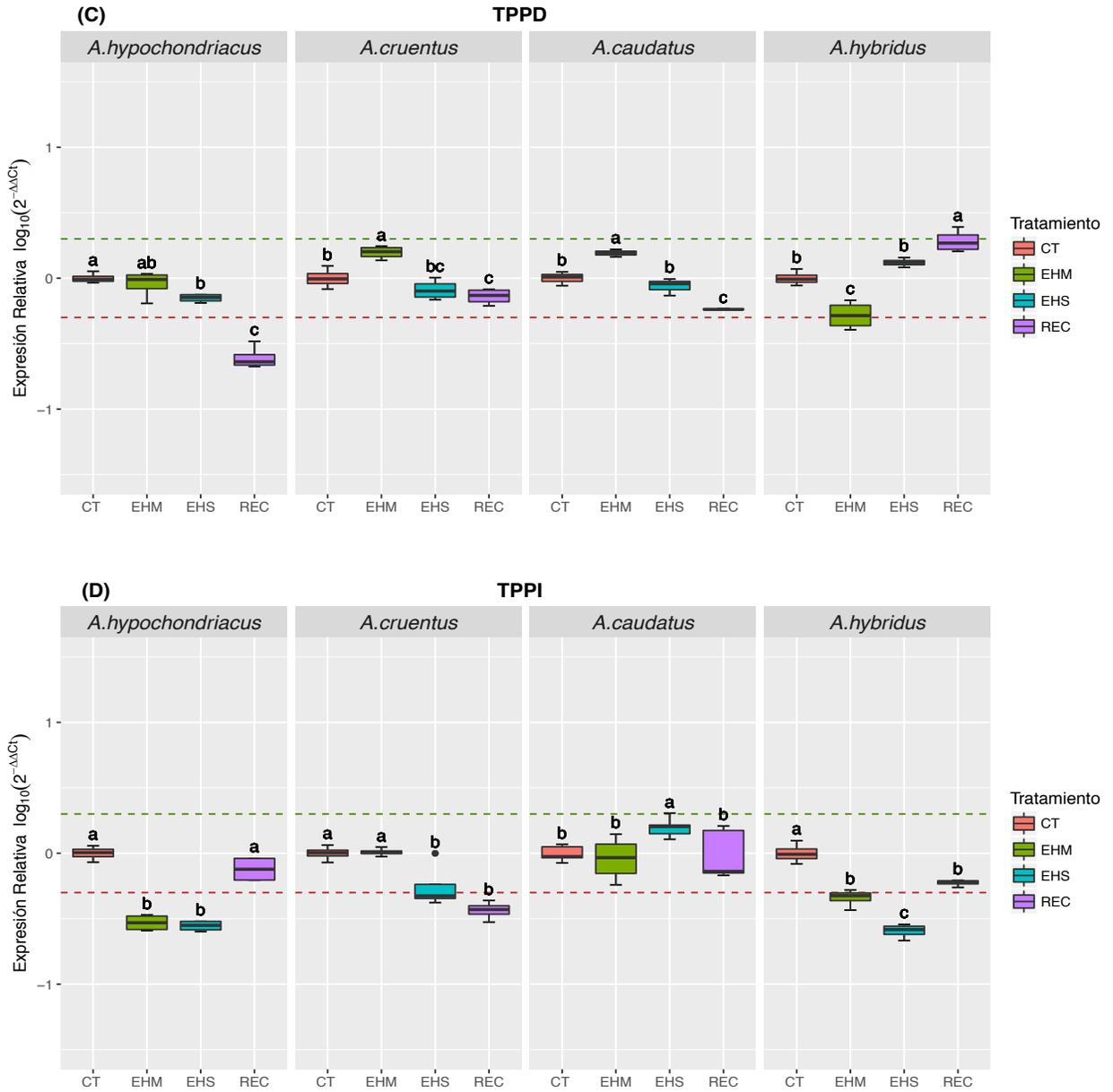
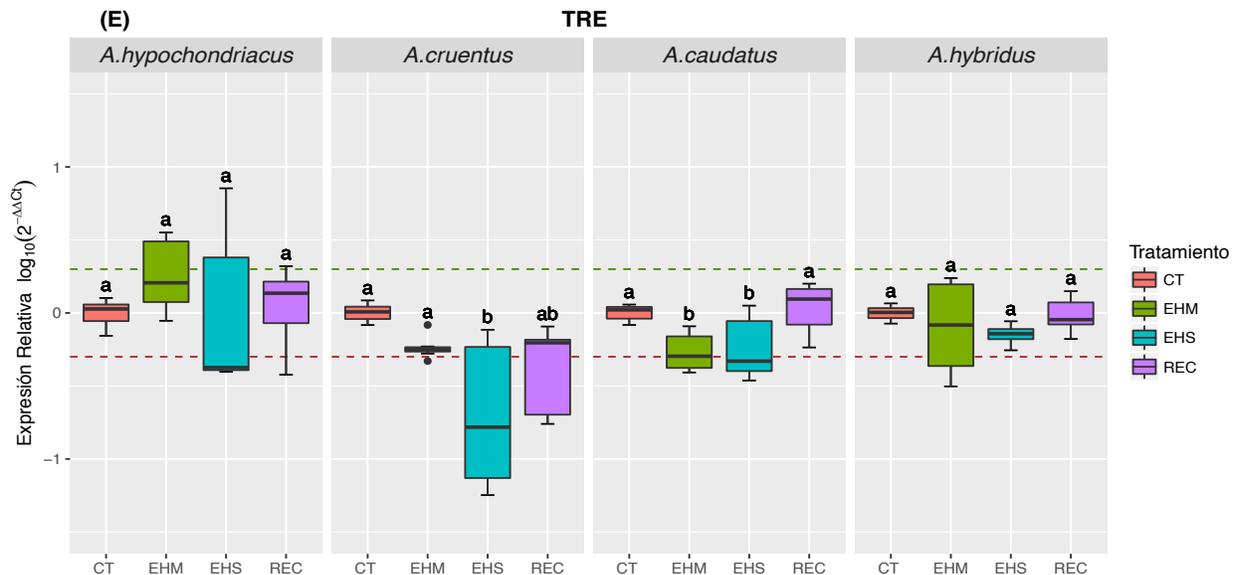


Figura 7. Expresión relativa de genes codificantes para enzimas catalíticas del metabolismo de trealosa en hojas de distintas especies de amaranto. *Box-plots* de la abundancia de transcritos de genes con identidad: (A) TPS1 y (B) TPPA, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).



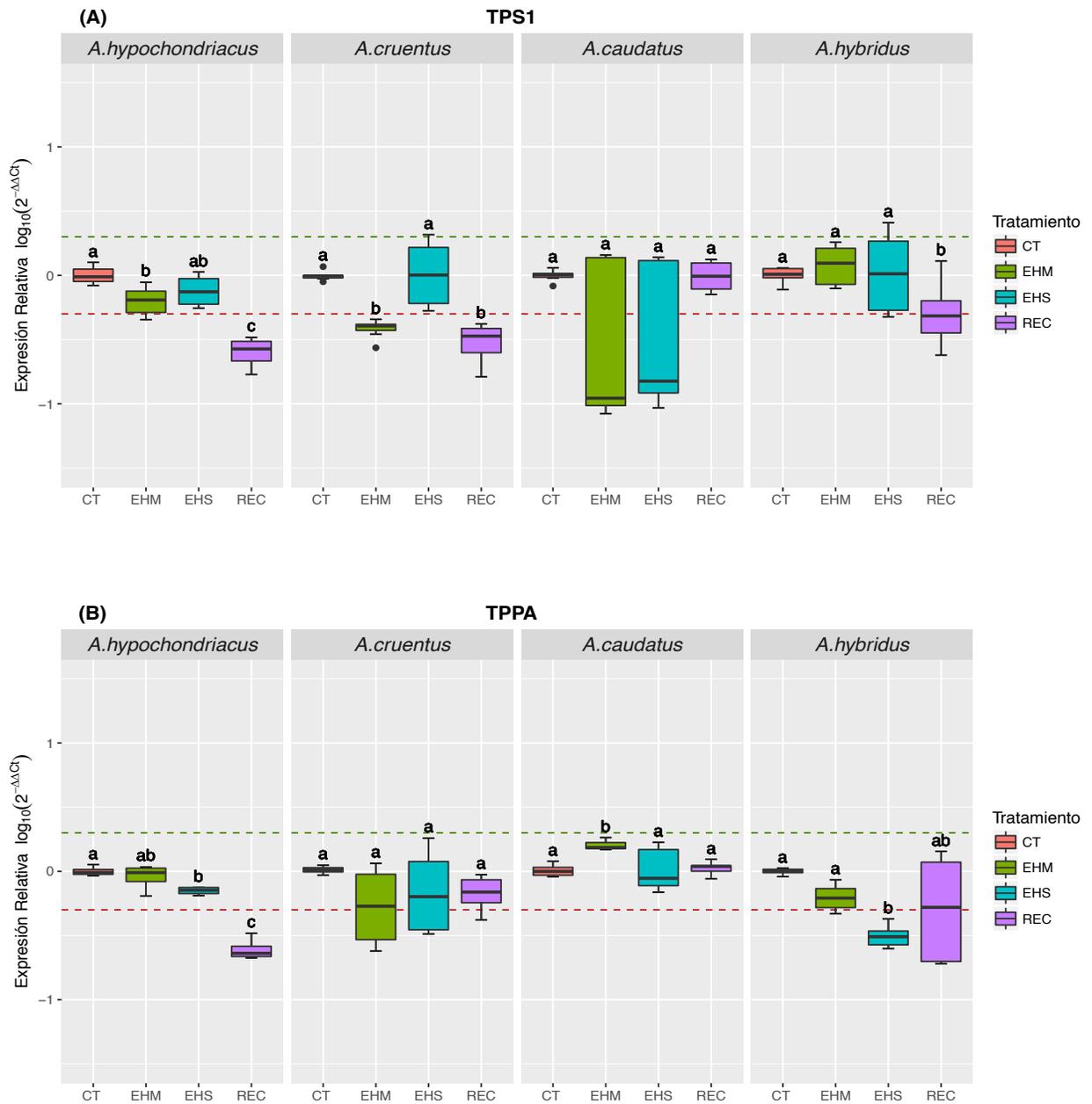
**Figura 7 (continuación). Expresión relativa de genes codificantes para enzimas catalíticas del metabolismo de trealosa en hojas de distintas especies de amaranto.** Box-plots de la abundancia de transcritos de genes con identidad: (C) TPPD y (D) TPPI, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).



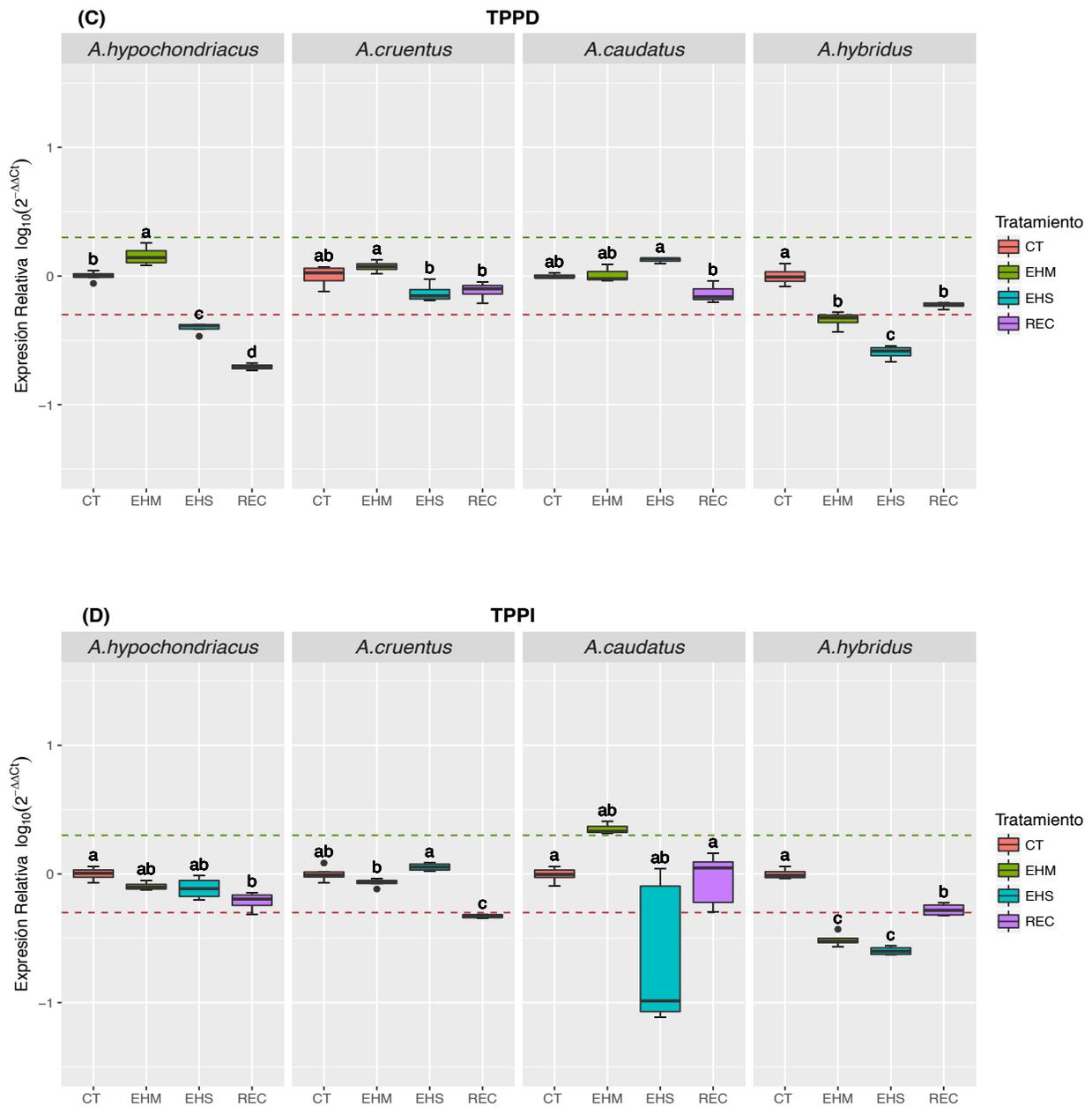
**Figura 7 (continuación).** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas catalíticas del metabolismo de trealosa en hojas de distintas especies de amaranto. *Box-plots* de la abundancia de transcritos de genes con identidad: (E) TRE, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n=8$ ).

Así también, las enzimas con actividad catalítica se cuantificaron en raíces de amaranto. El comportamiento de expresión observado para la sintasa TPS1 en raíces, fue distinto a lo ya descrito en hojas, puesto que *A. hypochondriacus* en este órgano sí mostró cambios, reprimiendo su expresión en recuperación. Igualmente, *A. cruentus* reprimió este gen en estrés moderado y recuperación. Para el caso de *A. caudatus*, se observó una gran variación en los resultados en sequía moderada y severa, y no cambió su expresión bajo condiciones de rehidratación. En *A. hybridus* los resultados fueron más parecidos a lo observado en hojas, excepto para el tratamiento de recuperación, ya que en éste caso los valores alcanzaron el umbral de represión (Figura 8A). La abundancia de transcritos en la especie *A. hypochondriacus* para la fosfatasa TPPA, disminuyó en estrés severo, pero no sobrepasó el límite de represión. En cambio, alcanzó valores debajo de este límite en recuperación. Aunque en *A. cruentus* el estrés no afectó el comportamiento del gen, la sequía moderada y severa resultó en valores sobre el límite de represión. En el caso de *A.*

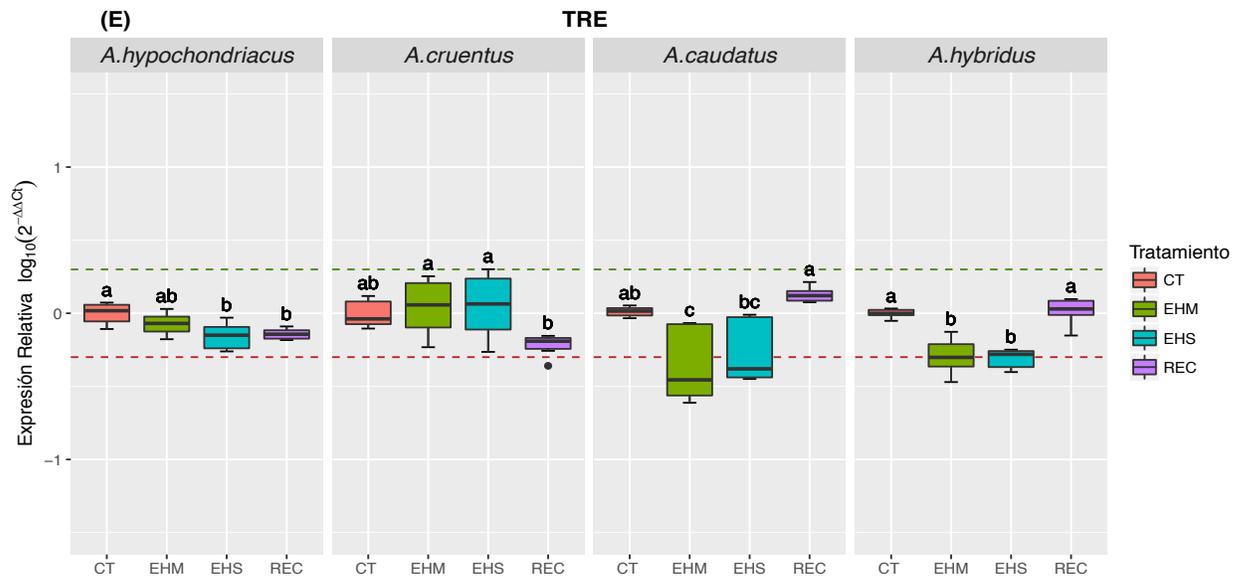
*caudatus*, sí se conservó el patrón observado en hoja, puesto que ningún tratamiento ocasionó la inducción o represión de este gen. TPPA en *A. hybridus* se reprimió en sequía severa y estuvo en ese límite bajo recuperación (Figura 8B). Para la isoforma TPPD se observaron resultados similares entre órganos, ya que en *A. hypochondriacus* la expresión se reprimió bajo recuperación, pero en este caso también en sequía severa. A su vez, en sequía moderada hubo un ligero aumento que sí fue significativo respecto al control. *A. cruentus* y *A. caudatus* mostraron el mismo comportamiento en raíz, pues no hubo inducción o represión de este gen. Para el caso de *A. hybridus*, la expresión de TPPD disminuyó en estrés moderado y aún más en severo (Figura 8C). De la misma forma, la expresión relativa de la TPPI se vio afectada por los tratamientos de sequía. De modo que la especie *A. cruentus* reprimió ligeramente su expresión en plantas rehidratadas y se indujo bajo estrés severo en *A. caudatus*. En esta misma especie, los valores obtenidos en estrés severo fueron muy variables llegando hasta muy por debajo del umbral de represión. Esta isoforma en la especie *A. hybridus*, también se reprimió en sequía moderada y severa, como ya se había observado en hojas (Figura 8D). Finalmente, para el gen TRE, se observaron patrones parecidos entre *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, y entre *A. caudatus* y *A. hybridus*. Las dos primeras especies, consideradas como tolerantes en este estudio, no mostraron inducir o reprimir este gen bajo ninguna condición de estrés, aunque las plantas recuperadas disminuyeron su expresión mostrando valores menores a uno. Por su parte, *A. caudatus* y *A. hybridus*, consideradas susceptibles, alcanzaron el límite de represión en sequía moderada y severa, pero sin sobrepasar este umbral (Figura 8E).



**Figura 8.** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas catalíticas del metabolismo de trealosa en raíces de distintas especies de amaranto. *Box-plots* de la abundancia de transcritos de genes con identidad: **(A)** TPS1 y **(B)** TPPA, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).



**Figura 8 (continuación).** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas catalíticas del metabolismo de trealosa en raíces de distintas especies de amaranto. Box-plots de la abundancia de transcritos de genes con identidad: (C) TPPD y (D) TPPI, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).



**Figura 8 (continuación). Expresión relativa de genes codificantes para enzimas catalíticas del metabolismo de trealosa en raíces de distintas especies de amaranto.** Box-plots de la abundancia de transcritos de genes con identidad: (E) TRE, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

## 7.5 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES CODIFICANTES DE ENZIMAS DEL METABOLISMO DE RFO

De todos los genes estudiados en este trabajo, aquellos relacionados con la síntesis de oligosacáridos de la familia de la rafinosa fueron los que mostraron mayores cambios. En general, se encontraron patrones de expresión muy claros, que fueron dependientes del órgano, de la especie y del grado de estrés al que estuvieron sometidas las plantas de amaranto.

Por ejemplo, el primero de los genes de esta ruta biosintética, el gen GOLS1, fue altamente inducido bajo condiciones de escasez de agua en hojas y raíces de amaranto y no mostró cambios significativos en plantas recuperadas. Patrones similares a GOLS1 fueron observados en algunos de los otros genes. Sin embargo, el grado de inducción no fue tan notorio y hubo mayor variación entre órganos y especies.

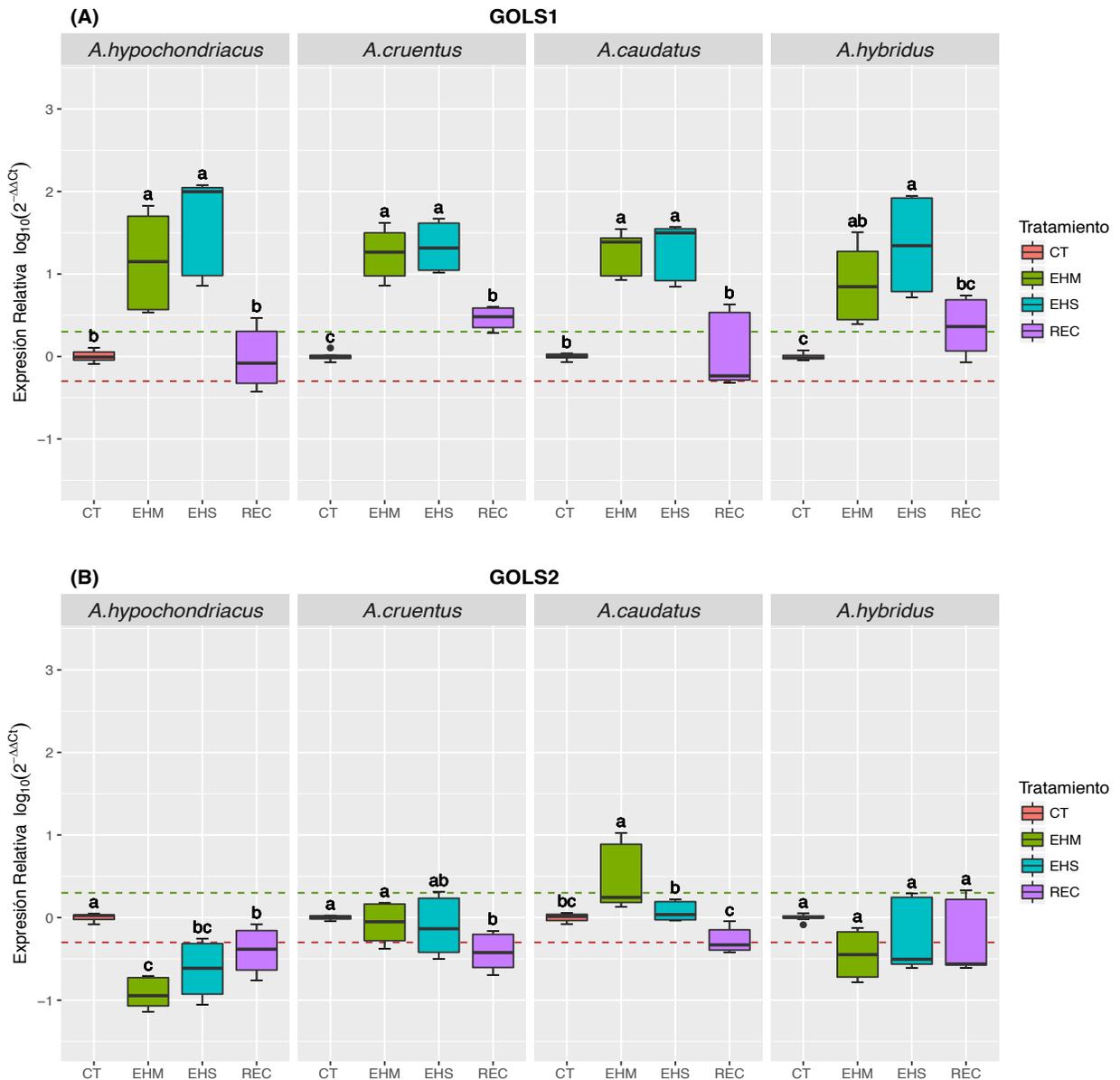
Primeramente, en hojas de *A. hypochondriacus*, para el gen GOLS1, se obtuvieron valores de expresión relativa de 29.10 y 66.82 para estrés moderado y severo, respectivamente. En *A. cruentus*, 13.03 en estrés moderado y 26.33, en estrés severo. En *A. caudatus*, 20.21 y 23.29, y en *A. hybridus*, 11.69 y 44.19, para estrés moderado y severo, respectivamente. En todas las especies, el tratamiento de recuperación no causó cambios significativos respecto a plantas control (Figura 9A).

Así también, se cuantificó la abundancia de transcritos para el gen GOLS2 en hojas, la cual no mostró un patrón conservado entre las especies en comparación la isoforma 1. En *A. hypochondriacus*, este gen se encontró significativamente reprimido en estrés hídrico moderado, por debajo del umbral de represión en estrés severo y sobre el límite de represión en condiciones de recuperación. *A. cruentus* no mostró cambios significativos en estrés moderado y severo; éstos se observaron sólo en recuperación. Por otra parte, *A. caudatus* alcanzó valores que sobrepasaron el límite de inducción en estrés moderado, no mostró cambios en estrés severo y se encontró en el límite de represión en recuperación. *A. hybridus* no mostró cambios significativos en la expresión de este gen bajo ningún tratamiento (Figura 9B).

En el gen RAFS, se observó que en las especies tolerantes *A. hypochondriacus* y *A. hybridus* hubo una mayor inducción de este gen, principalmente en sequía severa y en menor medida en sequía moderada. Para la primera especie mencionada, se obtuvieron valores en promedio de 11.41 y 4.67, y para la segunda especie de 7.81 y 2.37, para estrés severo y moderado, respectivamente. Del mismo modo, en estrés hídrico moderado y severo hubo cambios en la abundancia de transcritos de RAFS para las especies susceptibles *A. caudatus* y *A. hybridus*. Alcanzando valores de expresión de 2.35 para estrés severo y 2.86 para moderado, en *A. caudatus*, y de 4.17 y 4.52, en *A. hybridus*. Curiosamente, estas especies alcanzaron valores más altos bajo estrés moderado que en estrés severo (Figura 9C).

Para el caso de la STCS en hojas, no se observaron grandes cambios en la abundancia de transcritos. Únicamente en condiciones de recuperación la expresión fue significativamente menor en *A. cruentus* y *A. caudatus*, viéndose mayormente reprimida en

estas dos especies. Y aunque en algunos casos sobrepasó el límite de represión, este cambio no fue estadísticamente importante respecto al control (Figura 9D).



**Figura 9. Expresión relativa de genes codificantes para enzimas del metabolismo de RFO en hojas de distintas especies de amaranto.** Box-plots de la abundancia de transcritos de genes: (A) GOLS1 y (B) GOLS2, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

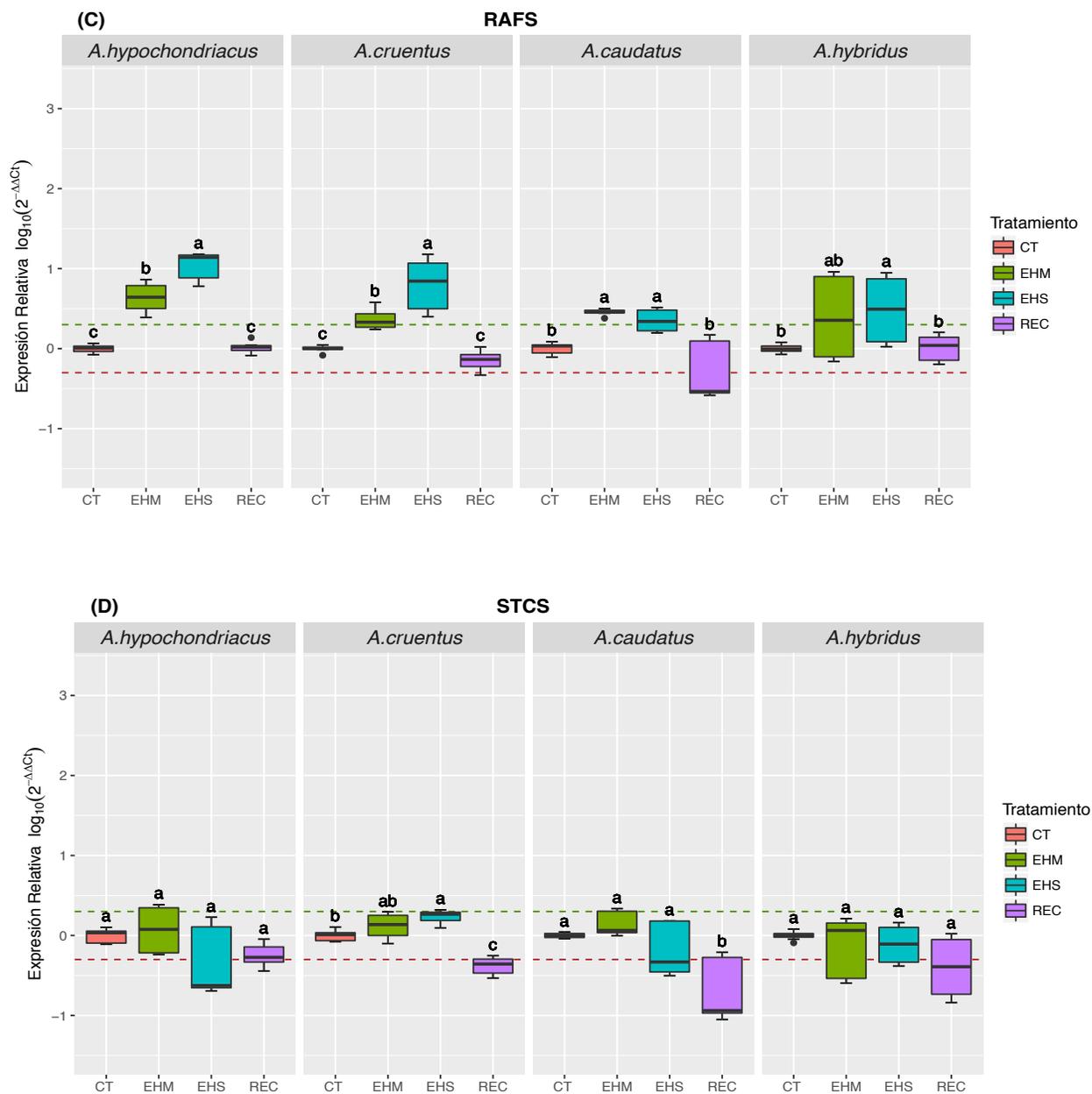


Figura 9 (continuación). Expresión relativa de genes codificantes para enzimas del metabolismo de RFO en hojas de distintas especies de amaranto. *Box-plots* de la abundancia de transcritos de genes: (C) RAFS y (D) STCS, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

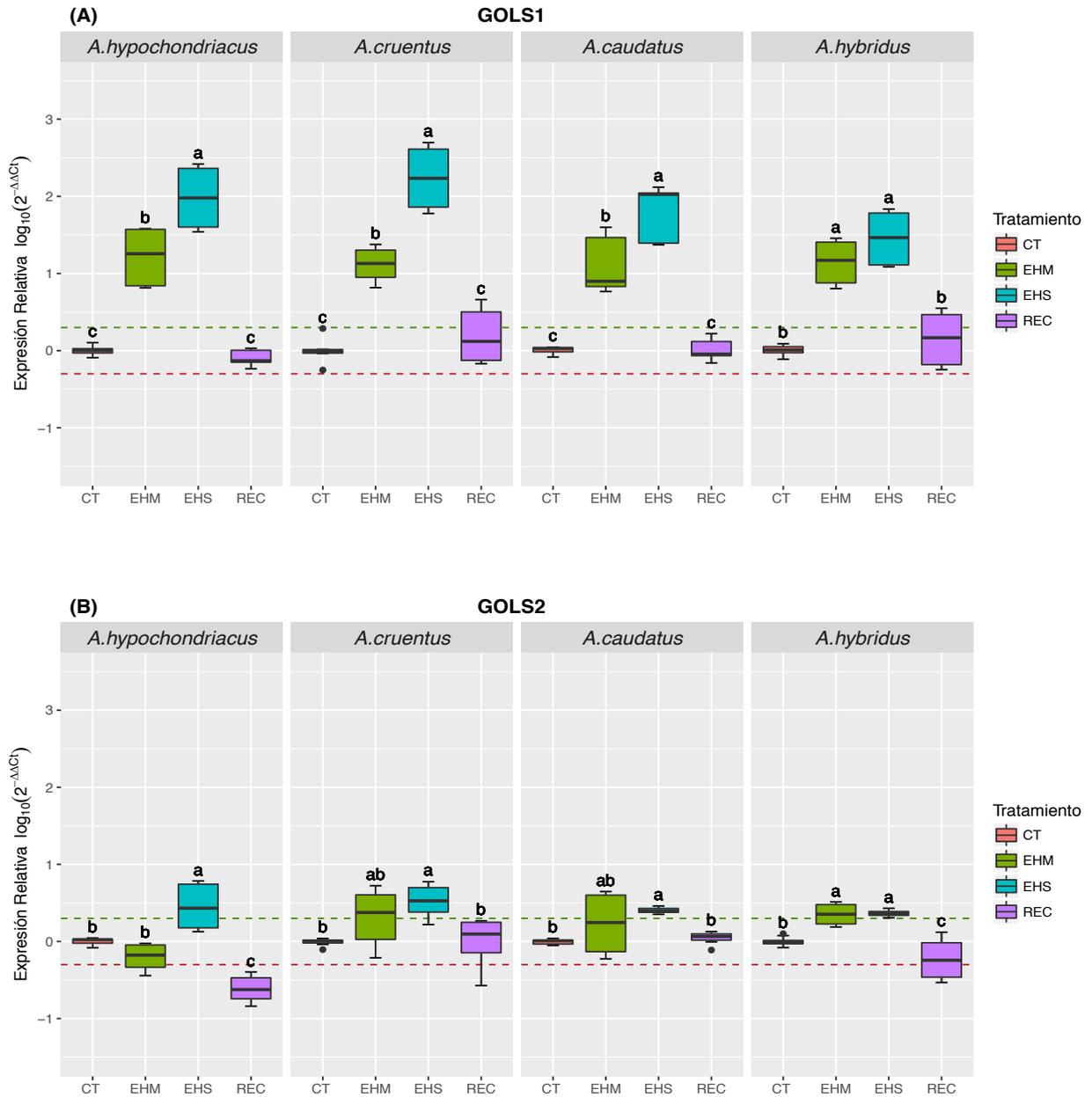
De igual forma, la expresión relativa de los genes del metabolismo de RFO en raíces de amaranto, fue altamente afectada por los tratamientos estudiados. Interesantemente, las especies tolerantes mostraron valores de inducción mayores en condiciones de estrés severo en los genes GOLS1, GOLS2 y RAFS comparado con las especies susceptibles. Tal es el caso de *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* que para GOLS1, aumentaron su expresión 136.74 y 248.85 veces más en sequía severa, respectivamente. En comparación, *A. caudatus* y *A. hybridus* aumentaron su expresión 75.93 y 37.69 veces más, respectivamente. Este mismo gen bajo sequía moderada, alcanzó un promedio de expresión relativa de 22.20 para *A. hypochondriacus*, 14.75 para *A. cruentus*, 18.0 para *A. caudatus* y 17.0 para *A. hybridus*. GOLS1 no mostró cambios significativos en su expresión en ninguna de las especies en condiciones de recuperación (Figura 10A).

Para el caso de GOLS2, en sequía severa, *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* alcanzaron valores de 3.47 y 3.67, respectivamente. Mientras que la expresión relativa fue de 2.53, en *A. caudatus*, y de 2.32 en *A. hybridus*. La sequía moderada en *A. hypochondriacus* causó que la expresión de GOLS2 se encontrara por debajo de la unidad, pero sin mostrar cambios significativos respecto al control, mientras que bajo condiciones de recuperación se observó la represión de este gen. En *A. cruentus*, la expresión de GOLS2 aumentó en estrés hídrico moderado alcanzando valores que sobrepasaron el límite de inducción, y no mostró cambios en recuperación. *A. caudatus* y *A. hybridus* también modificaron su expresión en estrés moderado. No obstante, en la segunda especie, este cambio sí fue significativo mostrando valores que superaron el umbral de inducción. Igualmente, en *A. hybridus*, GOLS2 disminuyó su expresión y alcanzó valores por debajo del umbral de represión (Figura 10B).

De la misma manera, RAFS mostró patrones de expresión muy claros, ya que en sequía severa *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* manifestaron una mayor inducción comparada con *A. caudatus* y *A. hybridus*. Los valores fueron 14.98, 15.19 y 5.42, 1.40, respectivamente. En sequía moderada, *A. hypochondriacus* indujo la expresión de RAFS 3.42 veces, mientras que no cambió su expresión en recuperación. A su vez, *A. cruentus*, no mostró cambios en sequía moderada ni recuperación. *A. caudatus* alcanzó valores que sobrepasaron los límites de inducción y represión en estrés moderado, y en recuperación,

respectivamente, mientras que *A. hybridus* modificó su expresión en estrés moderado, alcanzando valores de 3.69 y valores en el límite de represión, en recuperación (Figura 10C).

Por último, la STCS, contrario a lo visto en hojas, mostró patrones de expresión claros en raíces, donde aumentó su expresión en sequía moderada y severa en la mayoría de las especies. Por ejemplo, en *A. hypochondriacus* la abundancia de transcritos en estrés moderado mostró un aumento respecto al control de aproximadamente 2.9 veces, mientras que en estrés severo aumentó alrededor de 6.21 veces, y en recuperación no cambió su expresión. En *A. cruentus*, a pesar de que se observaron valores que sobrepasaron el límite de inducción para sequía moderada y severa, estos cambios no representaron diferencias significativas respecto a plantas control. De igual forma, no se observaron cambios en condiciones de recuperación. Para *A. caudatus*, hubo un aumento de expresión en estrés hídrico moderado y severo, con valores de 5.52 y 5.08, respectivamente. Finalmente, *A. hybridus* también aumentó su expresión en ambos tratamientos de sequía, siendo que en moderado mostró valores de 2.94 y, en severo, de 2.75 (Figura 10D).



**Figura 10. Expresión relativa de genes codificantes para enzimas del metabolismo de RFO en raíces de distintas especies de amaranto.** *Box-plots* de la abundancia de transcritos de genes: **(A)** GOLS1 y **(B)** GOLS2, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

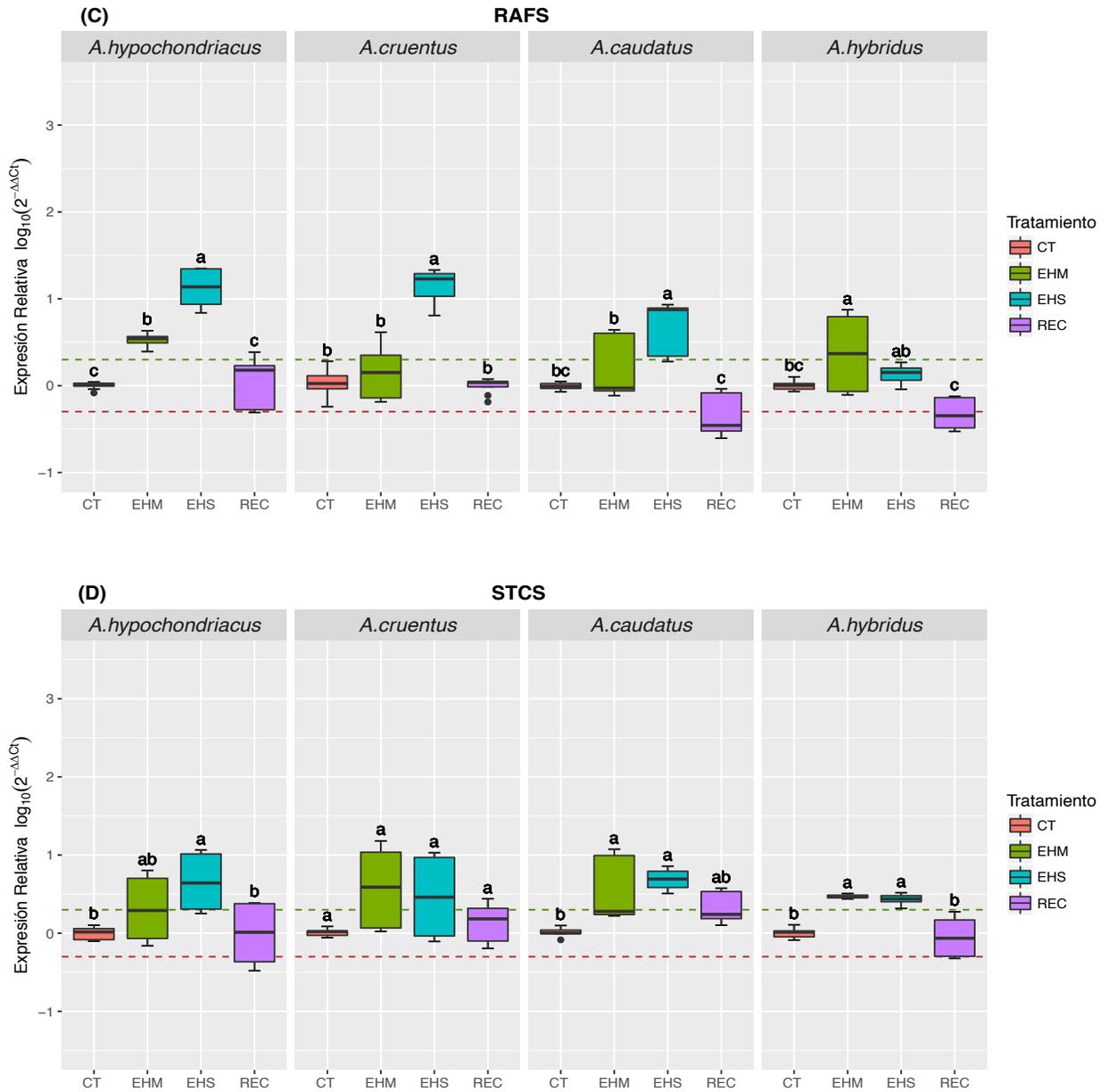


Figura 10 (continuación). Expresión relativa de genes codificantes para enzimas del metabolismo de RFO en raíces de distintas especies de amaranto. *Box-plots* de la abundancia de transcritos de genes: (C) RAFS y (D) STCS, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

## 7.6 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS AL METABOLISMO DEL ÁCIDO ABSCÍSICO

La abundancia relativa de los transcritos asociados con ABA, usados como marcadores de estrés hídrico, también se vio afectada por los distintos tratamientos de sequía en las distintas especies utilizadas en este trabajo.

En hojas de la especie tolerante *A. hypochondriacus*, se encontraron patrones de expresión muy claros en todos los genes asociados a ABA, ya que a excepción de *RAB18*, todos mostraron estar inducidos en sequía severa. Por ejemplo, la expresión relativa de *ABI5* bajo estrés hídrico moderado y recuperación se observó para ambos casos en el umbral de inducción, mientras que lo superó en sequía severa con un promedio de expresión relativa de 3 (Figura 11A). En el caso de *RAB18*, no hubo cambios bajo ninguna condición de estrés (Figura 11B). De igual forma, *DREB2C* mostró una alta inducción en todos los tratamientos, alcanzando valores de 5.3 para estrés moderado, de 8.75 para estrés severo y en recuperación, de 3.86 (Figura 11C). *LEA14* también manifestó el mismo patrón, aumentando su expresión aproximadamente 21 veces más bajo estrés moderado, 56 bajo estrés severo y disminuyendo su expresión hasta aproximadamente 5.8 veces más que el control, en recuperación (Figura 11D).

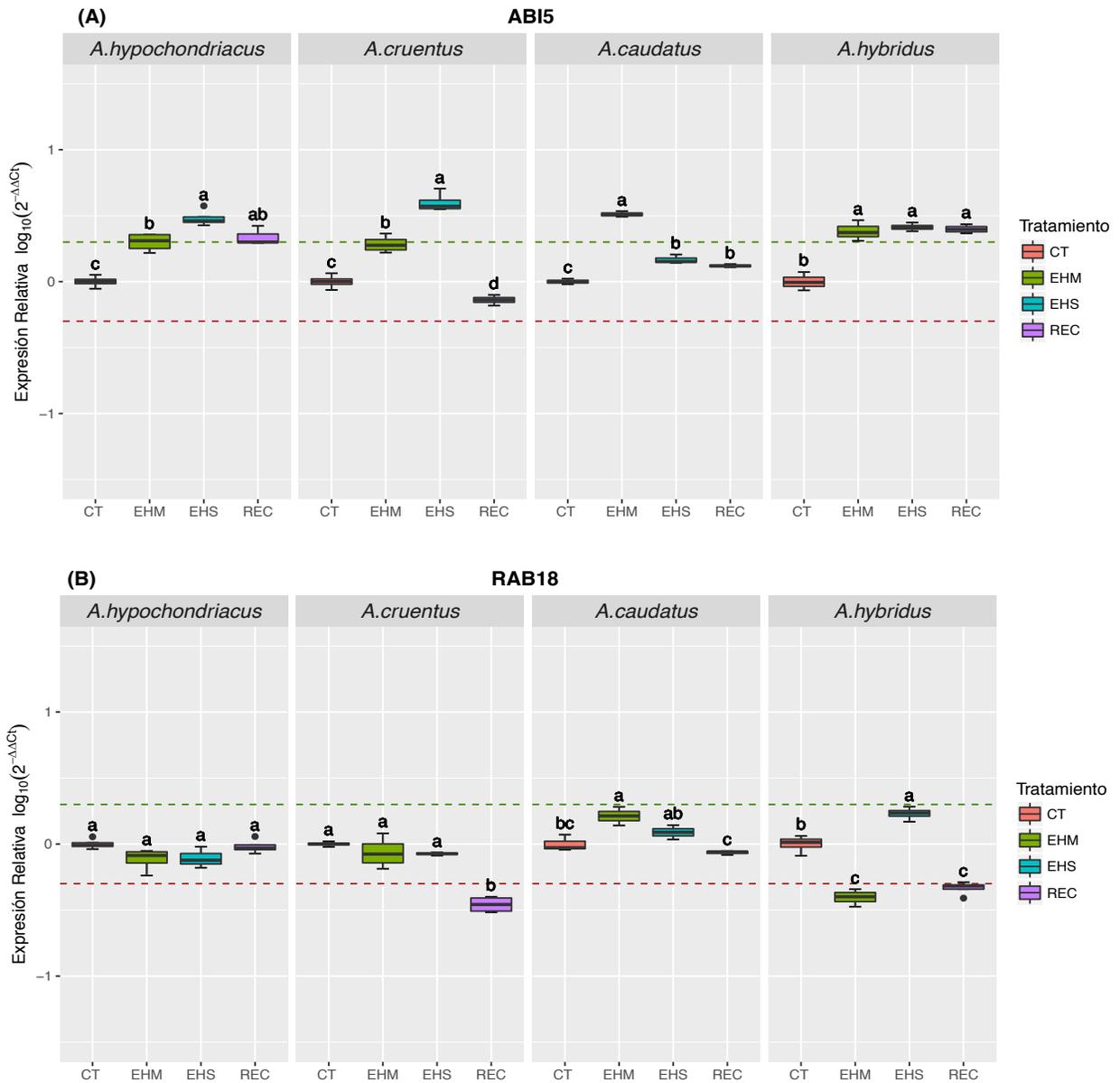
Por otro lado, en *A. cruentus* también se observó que en sequía moderada los valores de expresión para *ABI5*, se encontraron en el límite de inducción y lo superaron bajo estrés severo hasta 4 veces más que el control. Dicha inducción disminuyó bajo condiciones de recuperación hasta valores menores a 1. En hojas de *A. caudatus*, la expresión de este gen aumentó claramente en estrés moderado (3.24 veces) superando el límite de inducción, y estando por debajo de éste en estrés severo y recuperación. Los cambios en la expresión de *ABI5* observados en *A. hybridus* fueron iguales en todas las condiciones, estando por encima del límite de inducción (Figura 11A).

Para el caso del gen *RAB18* en hojas de amaranto, no se observaron cambios tan notables en ninguna de las especies estudiadas. Sin embargo, *A. cruentus* reprimió este gen en recuperación, al igual que *A. hybridus*. En esta última especie, también se detectó la represión de este gen marcador en sequía moderada. Aunque no hubo inducción en estas

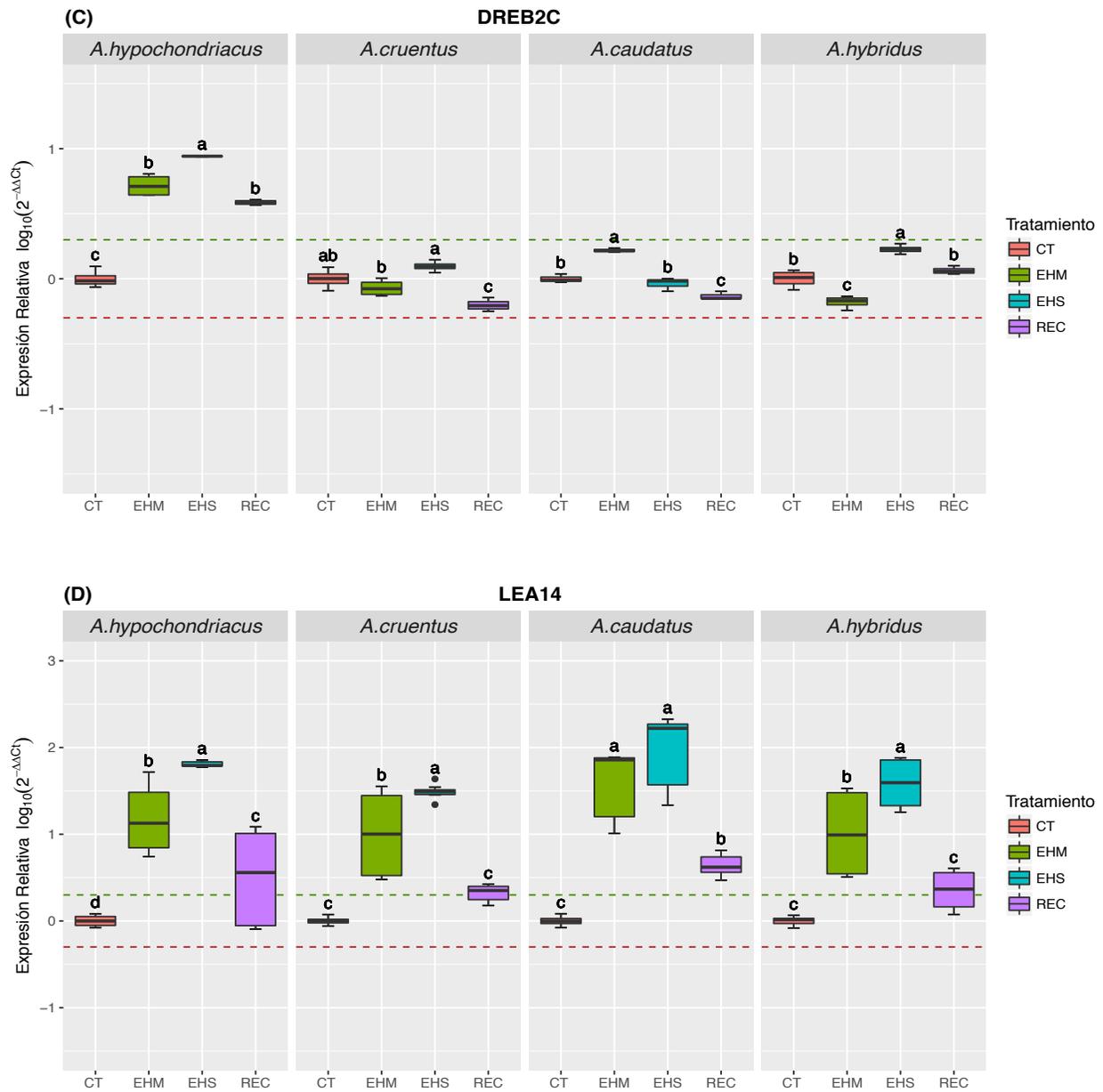
dos últimas especies, *A. caudatus* aumentó ligeramente su expresión en estrés moderado y *A. hybridus* en severo, siendo ambas estadísticamente distintas al control (Figura 11B).

Igualmente, *DREB2C* no superó ninguno de los límites de inducción o represión en *A. cruentus*, *A. caudatus* y *A. hybridus*, aunque sí mostró diferencias estadísticas en algunos tratamientos. Por ejemplo, en *A. cruentus* la expresión de este gen fue menor a la unidad en condiciones de recuperación, mientras que en *A. caudatus* hubo un incremento en estrés moderado y una disminución en recuperación. Finalmente, disminuyó en sequía moderada y aumentó en sequía severa, en *A. hybridus* (Figura 11C).

Finalmente, es muy interesante notar que el comportamiento de *LEA14* no sólo está conservado entre todas las especies estudiadas, sino que también mostró ser dependiente de los tratamientos a los que fueron sometidas las plantas, habiendo un aumento de expresión conforme mayor fue la sequía, y disminuyendo su expresión en condiciones de recuperación hasta casi valores de plantas control. En la Figura 11D, se puede observar que la abundancia de transcritos se incrementó muy por encima del límite de inducción en estrés moderado en *A. hypochondriacus*, *A. cruentus*, *A. caudatus* y *A. hybridus*, alcanzando un promedio de valores de 21.2, 16.5, 49.0 y 16.0, respectivamente. Así también para estrés severo, valores de expresión relativa de este gen en las mencionadas especies fueron de 56.46, 31.39, 120.85, 46.50, respectivamente. Aunque aún inducidos, éstos se redujeron en condiciones de recuperación, a valores de 5.83, 2.13, 4.55 y 2.53, para las respectivas especies.



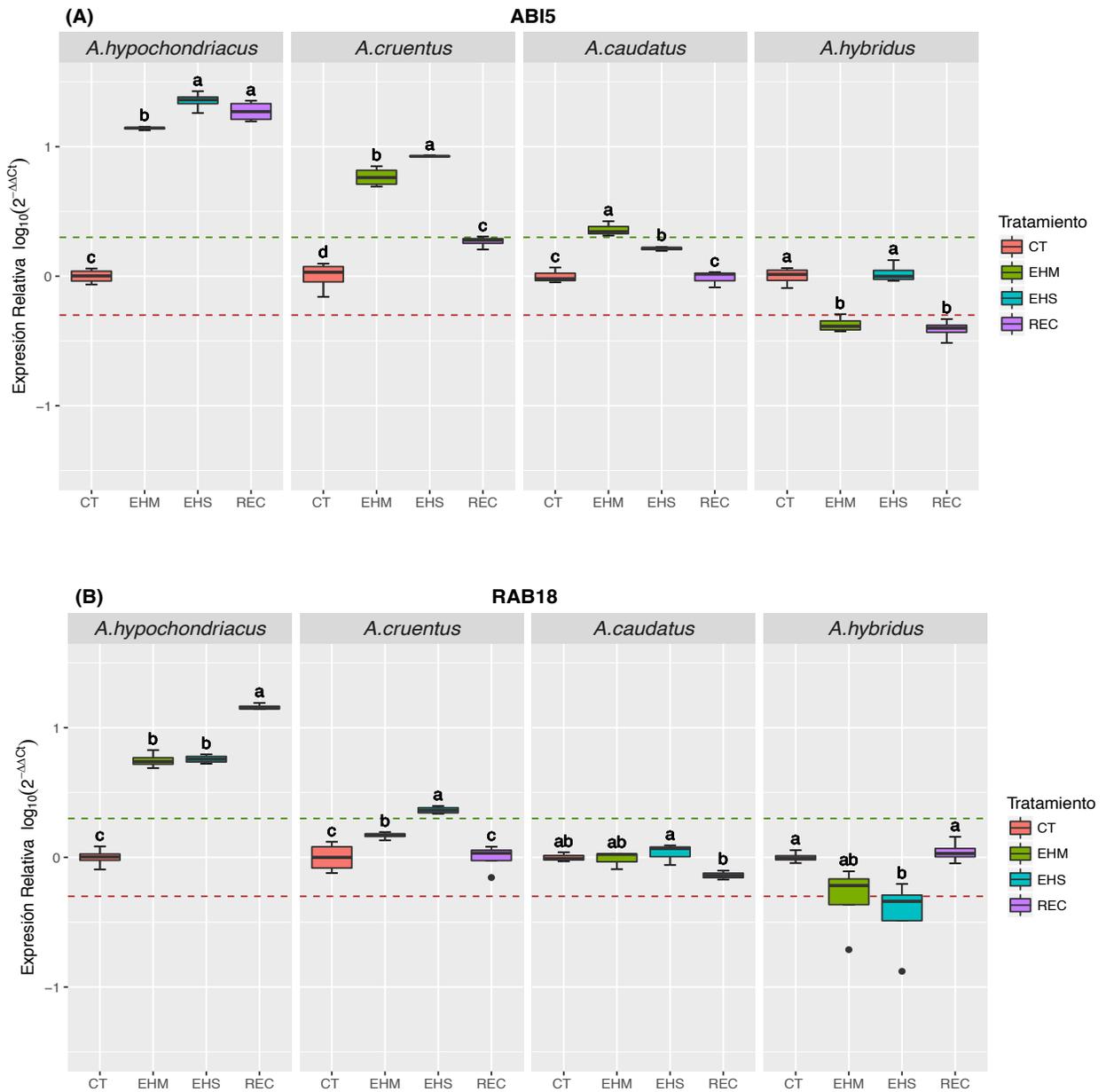
**Figura 11. Expresión relativa de genes relacionados con el ácido abscísico en hojas de distintas especies de amaranto. Box-plots de la abundancia de transcritos de genes asociados a ABA: (A) ABI5 y (B) RAB18, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).**



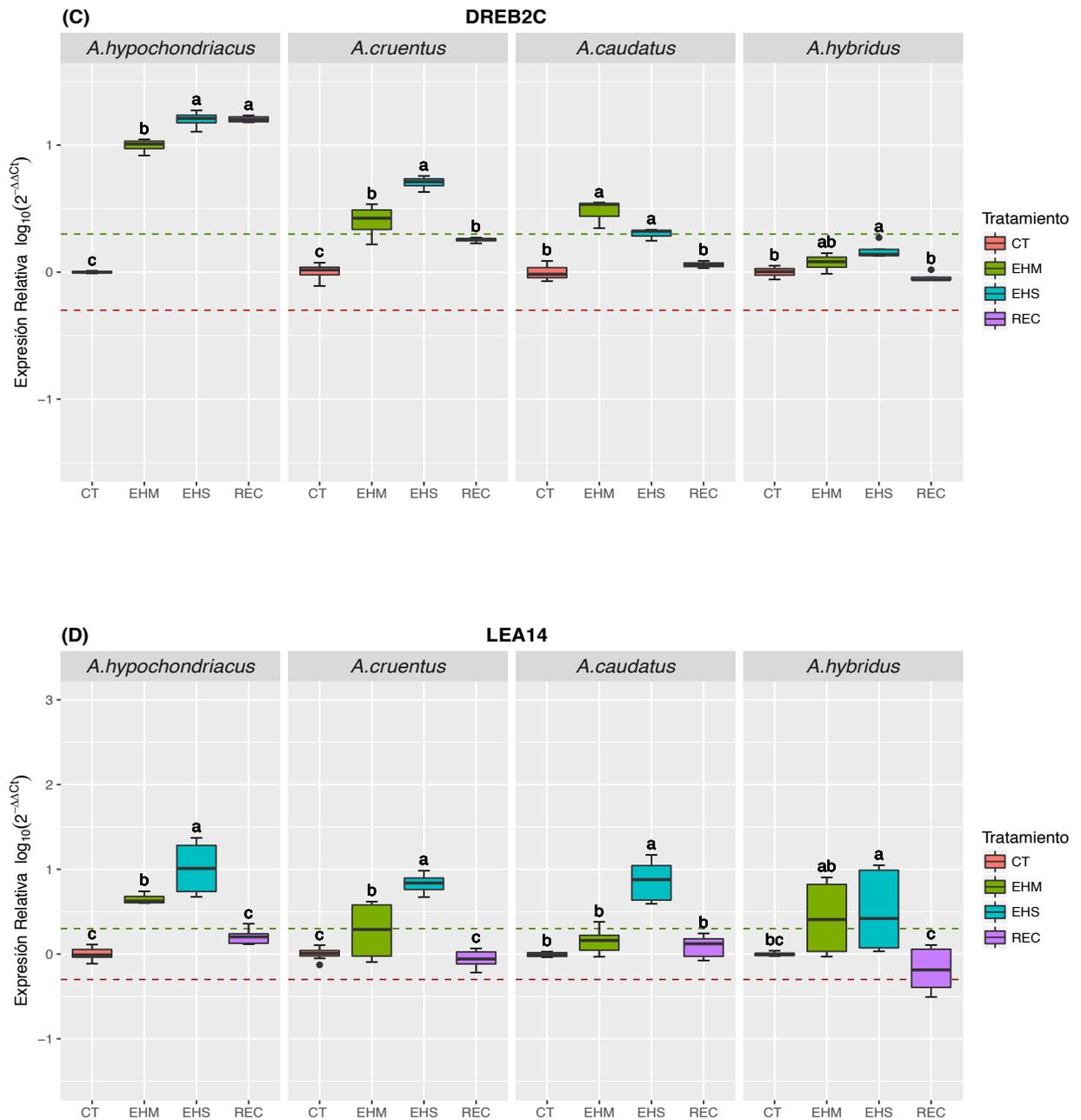
**Figura 11 (continuación).** Expresión relativa de genes relacionados con el ácido abscísico en hojas de distintas especies de amaranto. *Box-plots* de la abundancia de transcritos de genes asociados a ABA: **(C)** DREB y **(D)** LEA14, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

Por otro lado, estos mismos genes fueron cuantificados en raíces de amaranto, donde también se observaron comportamientos similares a las hojas. La inducción de *ABI5* en las especies tolerantes *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* fue dependiente del grado de estrés, ya que, en estrés severo, hubo una mayor inducción que en los otros tratamientos. Sin embargo, los niveles de expresión fueron más altos en la primera especie. En estrés moderado, ambas especies mostraron una elevada tasa de inducción, que fue, una vez más, mayor en *A. hypochondriacus*. Curiosamente, bajo recuperación, estos niveles se mantuvieron altos para esta especie, mientras que para *A. cruentus* disminuyeron por debajo del umbral de inducción. El comportamiento de las especies susceptibles, *A. caudatus* y *A. hybridus*, no mostró parecido a las especies tolerantes ni tampoco se encontraron patrones entre ellas. En raíces de *A. caudatus*, se obtuvo el patrón ya observado en hojas, donde hubo una inducción de este gen en sequía moderada. Para el caso de *A. hybridus* la expresión de *ABI5* disminuyó por debajo del límite de represión en estrés moderado y recuperación (Figura 12A). Al igual que en hoja, la expresión de *RAB18* en raíces de amaranto, comparado con los otros genes asociados a ABA, fue la menos afectada por el estrés hídrico. La especie *A. hypochondriacus* fue la única que mostró cambios notorios, pues hubo una inducción de este gen en estrés hídrico moderado y severo de aproximadamente 5.7, y en recuperación, de 14.5. La especie *A. cruentus* cambió su expresión en sequía moderada sin pasar el umbral de inducción y en sequía severa se indujo 2.3 veces más respecto al control. *RAB18* en *A. caudatus* no se indujo ni se reprimió bajo ningún tratamiento y en *A. hybridus* se observó la ligera represión en estrés severo (Figura 12B). Interesantemente, el patrón de expresión del gen *DREB2C* en raíces de *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus* fue el mismo que se observó en *ABI5*, aunque la magnitud de los niveles de expresión relativa fue distinta, el comportamiento fue similar. En contraste, *A. hybridus* sí modificó el patrón y no mostró inducir o reprimir a *DREB2C* en los tratamientos aplicados y bajo estrés severo aumentó su expresión por arriba de la unidad (Figura 12C). Por último, y de manera notable, los patrones de expresión del gen *LEA14* en hojas y raíces mostraron estar altamente conservados, ya que en raíces se observó, una vez más, que este gen responde ante estrés hídrico severo con una mayor inducción. En algunos casos, como por ejemplo en *A. hypochondriacus*, se observó una inducción en sequía moderada, pero menor que en sequía severa. De modo que la expresión de este gen es dependiente del grado de estrés sufrido por la planta, ya que, a

mayor grado de estrés, se detectó una mayor inducción. Asimismo, y de manera general, las plantas recuperadas disminuyeron su expresión hasta casi valores cercanos al control (Figura 12D).



**Figura 12. Expresión relativa de genes involucrados en el metabolismo de ácido abscísico en raíces de distintas especies de amaranto.** *Box-plots* de la abundancia de transcritos de genes asociados a ABA: (A) ABI5 y (B) RAB18, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).



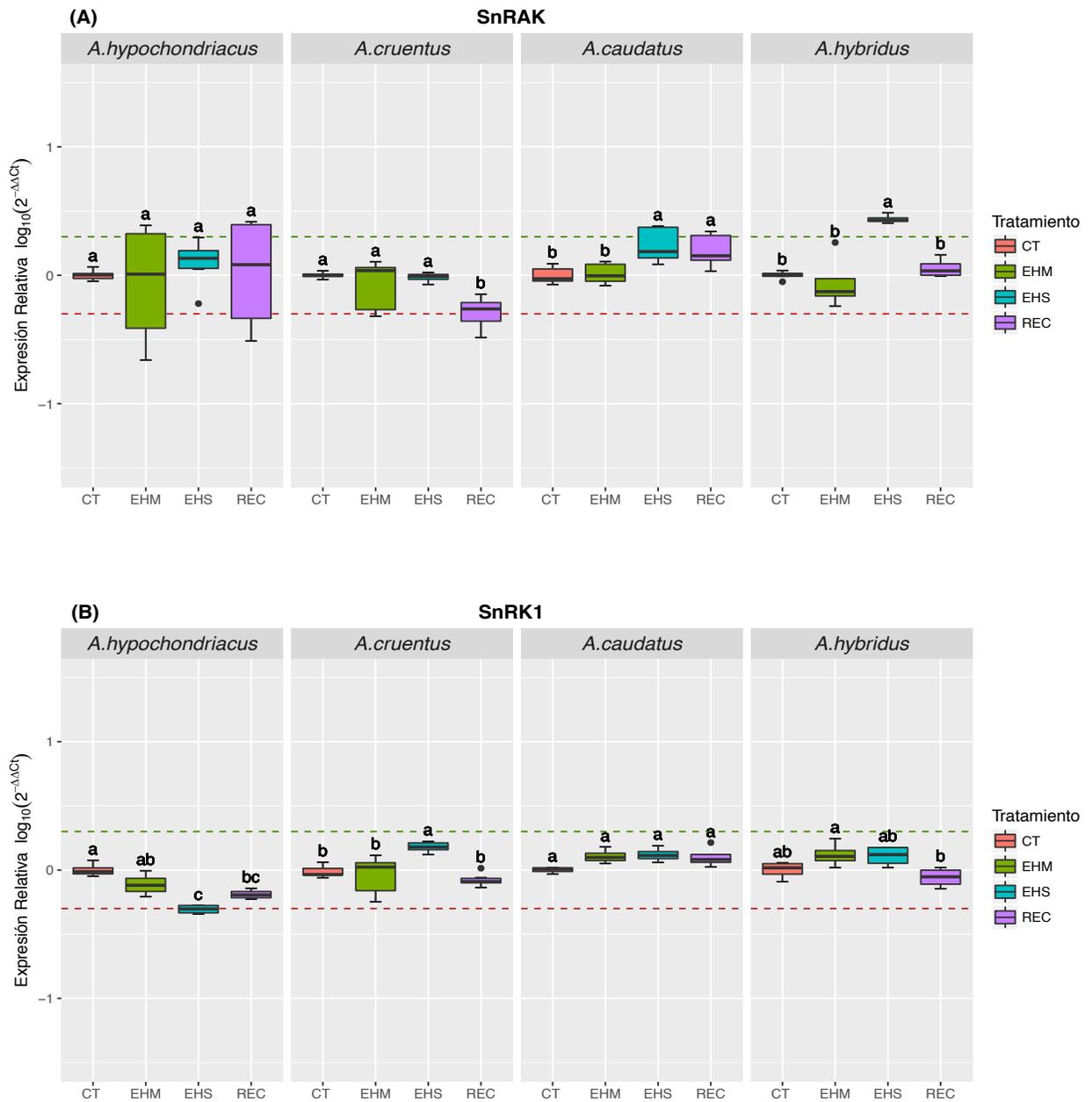
**Figura 12 (continuación).** Expresión relativa de genes involucrados en el metabolismo de ácido abscísico en raíces de distintas especies de amaranto. *Box-plots* de la abundancia de transcritos de genes asociados a ABA: (C) DREB y (D) LEA14, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

## 7.7 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES CODIFICANTES PARA CINASAS DE LA FAMILIA SnRK

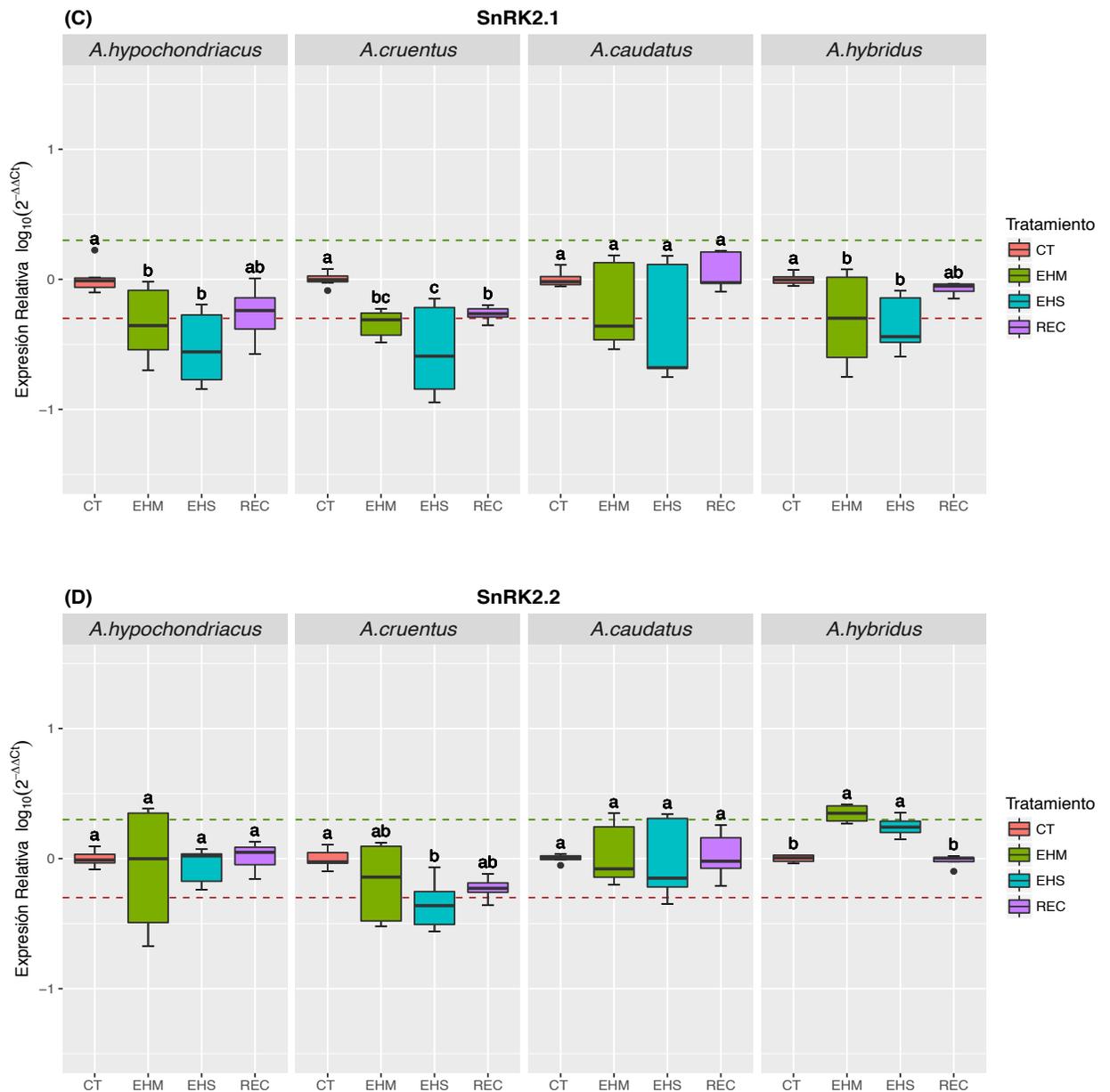
La expresión relativa de los transcritos pertenecientes a la familia SnRK mostró pocos cambios comparado con los observados en los genes asociados a ABA y los RFO. En hojas, el gen SnRAK no se vio afectado bajo ningún tratamiento de estrés en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, aunque en algunas condiciones los valores alcanzaron los límites de represión o inducción, ninguno resultó significativo respecto al control. Por otro lado *A. caudatus* mostró valores por encima de la unidad en estrés severo y recuperación, pero sin sobrepasar el límite de inducción. *A. hybridus* indujo a SnRAK bajo sequía severa y no cambió en el resto de los tratamientos (Figura 13A).

Del mismo modo, se cuantificó la expresión relativa de SnRK1 $\alpha$  en hojas de la especie *A. hypochondriacus*, la cual mostró una disminución en la expresión de este gen bajo estrés severo que se encontró en los límites de represión. También redujo su expresión en recuperación y ligeramente en estrés moderado. Por su parte, *A. cruentus* aumentó su expresión en estrés severo, pero sin superar el umbral de inducción, y sin mostrar cambios en el resto de los tratamientos. En hojas de *A. caudatus* no ocurrieron cambios bajo ninguna condición estudiada y en *A. hybridus* la sequía modificó ligeramente la expresión en todos los tratamientos (Figura 13B).

Además, se midió la abundancia de transcritos para el gen SnKR2.1. Como se puede observar en la Figura 13C, en condiciones de sequía moderada y severa hay una alta variación en los resultados obtenidos para todas las especies. En todos los casos, la expresión relativa es menor a la unidad, alcanzando valores que superan el umbral de represión en todos los casos. Así también, en recuperación para *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, hay una disminución en la expresión que se encuentra en el límite de represión. La expresión del gen SnRK2.2 no se vio estadísticamente afectada en *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*. En *A. cruentus*, la sequía severa ocasionó la disminución de la expresión alcanzando el umbral de represión, y en *A. hybridus* hubo una inducción del gen en sequía moderada y por debajo de este límite un aumento en sequía severa (Figura 13D).



**Figura 13. Expresión relativa de genes codificantes de cinasas de la familia SnRK en hojas de distintas especies de amaranto.** Box-plots de la abundancia de transcritos de genes SnRK: (A) SnRAK y (B) SnRK1 $\alpha$ , bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

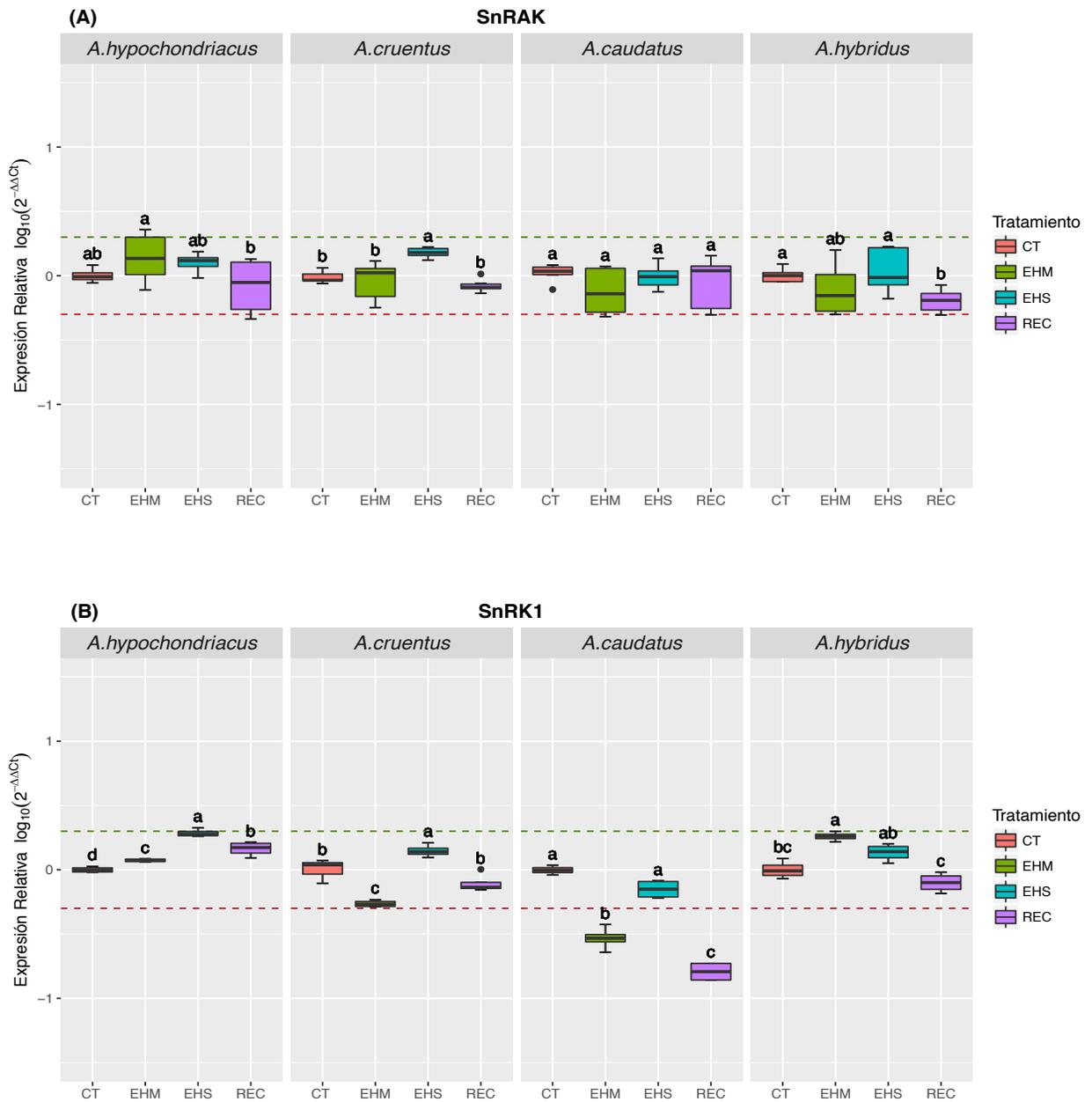


**Figura 13 (continuación).** Expresión relativa de genes codificantes de cinasas de la familia SnRK en hojas de distintas especies de amaranto. *Box-plots* de la abundancia de transcritos de genes SnRK: **(C)** SnRK2.1 y **(D)** SnRK2.2, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

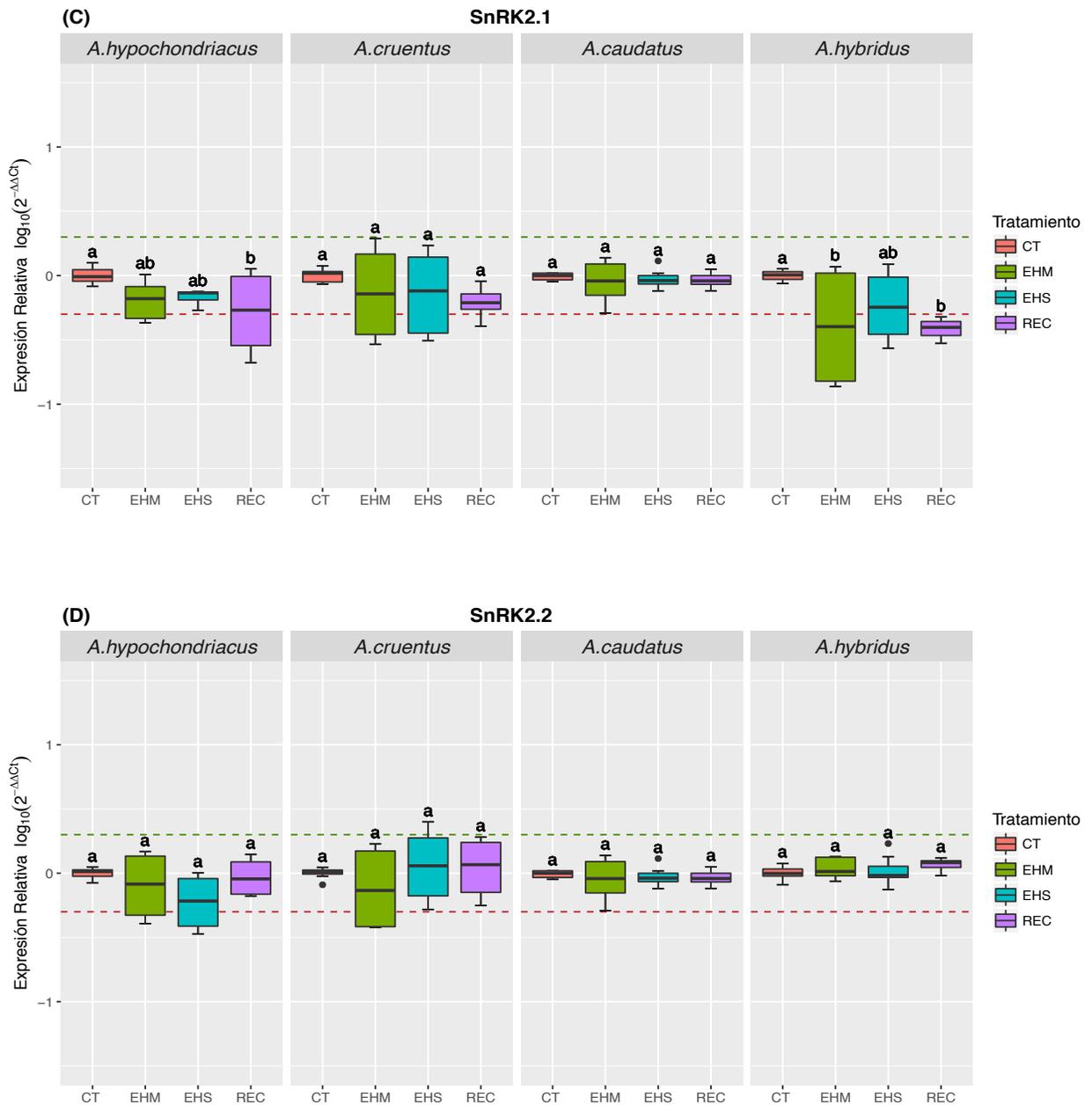
Igualmente, también se midió la abundancia relativa de estos genes en las raíces de dichas especies. Para SnRAK, ninguna especie mostró inducir o reprimir este gen en ningún tratamiento. No obstante, los valores de expresión en sequía severa en *A. cruentus* fueron mayores y significativamente diferentes al control (Figura 14A).

La isoforma SnRK1 $\alpha$ , aumentó su expresión en sequía moderada, severa y en recuperación en la especie *A. hypochondriacus*, sin superar el límite de inducción. En *A. cruentus*, disminuyó en estrés moderado y aumentó en severo, sin superar ninguno de los umbrales. SnRK1 $\alpha$  en *A. caudatus*, se reprimió en sequía moderada y recuperación. Y en *A. hybridus*, este mostró estar por debajo del límite de inducción en sequía moderada (Figura 14B).

Al igual que lo observado en hojas de amaranto, SnRK2.1 en raíces, también alcanzó valores de represión en estrés severo y moderado para *A. cruentus* y *A. hybridus*. La especie *A. caudatus* no se vio afectada por ningún tratamiento y en *A. hypochondriacus* la expresión génica disminuyó en todos los grados de estrés, y ubicándose en el límite de inducción en sequía moderada y en recuperación (Figura 14C). Por último, la isoforma SnRK2.2 no sufrió ningún tipo de cambio significativamente importante en respuesta a cualquier tratamiento y en ninguna de las especies estudiadas en este trabajo (Figura 14D).



**Figura 14.** Expresión relativa de genes codificantes de cinasas de la familia SnRK en raíces de distintas especies de amaranto. *Box-plots* de la abundancia de transcritos de genes SnRK: (A) SnRK y (B) SnRK1 $\alpha$ , bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).



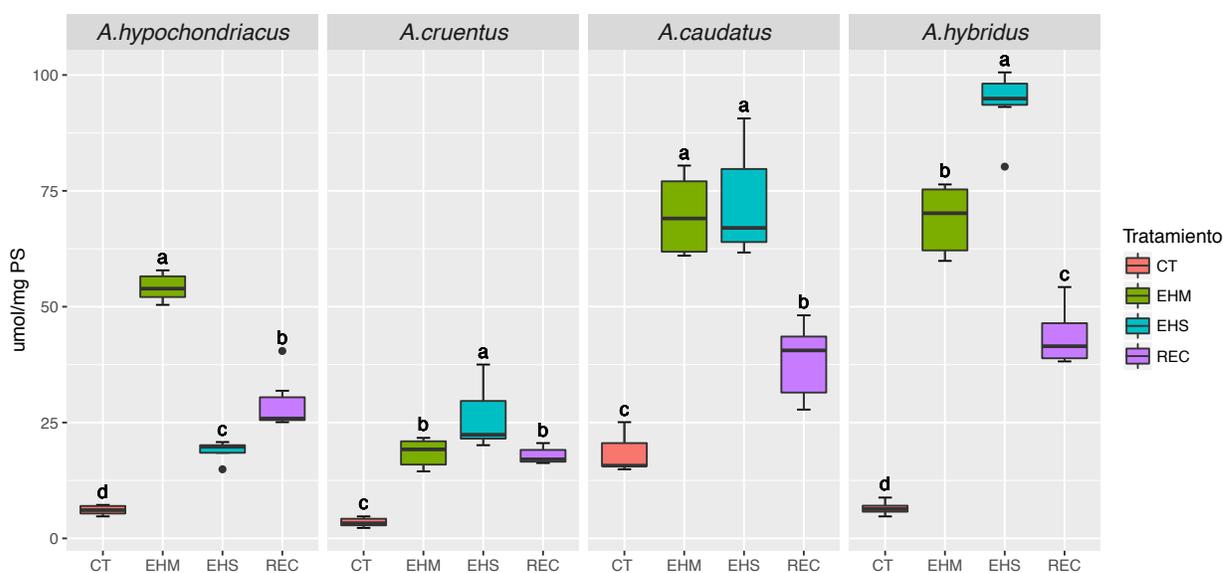
**Figura 14 (continuación).** Expresión relativa de genes codificantes de cinasas de la familia SnRK en raíces de distintas especies de amaranto. *Box-plots* de la abundancia de transcritos de genes SnRK: (C) SnRK2.1 y (D) SnRK2.2, bajo los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

## 7.8 CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS NO ESTRUCTURALES

Con el fin de identificar los cambios sobre los niveles de azúcares solubles causados por los distintos tratamientos de estrés hídrico, se midió la acumulación de éstos en muestras de hojas y raíces de amaranto de las cuatro especies estudiadas.

### 7.8.1 Contenido de azúcares solubles en hojas de amaranto

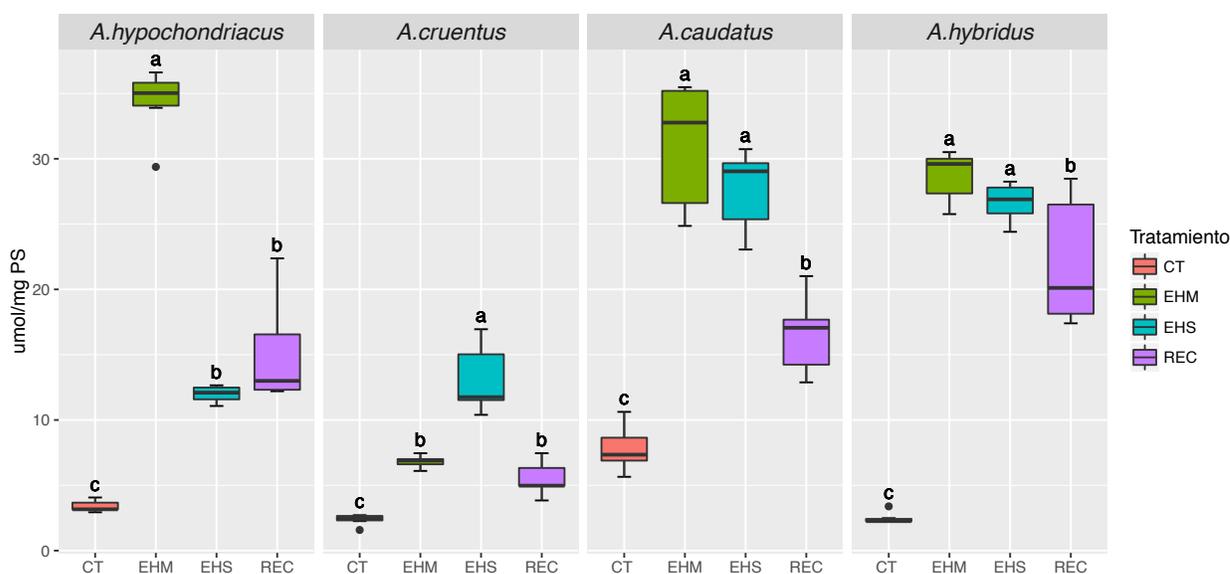
La concentración de glucosa en hojas de amaranto se incrementó bajo condiciones de deshidratación y recuperación respecto a hojas de plantas control. Sin embargo, este incremento fue mayor en las especies susceptibles (i. e., *A. caudatus* y *A. hybridus*) que en las tolerantes (Figura 15). *A. hypochondriacus* mostró un patrón de acumulación distinto al resto de las especies y *A. caudatus* acumuló este azúcar de igual manera en estrés moderado y severo.



**Figura 15. Contenido de glucosa en hojas de distintas especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.** Box-plots de la concentración del azúcar glucosa en los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

Por otro lado, los resultados mostrados en la Figura 16 indican que la cantidad de fructosa en hojas de plantas no estresadas fue baja en todas las especies analizadas, pero aumentó

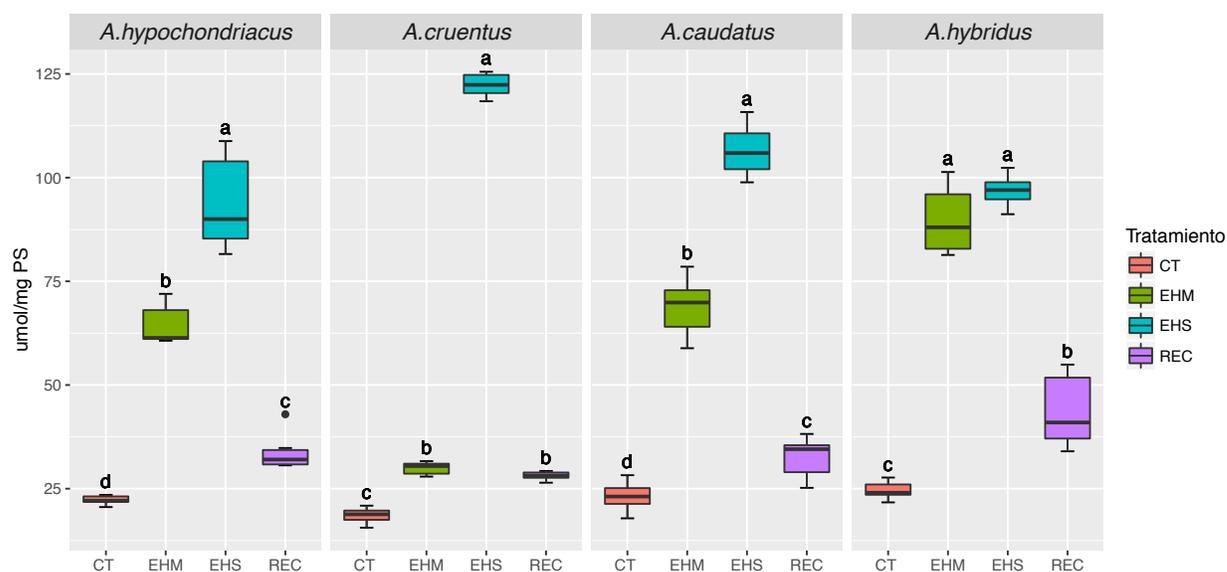
significativamente en sequía moderada, en menor grado en *A. cruentus*. El estrés severo causó una disminución moderada, pero no significativa, en los niveles de fructosa en *A. caudatus* y *A. hybridus* respecto al estrés moderado, mientras que *A. hypochondriacus* mostró una disminución severa en dicho tratamiento. No obstante, en *A. cruentus* este azúcar aumentó. A pesar de mostrar un patrón diferente de acumulación, las especies tolerantes se agrupan en este grado de estrés, al igual que las susceptibles. *A. cruentus* acumuló menos glucosa y fructosa que el resto de las especies. En contraste, *A. hypochondriacus* fue la única especie que acumuló más glucosa y fructosa bajo estrés hídrico moderado.



**Figura 16. Contenido de fructosa en hojas de distintas especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.** *Box-plots* de la concentración del azúcar fructosa en los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

De la misma forma, el contenido de sacarosa en todas las especies aumentó según el grado de estrés, siendo significativamente mayor en sequía severa. El aumento de este disacárido en hojas ocasionado por una severa pérdida de agua, se vio disminuido en condiciones de recuperación, llegando casi hasta los niveles de plantas control. El estrés moderado ocasionó un aumento significativo de este azúcar excepto en *A. cruentus* (Figura 17).

En general el contenido de carbohidratos no estructurales en hojas de amaranto, se vio afectado por las condiciones de deshidratación a las que fueron sometidas. El azúcar mayormente acumulado en estrés fue la sacarosa, seguido de la glucosa y en menor magnitud la fructosa. Se observaron patrones de acumulación de azúcares solubles entre especies y entre grados de tolerancia a estrés hídrico.



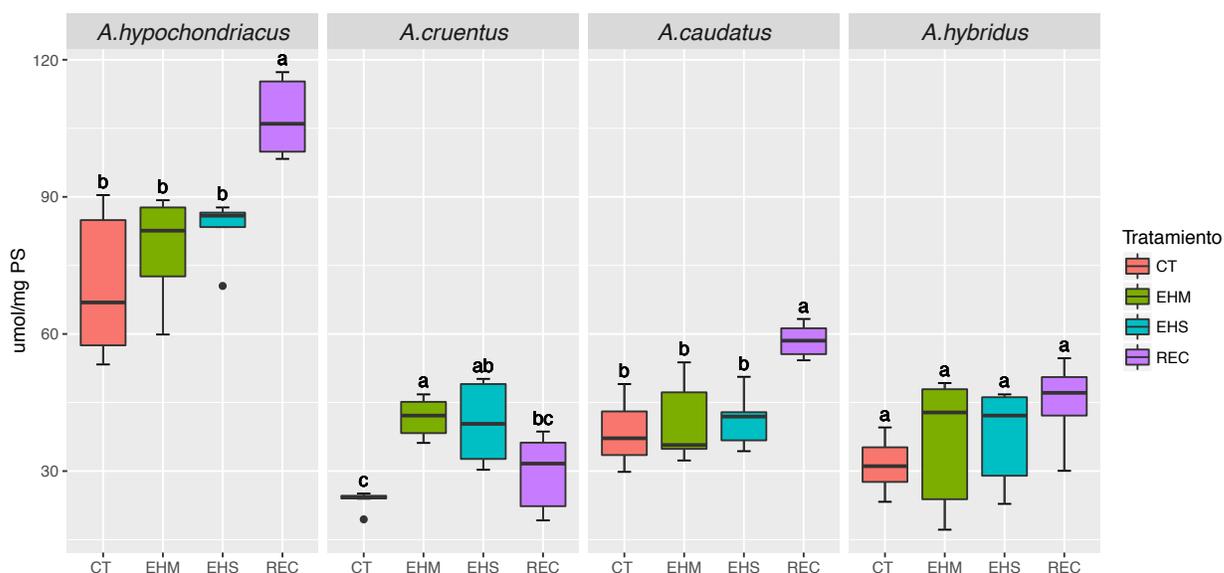
**Figura 17. Contenido de sacarosa en hojas de distintas especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.** Box-plots de la concentración de sacarosa en los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

### 7.8.2 Contenido de azúcares solubles en raíces de amaranto

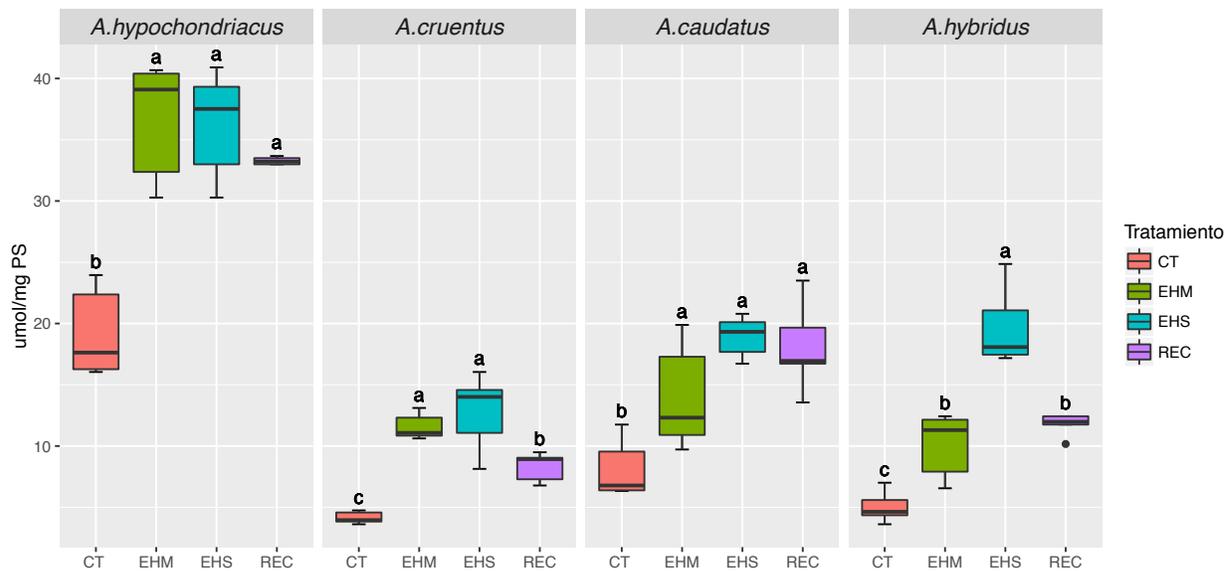
La concentración de glucosa en raíces de amaranto aumentó significativamente en condiciones de recuperación en *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, mientras que no cambió bajo ningún tipo de sequía respecto a las plantas control. En *A. hybridus* no se observó ningún cambio bajo ningún tratamiento y en *A. cruentus* todos los tratamientos modificaron los niveles de este azúcar (Figura 18). También se midió el contenido de fructosa; en la figura 19 se observa que el estrés hídrico modificó el contenido de este azúcar en las raíces

de todas las especies mostradas. *A. hypochondriacus* mostró ser la especie con un contenido significativamente mayor de glucosa y fructosa este que el resto de las especies.

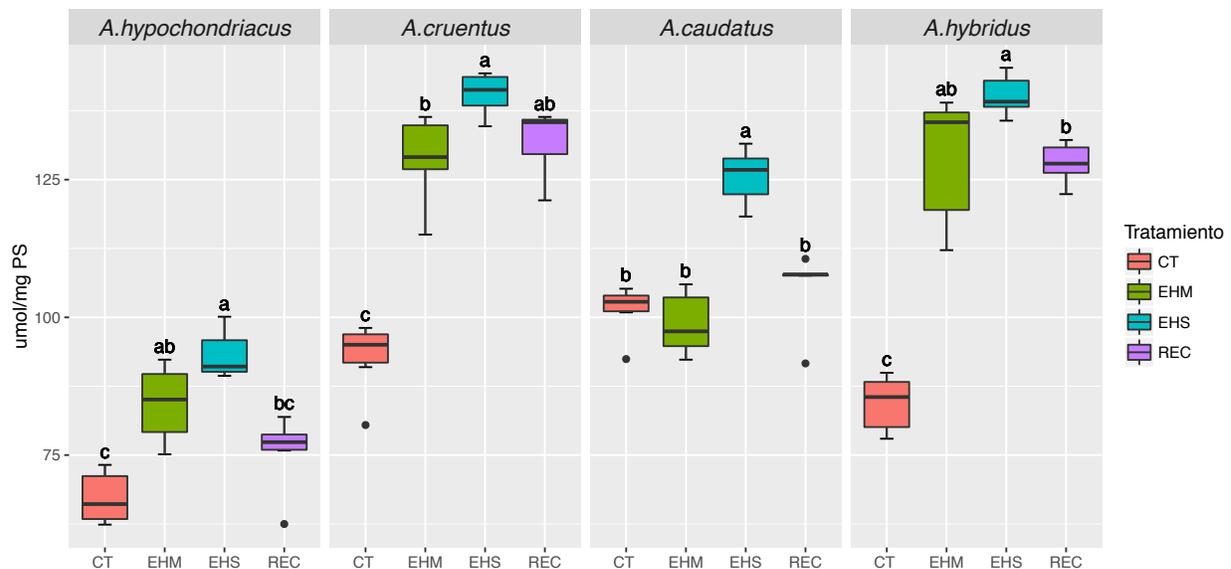
Al igual que las hojas, raíces de plantas sometidas a estrés hídrico acumularon más sacarosa. *A. cruentus* fue la especie que mostró una mayor acumulación de este azúcar en estrés severo que el resto de las especies. Se observó que las especies *A. cruentus*, *A. caudatus* y *A. hypochondriacus* cumplen con el mismo patrón de acumulación de este azúcar, siendo esta última la que acumuló sacarosa en menor magnitud que el resto. La concentración obtenida en raíces fue superior que la acumulada las hojas, pero existieron comportamientos similares entre órganos (Figura 20).



**Figura 18. Contenido de glucosa en raíces de distintas especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.** Box-plots de la concentración del azúcar glucosa en los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ).



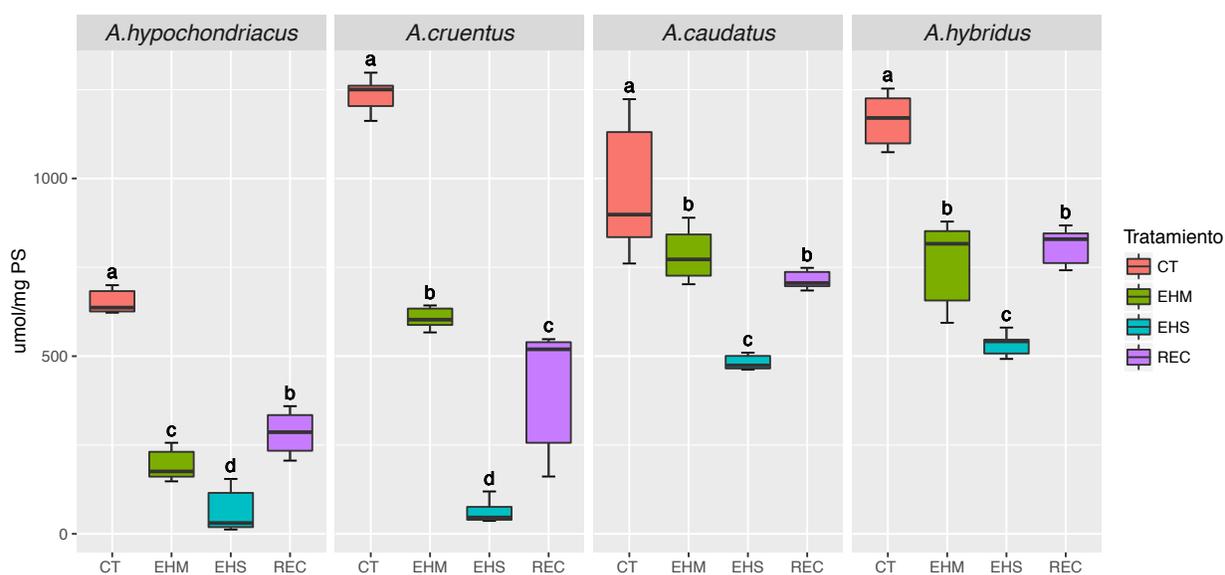
**Figura 19. Contenido de fructosa en raíces de distintas especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.** Box-plots de la concentración del azúcar fructosa en los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ).



**Figura 20. Contenido de sacarosa en raíces de distintas especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.** Box-plots de la concentración de sacarosa en los distintos tratamientos de estrés hídrico: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

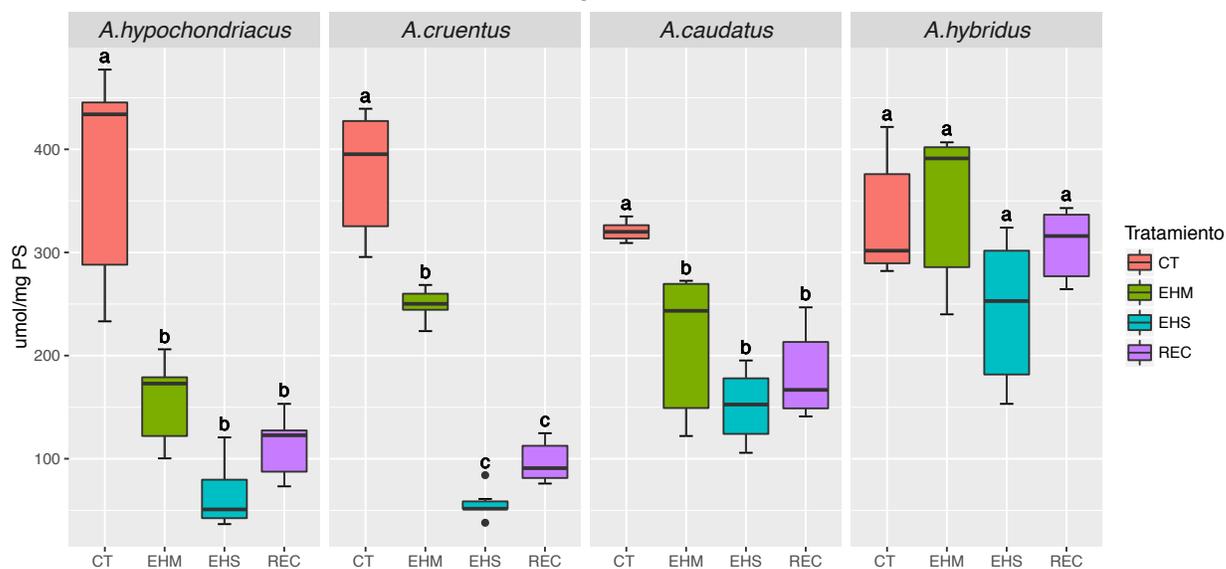
## 7.9 CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE ALMIDÓN

El almidón es el carbohidrato de mayor abundancia en el reino vegetal. Es sintetizado en el cloroplasto para su almacenamiento temporal o para ser metabolizado de acuerdo a las necesidades de la planta (Zeeman *et al.* 2010). Las hojas de amaranto en condiciones ideales de humedad mostraron una alta acumulación de este polisacárido. Durante estrés hídrico, se observó una drástica disminución en el contenido de almidón, que fue más notoria en estrés severo que en el moderado. Plantas recuperadas también mostraron una disminución de almidón respecto a las plantas control. Sin embargo, esta disminución no fue tan drástica y algunas especies mostraron la misma respuesta que ante el estrés hídrico moderado. Las especies tolerantes agotaron las reservas de este azúcar casi en su totalidad bajo estrés severo, mientras que las susceptibles solo utilizaron aproximadamente la mitad, respecto a las plantas control (Figura 21).



**Figura 21. Contenido de almidón en hojas de distintas especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.** Box-plots de la concentración de almidón en los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

Asimismo, el contenido de almidón en raíces de amaranto no estresadas fue elevado, pero menor comparado con hoja. De igual forma, se observó que este polisacárido disminuyó drásticamente en especies tolerantes, en mayor medida que las susceptibles. En claro contraste, *A. hybridus* no mostró cambios estadísticamente significativos en el contenido de almidón bajo ninguna condición estudiada (Figura 22).

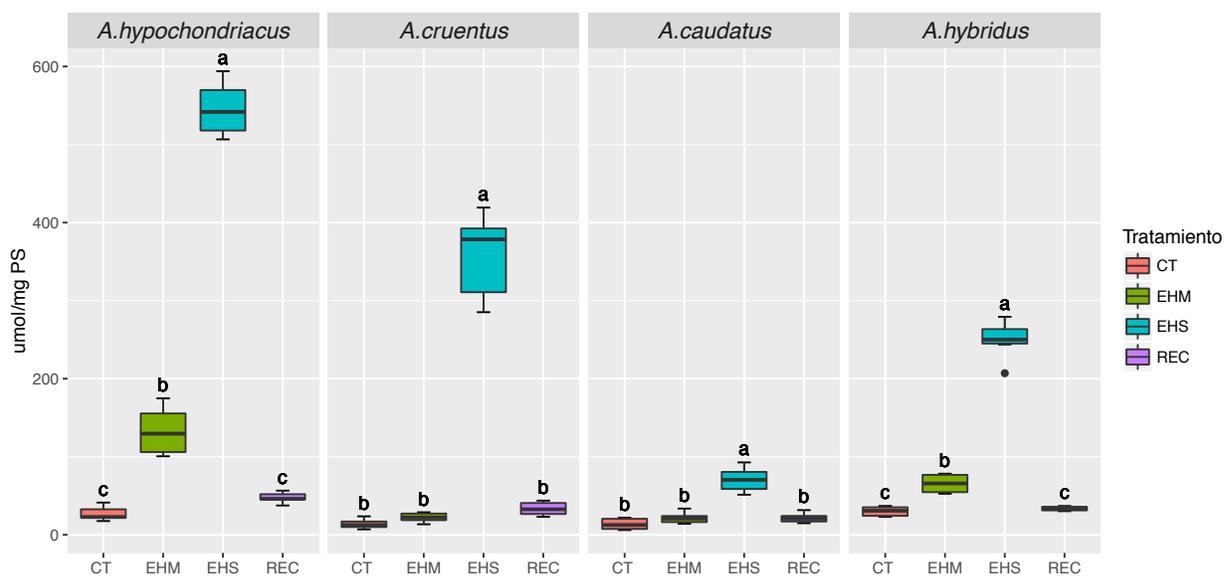


**Figura 22. Contenido de almidón en raíces de distintas especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.** Box-plots de la concentración de almidón en los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

La concentración de almidón, contrariamente a la de los azúcares solubles, disminuyó significativamente bajo condiciones de sequía moderada, severa y en recuperación, principalmente en hoja y en menor medida en raíz. Se observaron patrones de acumulación claramente definidos en todas las especies y órganos analizados.

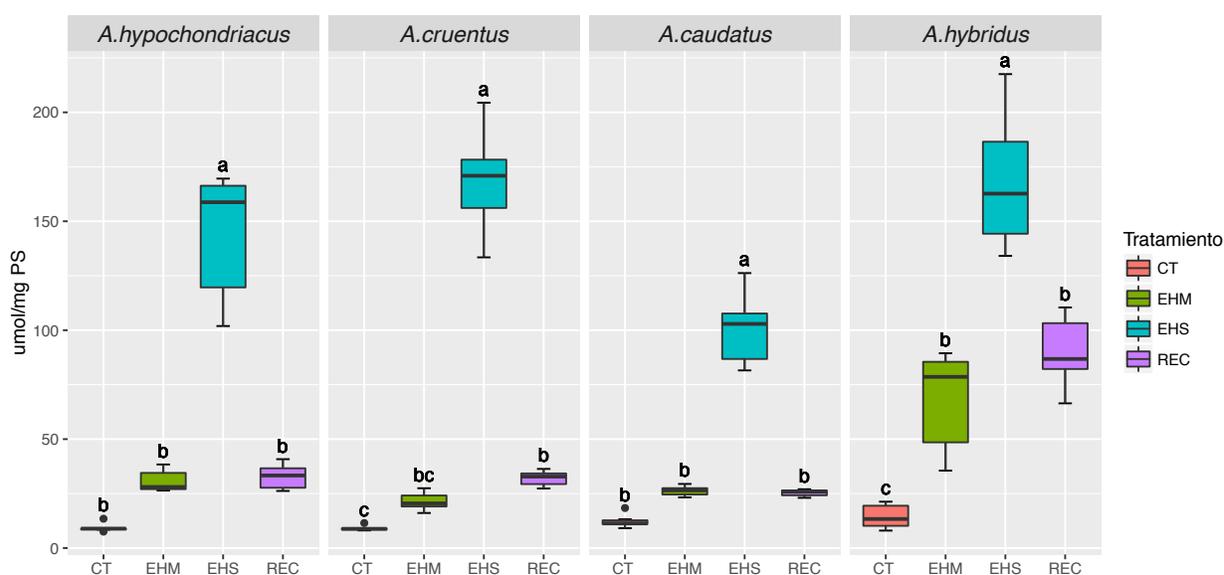
## 7.10 CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE PROLINA

Con el fin de comprobar si en la tolerancia contrastante a sequía observada en amaranto, estaba implicada la acumulación de otros osmolitos, se midió la concentración del aminoácido prolina. Los niveles de esta molécula en hojas de plantas control fueron bajos y permanecieron constantes en todas las especies de amaranto bajo estudio. Sin embargo, la concentración de esta aumentó significativamente bajo condiciones de estrés moderado en *A. hypochondriacus* y *A. hybridus*, pero no modificó el contenido en *A. cruentus* y *A. caudatus*, respecto a las plantas control. El estrés severo causó un aumento considerable de dicho aminoácido en todas las especies analizadas, siendo mayor en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, seguido de *A. hybridus* y en menor magnitud en *A. caudatus*. Finalmente, los niveles de prolina en plantas recuperadas declinaron hasta los niveles control en todas las especies (Figura 23).



**Figura 23. Contenido de prolina en hojas de diferentes especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.** Box-plots de la concentración del aminoácido prolina en los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

A pesar de que la concentración de este osmolito también aumentó con el grado de estrés en raíces de amaranto, la tasa de acumulación fue menor que en las hojas. En la figura 24 se muestran los resultados correspondientes al contenido de prolina en raíces. Como se puede observar, existen patrones conservados entre órganos y especies. En condiciones óptimas, la concentración permaneció constante en todas las especies, mientras que en estrés moderado no se detectaron cambios significativos en los niveles de prolina, a excepción de *A. hybridus*. Posteriormente, el contenido de prolina mostró un aumento significativo en todas las especies en estrés severo, siendo menor en *A. caudatus*. Este incremento fue seguido de una disminución hasta los niveles de plantas bien regadas en plantas recuperadas, a excepción de *A. hybridus*.



**Figura 24. Contenido de prolina en raíces de diferentes especies de amaranto sometidas a distintos niveles de estrés hídrico.** Box-plots de la concentración del aminoácido prolina en los distintos tratamientos de estrés hídrico: **CT** (control), **EHM** (estrés hídrico moderado), **EHS** (estrés hídrico severo), **REC** (recuperación). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

## 8) DISCUSIÓN

### 8.1 Distintas especies de amaranto presentan tolerancias contrastantes a la sequía

En condiciones naturales, las plantas son afectadas por distintos tipos de estrés que pueden actuar aislados, o bien, ocurrir simultáneamente, lo que se traduce en un alto grado de complejidad en las respuestas que deben generar. La percepción de la señal del estrés genera cascadas de señalización específicas y respuestas adaptativas. Por lo tanto, las diferencias en la tolerancia al estrés entre genotipos o distintas etapas de desarrollo pueden surgir de diferencias en la percepción de las señales y en los mecanismos de transducción (Rosa *et al.* 2009). Uno de los tipos de estrés que las plantas enfrentan con mayor frecuencia es la sequía; éste representa el principal factor que limita la productividad agrícola y se prevé que el efecto negativo causado por este tipo de estrés sea más grave en las próximas décadas (Cattivelli *et al.* 2008). Por lo tanto, es de suma importancia entender los mecanismos que otorgan una mayor tolerancia a este tipo de estrés en algunas especies vegetales, con el fin de generar cultivos más tolerantes a estas condiciones.

El amaranto es una planta que no sólo genera semillas con alto valor nutricional, sino que además posee características agronómicas deseables, y ha mostrado ser sumamente tolerante a la deficiencia de agua. Se ha visto que soporta esta condición mejor que plantas como el maíz, sorgo o trigo (Weber 1990). Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos moleculares y bioquímicos responsables de su tolerancia a la sequía. En este trabajo, se realizó un análisis comparativo utilizando distintas especies de amaranto con tolerancia contrastante al estrés hídrico, con el fin de identificar respuestas comunes y/o divergentes ante este tipo de estrés.

Para identificar las variedades de amaranto con tolerancia contrastante a la sequía y seleccionar las que se usarían en este estudio, se evaluó el porcentaje de recuperación y el potencial hídrico de las hojas de ocho variedades de amaranto sometidas a estrés hídrico (Apéndice 4). Estos parámetros fueron utilizados como indicadores, ya que se ha observado que plantas que pueden sobrevivir con menor cantidad de agua, muestran mayor turgencia en sus tejidos y por lo tanto mayor potencial hídrico. De igual forma, se considera que la

capacidad de sobrevivir después de haber sufrido una pérdida severa de agua, es un rasgo de tolerancia a la sequía en plantas (Xu *et al.* 2010). Por lo que se eligieron las especies más contrastantes, considerando como tolerantes aquellas que mostraron mayor potencial hídrico en sus hojas y mayor número de plantas recuperadas (e. g., *A. hypochondriacus* var. Gabriela y *A. cruentus* var. Amaranteca), y como especies susceptibles las que presentaron menor potencial hídrico y menor recuperación (e. g., *A. caudatus* y *A. hybridus*). Sin embargo, se requiere mayor trabajo para determinar la base fisiológica de estas diferencias.

De las especies seleccionadas, *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus*, son clasificadas como amarantos de grano y *A. hybridus* como maleza, aunque su uso como verdura es común en ciertas regiones del mundo. La primera de ellas, se cultiva desde el suroeste de Estados Unidos hasta el centro de México; *A. cruentus*, es cultivada en todo el sur de México y Guatemala; *A. caudatus* se encuentra principalmente en la región andina, mientras que *A. hybridus* está ampliamente distribuida por todo el continente americano (Sauer 1967). Filogenéticamente, estas especies están relacionadas entre sí, ya que se considera que *A. hybridus* es el ancestro común de las especies de grano y ha mostrado ser genéticamente muy diverso (Kietlinski *et al.* 2013).

Durante la exposición al estrés por sequía, las especies de amaranto evaluadas mostraron respuestas diferenciales, que podrían estar relacionadas a adaptaciones climáticas distintas tomando en cuenta su origen geográfico. Por ejemplo, *A. hypochondriacus*, pertenece a zonas semiáridas que presentan temperaturas muy altas durante el verano que oscilan entre los 35-41°C (CONAGUA 2015). Las condiciones de temperatura durante los experimentos en invernadero, pudieron asemejarse a dichos climas, razón por la que es probable que esta especie respondiera exitosamente y mostrara una tolerancia superior. Por otro lado, *A. caudatus* que crece en ambientes con mayor altitud y climas de fríos a templados, fue el genotipo más susceptible ante la privación de agua de riego y no mostró tolerancia ante las altas temperaturas. No obstante, a pesar de mostrar comportamientos contrarios, estas dos especies están estrechamente relacionadas filogenéticamente, y apartadas de *A. cruentus* (Kietlinski *et al.* 2013).

## 8.2 La sequía ocasiona cambios en la expresión de algunos de los genes del metabolismo de trealosa en especies de amaranto

Las plantas han desarrollado una gran cantidad de mecanismos para responder a la baja disponibilidad de agua, incluyendo cambios en la expresión génica. Los mecanismos de respuesta ante la sequía han sido mayormente estudiados en *Arabidopsis thaliana* y en plantas de resurrección (Lunn *et al.* 2014). La trealosa es un azúcar que ha mostrado jugar un papel importante en la tolerancia al estrés hídrico en distintos organismos, principalmente como osmolito. Sin embargo, en plantas este papel ha sido reemplazado por la sacarosa. Se ha visto que el intermediario de la ruta de síntesis, la trealosa-6-fosfato (T6P), participa en la regulación de las respuestas a estrés biótico y abiótico. Por ejemplo, durante la sequía, regula la apertura de los estomas. Además, la existencia de múltiples genes codificantes para T6P en distintos genomas vegetales, revela que la mayoría de las plantas son capaces de sintetizar trealosa (Lunn 2006). En el transcriptoma de *A. hypochondriacus*, se encontraron 9 isoformas con identidad TPS, tres TPP, y uno TRE (Délano-Frier *et al.* 2011), indicando que la ruta está conservada en amaranto. Dentro de dichas isoformas, se detectó sólo una codificante para TPS de clase I y ocho para TPS de la clase II. En *Arabidopsis*, sólo se ha reportado actividad catalítica para una isoforma TPS, la *AtTPS1*, mientras que todas las TPP y la única TRE han mostrado ser catalíticamente activas (Ramon *et al.* 2009). En amaranto, durante los tratamientos de estrés hídrico, la expresión de este gen permaneció en su mayoría sin cambios en las hojas, pero se indujo en recuperación en las especies susceptibles (*A. caudatus* y *A. hybridus*), mientras que en las raíces de especies tolerantes (*A. hypochondriacus* y *A. cruentus*) se reprimió (Figura 7A y 8A). En plantas de maíz sometidas a estrés por oscuridad, se demostró que el nivel de expresión de *TPS1* está correlacionado directamente con la concentración de T6P, (Henry *et al.* 2014), mientras que en *Arabidopsis* los niveles de T6P conservan una proporción directa con los niveles de sacarosa (Yadav *et al.* 2014). A su vez, la T6P controla la degradación del almidón durante la noche o bajo condiciones de estrés (Martins *et al.* 2013). En conjunto, estos datos podrían sugerir que al no encontrarse cambios significativos en la expresión de *AhTPS1*, la concentración de sacarosa y almidón tampoco se verían afectadas. Sin embargo, en amaranto se encontró una acumulación de sacarosa y una reducción de almidón durante la sequía, por lo que será necesario cuantificar el contenido de T6P y trealosa con el fin de obtener conclusiones sobre la utilización de estos

azúcares durante el estrés. Del mismo modo, se observaron pocos cambios de expresión en las isoformas de *TPPA*, *TPPD* y *TPPI* en ambos órganos, aunque en general, estos genes se reprimieron esporádicamente en algunas condiciones y especies, por lo que no es posible establecer con claridad su rol durante la sequía en las plantas de amaranto (Figuras 8 y 9).

El conocimiento de la función de las enzimas TPS de la clase II es prácticamente nulo y tampoco existen reportes que demuestren actividad catalítica de estas isoformas. En maíz, los genes codificantes de enzimas de la clase II carecen de los aminoácidos necesarios para la catálisis. Sin embargo, aún mantienen sitios que pueden unirse al sustrato glucosa-6-fosfato y el producto T6P, lo que sugiere que podrían servir como detectores del nivel de estos azúcares (Henry *et al.* 2014). De manera interesante, las isoformas *AhTPS9.1* y *AhTPS9.2* respondieron al estrés hídrico en todas las especies utilizadas en este trabajo. La expresión de *AhTPS9.1*, mostró una inducción gradual conforme el estrés fue más severo y volvió a las condiciones control durante la recuperación. En las hojas, la inducción en estrés severo fue muy elevada pero no se observaron diferencias significativas entre especies. No obstante, en raíz la inducción fue mayor en las especies tolerantes (Figuras 6B y 7B). La isoforma *AhTPS9.2* presentó un patrón similar, ya que en las hojas se observó una inducción en estrés moderado que se incrementó en estrés severo. Además, en las especies susceptibles se encontró mayor abundancia de transcritos de este gen. Por otro lado, en las raíces sólo hubo inducción en estrés severo y fue mayor en las especies tolerantes (Figuras 6C y 7C). Existen escasos reportes sobre el papel de estos genes durante el estrés hídrico. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que estos genes tienen una función importante en la respuesta al estrés en plantas, la cual sería interesante definir experimentalmente.

Además de regular procesos del crecimiento y desarrollo vegetal, la T6P ha mostrado inhibir la actividad de SnRK1. Esta cinasa funciona como sensor de energía en todas las eucariotas, ya que es activada cuando hay baja disponibilidad de energía, condición bajo la cual puede inducir procesos catabólicos y de ahorro de energía (Baena-González *et al.* 2007). En este trabajo no se encontraron cambios importantes en la expresión génica de SnRAK, SnRK1, SnRK2.1 y SnRK2.2, en respuesta a estrés hídrico en ninguna especie de

amaranto. Por lo que es posible que la regulación de estos genes se esté dando de manera post-traducciona. Hay reportes que indican que la familia de las cinasas SnRK2 participa en la respuesta a salinidad y sequía, y que además forman parte de la señalización por ABA (Kulik *et al.* 2011). Sin embargo, no se encontró alguna correlación entre la expresión de los miembros de SnRK2, con la expresión de los genes ABA evaluados en amaranto. De éstos últimos, algunos se indujeron en determinadas condiciones de sequía, más no se encontraron patrones claros entre especies ni órganos. Por ejemplo, en las hojas, *ABI5* se indujo en estrés severo en todas las especies, mientras que *DREB2C* únicamente cambió su expresión en *A. hybridus* y *RAB18*, en ninguna condición. En raíz, *ABI5* se indujo en respuesta a la sequía en todas las especies a excepción de *A. hybridus*. *RAB18* por su parte, sólo mostró inducción en *A. hypochondriacus* durante todos los tratamientos, y *DREB2C* aumentó la abundancia de sus transcritos en estrés hídrico moderado y severo. Esto indica que, a pesar de estar involucrados en la señalización por ABA, no todos los genes están participando directamente en la respuesta al déficit hídrico en amaranto (Figuras 11 y 12). Interesantemente, *LEA14*, un gen asociado a la tolerancia a la desecación y que se ha mostrado estar regulado por ABA en diversos estudios transcriptómicos (Wang *et al.* 2011), se encontró altamente inducido en hojas y raíces de todas las especies de amaranto. Su expresión se incrementó en relación con el grado del estrés y disminuyó en condiciones de recuperación. Esto coincide con los patrones de expresión vistos en las isoformas *AhTPS9.1* y *AhTPS9.2* (Figuras 6 y 7), así como lo observado en los genes de la ruta de síntesis de los RFO (Sección 7.5) por lo que se sugiere que estos genes en amaranto también son importantes en la respuesta al estrés hídrico.

### **8.3 La sequía ocasiona cambios en la expresión de genes del metabolismo de RFO en especies de amaranto**

Además de evadir la sequía desarrollando un sistema de raíces largas y mediante el cierre de los estomas, las plantas sintetizan una gran variedad de compuestos que ayudan a mantener el estatus hídrico y la turgencia celular. Dentro de estos compuestos se encuentran varios azúcares, como los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO). En este trabajo se evaluó el efecto de distintos grados de sequía sobre la expresión de los genes clave en la síntesis de los RFO, ya que en otras plantas se han visto involucrados en

mecanismos de tolerancia a la sequía, actuando esencialmente como osmoprotectores y antioxidantes (dos Santos *et al.* 2015).

En esta ruta biosintética, la primera reacción es catalizada por la enzima galactinol sintasa (GOLS), la cual no sólo está relacionada con el metabolismo de carbohidratos, sino que juega un papel importante en la tolerancia al estrés (Sengupta *et al.* 2015). En el transcriptoma de *A. hypochondriacus* se encontraron dos isoformas de GOLS, nombradas *AhGOLS1* y *AhGOLS2* de acuerdo a su homología con *Arabidopsis*. La expresión de la primera de ellas, fue altamente inducida en hojas y raíces de todas las especies estudiadas en condiciones de déficit severo de agua, mientras que *AhGOLS2* sólo fue inducido en raíces bajo estas condiciones (Figura 9A y 9B). Previamente, ya había sido reportada la inducción de *AtGOLS1* y *AtGOLS2* durante la sequía en *Arabidopsis*, así como una acumulación de galactinol y rafinosa en sus semillas y hojas, sugiriendo que estos dos metabolitos están involucrados en la tolerancia al estrés funcionando como osmoprotectores. Esta función osmoprotectora en *Arabidopsis*, fue confirmada mediante la sobreexpresión de *AtGOLS2*, donde no sólo se observó una mayor inducción de los genes *AtGOLS*, sino que hubo una mayor acumulación de galactinol y rafinosa, así como una mayor tolerancia a la sequía (Taji *et al.* 2002). En amaranto, se encontraron patrones muy claros en la expresión relativa de la isoforma *AhGOLS1* en hojas de todas las especies estudiadas, ya que la inducción fue proporcional al grado de estrés aplicado. En estrés moderado, se observó una elevada inducción de este gen, que fue aún mayor en estrés severo y que posteriormente disminuyó en las plantas recuperadas, hasta los niveles de expresión observados en condiciones control. Sin embargo, en hojas, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de inducción de este gen entre las especies durante los tratamientos de estrés (Figura 9A).

De manera interesante, este patrón de expresión que fue dependiente del grado de estrés se conservó en las raíces de todas las especies y en todos los tratamientos. Cabe recalcar que en este órgano, la abundancia de transcritos de *AhGOLS1* en las especies tolerantes *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, fue mayor comparada con las susceptibles *A. caudatus* y *A. cruentus*, y que la magnitud de expresión en las raíces fue mucho más alta comparada con las hojas (Figura 10A). Esto sugiere la posibilidad de que una mayor expresión de *GOLS1* en raíz esté correlacionada con una mayor tolerancia a estrés hídrico en amaranto.

Por ejemplo, en plantas de *Coffea canephora*, con tolerancia contrastante a la sequía, la expresión de *CcGOLS1* también fue diferencialmente regulada por la intensidad del estrés y por el genotipo. En café, la abundancia de *CcGOLS1* en el genotipo susceptible disminuyó durante la exposición a la sequía, mientras que en la tolerante este gen fue inducido. Además, se hallaron cambios en la acumulación de galactinol y RFO, siendo más alto en las plantas tolerantes, principalmente en estrés severo. Durante la fase de recuperación, la expresión de *CcGOLS1* fue similar en ambas especies y comparable a las plantas control (dos Santos *et al.* 2015), tal y como se observó en amaranto.

Para el caso de la isoforma *AhGOLS2*, los patrones de expresión difirieron entre órganos, ya que, en las hojas, algunas especies disminuyeron la cantidad de transcritos durante los tratamientos, aunque la mayoría permaneció sin cambios. Por otro lado, las raíces mantuvieron la tendencia previamente observada en *GOLS1*, donde en las especies tolerantes, hubo una mayor expresión durante sequía severa respecto a las susceptibles. Sin embargo, esta expresión estuvo cercana al límite de inducción en todos los casos (Figura 9B y 10B). Curiosamente, un estudio previo en *Arabidopsis* mostró, a diferencia de lo encontrado en amaranto, que la expresión de *AtGOLS2* fue mayor a la de *AtGOLS1* en respuesta a estrés hídrico (Taji *et al.* 2002).

El siguiente paso en la ruta, es la síntesis de rafinosa, catalizado por la enzima rafinosa sintasa (RAFS). En amaranto, la abundancia de transcritos de esta isoforma coincidió con los patrones de expresión de *GOLS1*. En hojas y raíces de *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* hubo una tasa de inducción más elevada en estrés severo que en el resto de los tratamientos. En contraste, esta inducción fue menor en *A. caudatus* y en el caso de *A. hybridus*, permaneció sin cambios (Figura 9C y 10C). Se ha observado que en especies de alfalfa (*Medicago sativa*), los genotipos “Wisfal” (tolerante) y “Chilean” (susceptible), mostraron diferencias en el contenido de rafinosa, siendo 1.7 veces más alto en los tallos de “Wisfal” en condiciones óptimas que en “Chilean”. Después de 8 días de sequía (equivalente a un estrés moderado), esta proporción se incrementó a 4.2 veces. Sin embargo, el patrón de cambios en las raíces de alfalfa fue distinto, ya que los niveles de rafinosa se incrementaron hasta los 11 días de sequía (equivalente a un estrés severo), antes de declinar rápidamente durante recuperación. Es importante destacar, que las

raíces del genotipo tolerante acumularon el doble de rafinosa que el genotipo susceptible, y que la acumulación en este órgano fue un orden de magnitud mayor que en los tallos de ambas especies (Kang *et al.* 2011). Asimismo, se encontró que la abundancia de transcritos de *RAFS* fue mayor en las raíces que en las hojas de todas las especies de amaranto utilizadas. Recientemente, se estudiaron los cambios metabólicos inducidos por estrés hídrico en dos variedades de quínoa (*Chenopodium quinoa*), otro miembro de la familia Amaranthaceae. En dicho estudio, hubo una disminución de azúcares como fructosa, glucosa y almidón, y un aumento en el mio-inositol en ambos genotipos. Sin embargo, el azúcar que sufrió el mayor incremento bajo estrés fue la rafinosa. Se observó que después de la recuperación esta concentración retornó a los niveles de plantas control. Se postuló que la rafinosa funciona como un reservorio de carbono que puede contribuir a la recuperación rápida de esta especie (Bascañán-Godoy *et al.* 2016).

Basados en los patrones de expresión obtenidos, y en la cantidad de transcritos detectada en las distintas especies de amaranto, se podría especular que las concentraciones de galactinol y rafinosa podrían ser más elevadas en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, y que esto podría conferirles mayor tolerancia respecto a *A. caudatus* y *A. hybridus*. Sin embargo, es necesario realizar la cuantificación de los RFO, a fin de realizar dichas comparaciones. En el caso de alfalfa, pese a que los niveles de galactinol, rafinosa y mio-inositol fueron más elevados en el genotipo tolerante, los niveles de transcritos de los genes involucrados en esta ruta, a excepción de *MsGOLS*, no fueron sustancialmente diferentes entre las especies, pero sí entre órganos, encontrándose mayor expresión en raíces. La baja correlación entre el nivel de transcritos y la concentración de los metabolitos, se atribuyó a posibles diferencias traduccionales o post-traduccionales en la regulación de estas enzimas (Kang *et al.* 2011).

Por último, se midió la abundancia relativa de transcritos del gen estaquiosa sintasa (STCS), para el cual no se observaron, en general, cambios en la expresión en las hojas de ninguna de las especies bajo estrés hídrico, aunque su expresión se reprimió o se acercó al límite de represión durante la recuperación (Figura 9D). En las raíces, la STCS siguió los patrones de expresión encontrados para las otras isoformas relacionadas con esta ruta biosintética (Figura 10D), sugiriendo fuertemente que en este órgano, y no en las hojas,

existe una regulación más precisa de estas enzimas, pues respondieron diferencialmente a la intensidad del estrés y al genotipo en las especies de amaranto estudiadas. En alfalfa y *Arabidopsis* se ha observado una fuerte inducción del gen *STCS* en sequía, lo que sugiere que la estaquiosa, al igual que la rafinosa, juega un papel como osmoprotector (Taji *et al.* 2002, Kang *et al.* 2011). Sin embargo, a diferencia del galactinol y la rafinosa, que se encuentran en todas las angiospermas, la estaquiosa, junto con la verbascosa y otros RFO con mayor grado de polimerización, se han encontrado en pocas especies (Sengupta *et al.* 2015). La expresión de *STCS* en amaranto sugiere la presencia de este metabolito, y posiblemente de algunos otros RFO similares, que podrían estar desempeñando un papel importante en la respuesta al déficit hídrico.

En conjunto, los datos obtenidos en este trabajo, sugieren fuertemente que la expresión de enzimas asociadas a la síntesis de RFO y posiblemente, su posterior acumulación intracelular, desempeñan un rol importante en la respuesta al estrés hídrico en amaranto. Pese a que las distintas especies utilizan, al parecer, los mismos mecanismos para hacer frente a este tipo de estrés, es posible que las especies tolerantes sean más eficientes en la síntesis de estos metabolitos. Es preciso señalar, sin embargo, que no todas las plantas acumulan RFO durante el déficit de agua. *Coleus blumei*, a pesar de ser una planta tolerante a la sequía, mostró una reducción en los niveles de RFO durante el estrés y un aumento en la síntesis de OMI (*O*-metil-inositol). Estas dos rutas metabólicas utilizan mio-inositol como intermediario, lo que sugiere que en *Coleus blumei*, éste se desvía de la ruta de los RFO, quizá como parte de una estrategia de almacenamiento de carbono (Pattanagul y Madore 1999).

En el 2011, se realizó la secuenciación del transcriptoma de *A. hypochondriacus*, parte del cual incluyó el análisis en plántulas de amaranto mantenidas sin agua durante 3 días. De las 20,408 secuencias totales que fueron detectadas, menos de 50 fueron inducidas solamente bajo condiciones de sequía (Délano-Frier *et al.* 2011). Contrariamente a los resultados de este trabajo, no se observó en el transcriptoma una expresión diferencial de los genes analizados en respuesta a déficit hídrico, lo que podría explicarse por la diferencia en la severidad del estrés aplicado. Lo anterior indica que existe abundante información genética asociada al déficit hídrico que debe ser estudiada más a profundidad

para conocer las respuestas del amaranto ante la sequía, las cuales podrían involucrar mecanismos novedosos de tolerancia.

#### **8.4 La sequía ocasiona una acumulación diferencial de azúcares en las distintas especies de amaranto**

El metabolismo de las plantas depende fundamentalmente de la fotosíntesis y de la correcta distribución de azúcares desde las hojas hacia el resto de la planta. Ambos procesos son dependientes de la asimilación del CO<sub>2</sub> y son sensibles a los cambios ambientales (Lemoine *et al.* 2013). Los azúcares solubles no sólo funcionan como recursos energéticos celulares, sino que también actúan como señales, regulando varios procesos asociados con el crecimiento y las transiciones en el desarrollo de las plantas. Las rutas de señalización de azúcares, también interactúan con vías de percepción del estrés, como parte de una red compleja diseñada para modular distintas respuestas metabólicas en las plantas. De modo que estos azúcares pueden actuar directamente como señales o como moduladores de la sensibilidad de las plantas y también pueden jugar roles en las respuestas celulares a señales inducidas por estrés (Tuteja y Gill 2013). Sin embargo, los cambios en los azúcares son dinámicos, y varían dependiendo del genotipo y del tipo de estrés.

En este trabajo se observó que las distintas especies de amaranto, modificaron la concentración de los carbohidratos no estructurales (CNE) como glucosa, fructosa y sacarosa, durante los distintos tratamientos de estrés hídrico a las que fueron sometidas. Las hojas mostraron un aumento significativo de glucosa en sequía moderada y severa. Este cambio fue más notorio en las especies susceptibles *A. caudatus* y *A. hybridus*, que en las especies tolerantes *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*. La fructosa mostró el mismo patrón de acumulación, pero en menor magnitud. De modo que las especies tolerantes acumularon una menor cantidad de ambos azúcares bajo estrés, en comparación con las susceptibles (Figura 15 y 16). Se ha reportado que no todos los CNE solubles juegan los mismos roles durante el estrés. La glucosa, por ejemplo, puede actuar como sustrato para la respiración celular o como soluto compatible para mantener la homeostasis, mientras que la fructosa no se ha visto asociada con osmoprotección, pero sí con la síntesis de metabolitos secundarios (Tuteja y Gill 2013). La acumulación diferencial de estos azúcares

observada en amaranto, podría sugerir diferentes mecanismos de utilización de CNE entre especies tolerantes y susceptibles. Por otro lado, en las raíces, no se encontraron patrones tan definidos, ya que se observó que la concentración de glucosa aumentó únicamente en *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* en condiciones de recuperación, más no en los otros tratamientos (Figura 18 y 19). A su vez, la fructosa sufrió un mínimo incremento, pero estadísticamente significativo bajo estrés en todas las especies, excepto en *A. hypochondriacus*, en donde se observó una mayor acumulación. Cabe destacar que *A. hypochondriacus* mostró un mayor contenido de ambos CNE comparado con el resto de las especies. Sin embargo, de manera muy general, las raíces no sufrieron grandes cambios a lo largo de los tratamientos, ya que el contenido de glucosa y fructosa permaneció prácticamente constante, lo que sugiere que éstos únicamente se están almacenando en este órgano, mientras que la respuesta dinámica ante el estrés podría estar produciéndose en las hojas. En apoyo a esta posibilidad, se cuentan los estudios de los efectos de la deficiencia de agua en plantas sobre el metabolismo de azúcares, donde se ha demostrado que los niveles de CNE son alterados por la sequía principalmente en las hojas (Lemoine 2000).

Es importante señalar que la sacarosa fue el azúcar que se acumuló mayormente en hojas y raíces durante la sequía, y que esta acumulación fue dependiente del grado del estrés y varió entre genotipos y órganos. La sacarosa es la principal forma de transporte del carbono, ya que es exportada desde los órganos fuente a los órganos sumidero, y por lo tanto es crucial para la supervivencia y productividad de las plantas. Durante los tratamientos de estrés, las hojas de amaranto mostraron un incremento gradual de sacarosa. Por ejemplo, en estrés moderado la concentración de sacarosa fue mayor que la detectada en las plantas control o bien regadas, en todas las especies e incrementó aún más en estrés severo. Subsiguientemente, el contenido de sacarosa en plantas recuperadas disminuyó a niveles similares a los presentes en las plantas control (Figura 17). Este aumento en la síntesis de sacarosa durante la escasez de agua también se ha observado en un gran número de plantas, se ha visto que la concentración de sacarosa y hexosas incrementan, mientras que los niveles de almidón, disminuyen a causa del estrés (Pelleschi *et al.* 1997). Este patrón ha sido reportado en hojas de plantas de *Arabidopsis* (Mewis *et al.* 2012), alfalfa (Girousse *et al.* 1996) y algodón (Burke 2007), mantenidas en

condiciones de sequía. Este efecto sugiere que la sacarosa, proveniente de las reservas de almidón en situaciones en las cuales la fijación de carbono disminuye, como en sequía (ver abajo), actúa como suministro de energía para mantener la supervivencia celular. Además, la sacarosa puede acumularse cuando el crecimiento de la planta es limitado, lo que ocurre frecuentemente en situaciones de estrés (Hummel *et al.* 2010). Por el contrario, se ha reportado que en hojas de maíz (Foyer *et al.* 1998), caña de azúcar (Hoffmann 2010) y quínoa (Bascuñán-Godoy *et al.* 2016) no existen cambios en la acumulación de sacarosa durante la sequía. Por lo tanto, los datos obtenidos en amaranto, en conjunto con los reportados en la literatura, demuestran que el contenido y la distribución de los azúcares no siguen un patrón definido, ni en los órganos, ni en los distintos tipos de estrés (Rosa *et al.* 2009).

Además, la sacarosa y otros azúcares, son necesarios en la respuesta de defensa y para la supervivencia de las plantas bajo condiciones de estrés por sequía. Como las hormonas, la sacarosa puede actuar como mensajero principal que controla la expresión de varios genes implicados en el metabolismo de los azúcares (Fracasso *et al.* 2016). Al igual que las hojas, las raíces de todas las especies de amaranto, acumularon más sacarosa que glucosa y fructosa. No obstante, los tratamientos no causaron cambios tan evidentes como en las hojas (Figura 20). Es interesante notar que las raíces de *A. hypochondriacus* mostraron un patrón de acumulación/ disminución de estos CNE muy diferente al resto de las especies, ya que, los contenidos de fructosa y glucosa fueron superiores, mientras que el contenido de sacarosa inferior. Este comportamiento podría indicar que, en esta especie, el déficit hídrico activa la hidrólisis de la sacarosa, ya sea por invertasas y/ o sacarosa sintasas. En general, las respuestas observadas en las plantas de amaranto bajo condiciones de estrés, demuestran que el metabolismo de azúcares es un proceso dinámico que simultáneamente involucra reacciones de degradación y de síntesis. Se observó también, que las respuestas a la deshidratación en esta planta incluyeron la modificación diferencial de distintos grupos de carbohidratos, en forma tejida específica, en las distintas especies. Lo anterior sugiere que estas diferencias podrían contribuir a los diferentes niveles de tolerancia al estrés hídrico observados en las cuatro especies de amaranto estudiadas.

### **8.5 El amaranto disminuye sus reservas de almidón durante el estrés por sequía**

Para llevar a cabo sus funciones de manera óptima, las plantas dependen esencialmente de la luz y deben adaptarse continuamente a los cambios ambientales. Uno de los aspectos fundamentales en esta adaptación, consta de los ciclos circadianos de la síntesis diurna y la degradación nocturna del almidón. La degradación nocturna mantiene al metabolismo basal y la distribución de carbono en ausencia de una fuente de energía externa. Además, en condiciones de estrés, las plantas necesitan redirigir los flujos de carbono a fin de poder responder adecuadamente al alterado suministro y cambio en las demandas de energía de la planta en circunstancias adversas (Thalmann *et al.* 2016).

El almidón es la forma más abundante mediante la cual las plantas almacenan carbohidratos. Las plantas de amaranto bien regadas, mostraron una alta acumulación de este polisacárido en ambos órganos, principalmente en hojas, donde éste es sintetizado. Es sabido que bajo condiciones de estrés existe una estricta regulación de las enzimas que degradan el almidón (Santelia *et al.* 2015), lo que fue consistente con los resultados obtenidos en este estudio. De modo que parte de la respuesta del amaranto ante el estrés hídrico incluyó la disminución de la concentración de almidón en sus hojas y raíces. Este decremento fue dependiente del grado del estrés aplicado, así como de la especie estudiada. Resultó interesante que, en sequía severa, las especies tolerantes *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* agotaron sus reservas de almidón casi en su totalidad, mientras que las especies susceptibles, *A. caudatus* y *A. hybridus* también las redujeron, pero en menor magnitud (Figura 21 y 22). La respuesta observada en las especies tolerantes puede deberse a una mayor eficiencia en la movilización de las reservas de almidón, la cual les permite una rápida aclimatación a las condiciones de estrés. Igualmente, la utilización de las reservas de almidón pudo conducir a la síntesis elevada de sacarosa, como fuente de energía en la planta y al ajuste metabólico durante el estrés, ya que, en las hojas los patrones de aumento y disminución de estos dos azúcares coinciden.

### **8.6 El aminoácido prolina juega un papel osmoprotector en amaranto**

El ajuste osmótico y la acumulación de solutos compatibles, tienen un rol importante en la adaptación de las plantas a la deshidratación, principalmente a través del mantenimiento

de la turgencia y la protección de las funciones celulares específicas por solutos definidos. La acumulación de éstos, es proporcional a la tasa de reducción del agua en la planta y es dependiente del genotipo (Blum 2016). Se ha reportado que en un gran número de especies de plantas, el aminoácido prolina juega un papel osmoprotector en respuesta a distintos tipos de estrés, particularmente en la sequía (Szabados y Saviouré 2009). Además, la prolina puede promover la reparación del daño aumentando la actividad antioxidante y puede servir como fuente de nitrógeno en la célula. La vía principal de biosíntesis de prolina se deriva del ácido glutámico y puede ocurrir tanto en el citosol como en el cloroplasto (Székely *et al.* 2008).

En este trabajo, se detectó la acumulación de prolina en hojas y raíces de las distintas especies de amaranto, principalmente bajo sequía severa. Previamente, ya se había reportado un aumento de este aminoácido en hojas de *A. hypochondriacus* y en plantas de quinoa durante estrés hídrico (Huerta-Ocampo *et al.* 2010, Bascuñán-Godoy *et al.* 2016). Sin embargo, con el fin de evaluar el papel de este osmolito en la tolerancia contrastante a la sequía, se midió en las distintas especies estudiadas. Como se puede observar en las figuras 23 y 24, existe un patrón general de acumulación de prolina en todas las especies de amaranto. Éste consistió en un aumento significativo en estrés severo, y una rápida disminución en condiciones de recuperación hasta alcanzar los niveles de las plantas control, coincidiendo con lo reportado anteriormente. Un reporte previo observó que este decremento, se correlacionó con el uso de carbono y nitrógeno para la síntesis de nuevas moléculas, una vez que la planta superó la condición adversa (Huerta-Ocampo *et al.* 2010).

A pesar de que existen patrones de acumulación conservados entre especies, en las hojas de amaranto se encontraron diferencias cuantitativas evidentes. De modo que los genotipos de amaranto considerados como tolerantes en este trabajo, acumularon significativamente más prolina que los genotipos susceptibles (Figura 23). La mayor concentración de prolina en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, podría estar contribuyendo a mantener la turgencia en este tejido y podría explicar en parte el mayor potencial hídrico obtenido durante los experimentos iniciales. Por otro lado, *A. caudatus* y *A. hybridus* mostraron una menor acumulación de este aminoácido, así como menor tolerancia a la sequía y un potencial hídrico más bajo. En raíces, también hubo una alta acumulación de

prolina en condiciones de escasez de agua. Sin embargo, los contenidos alcanzados fueron menores con respecto a las hojas. Así también, no se encontraron diferencias significativas entre *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus*, mientras que *A. hybridus* acumuló menos prolina (Figura 24).

De igual forma, se observó que en condiciones óptimas de humedad ninguna especie acumuló prolina, resultado que confirmó que este aminoácido contribuye significativamente al ajuste osmótico en los tejidos expuestos a estrés. Asimismo, se ha observado que en plantas de *Arabidopsis* en condiciones de sequía, los esqueletos de carbono derivados de la degradación del almidón, son empleados para la biosíntesis de prolina requerida para enfrentar al estrés osmótico, lo que sugiere que éste no sólo está actuando como un suministro de energía, sino como una fuente de metabolitos necesarios para mantener la supervivencia celular y la actividad metabólica (Zanella *et al.* 2016). Lo anterior coincide con la respuesta de estos compuestos observada durante estrés hídrico en amaranto. Por lo tanto, los resultados sugieren fuertemente que la prolina actúa como osmoprotector en las distintas especies de amaranto. Además, es posible que esté asociado con la tolerancia diferencial al estrés hídrico observada, fungiendo como una molécula importante de protección a la deshidratación en hojas, principalmente.

## 9) CONCLUSIONES

- La tolerancia al estrés hídrico en amaranto de grano y en *A. hybridus* mostró ser dependiente de la especie.
- El amaranto de grano y *A. hybridus*, generaron algunas respuestas comunes ante el estrés hídrico, mientras que otras respuestas fueron particulares de cada especie.
- A nivel cualitativo, las respuestas moleculares, bioquímicas y fisiológicas activadas por estrés hídrico, fueron muy similares en amaranto de grano y en *A. hybridus*. Sin embargo, las diferencias en estas respuestas, a nivel cuantitativo, podrían estar asociadas a la tolerancia diferencial a la sequía observada en amaranto de grano.
- El estrés hídrico en general, no modificó la expresión de los genes asociados al metabolismo de trealosa, a excepción de las isoformas TPS9.1 y TPS9.2. Las cinasas SnRK tampoco se vieron afectadas por ningún tratamiento y en ninguna especie de amaranto.
- La abundancia relativa del gen codificante para la proteína LEA14, sugiere que éste tiene una función relevante en la respuesta a distintas intensidades de estrés hídrico en amaranto.
- La expresión de genes marcadores del ácido abscísico (ABA) en amaranto sujeto a estrés hídrico fue irregular, lo que sugiere la participación de rutas de señalización independientes de ABA en la activación de respuestas asociadas con tolerancia a estrés hídrico en estas plantas.
- Los patrones de expresión de los genes codificantes para los oligosacáridos de la familia de la rafinosa, principalmente en las raíces, sugieren que tienen un rol muy importante en la respuesta a la sequía en amaranto, ya que su expresión fue dependiente del grado de estrés y de la especie. Dicha expresión se pudo correlacionar con la tolerancia/ susceptibilidad en las especies estudiadas.

- Los cambios en los carbohidratos no estructurales a causa de la sequía, siguieron tendencias dependientes del estrés y del genotipo. Principalmente se observó la acumulación de sacarosa y la disminución de almidón, bajo sequía severa en amaranto de grano y en *A. hybridus*.
- La prolina tiene un papel importante como osmoprotector en amaranto, ya que se acumuló en estrés severo, especialmente en las hojas, donde mostró mayor abundancia en las especies tolerantes.

## 10) PERSPECTIVAS

- Llevar a cabo un mayor número de mediciones fisiológicas para determinar el origen de los distintos niveles de tolerancia observadas en las distintas especies de amaranto. Algunos ejemplos serían determinar cambios en el tamaño de raíz, el contenido de clorofila en las hojas, en la conductancia estomática, etcétera.
- Debido a los patrones observados durante la sequía y por la escasa información existente, sería interesante realizar un análisis funcional de los genes *AhTPS9.1* y *AhTPS9.2*, con el fin de entender su rol durante el estrés hídrico, ya sea mediante silenciamiento génico o sobreexpresión.
- Determinar el contenido de trealosa y T6P en los distintos tratamientos de estrés hídrico, con el objetivo de lograr una mejor interpretación sobre la regulación de estos azúcares en amaranto.
- Dados los resultados obtenidos en la medición de la expresión génica de los RFO, será necesario cuantificar los metabolitos galactinol, rafinosa, estaquiosa y otros RFO de mayor grado de polimerización que posiblemente se acumulen en forma diferencial en amaranto durante estrés hídrico. Será necesario confirmar su posible papel osmoprotector y esclarecer si están involucrados en la tolerancia diferencial al estrés hídrico observado entre las especies de amaranto.
- Dados los reportes existentes, y para lograr un mayor entendimiento sobre la regulación de la respuesta al estrés hídrico en amaranto, sería interesante vincular los resultados de RFO obtenidos con el metabolismo de ornitina y/ o de O-metil-inositol.
- Para obtener mayor información sobre las respuestas al estrés hídrico en amaranto, y basados en los reportes existentes, se podrían complementar estos resultados con la medición de los niveles de antioxidantes como glutatión y ácido ascórbico, entre otros.

## 11) BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, G. K., Jwa, N. S., Lebrun, M. H., Job, D., & Rakwal, R. (2010). Plant secretome: Unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics*, *10* 799–827.
- Albanil, A., & Pascual, R. (2015). Reporte Anual 2015 (CONAGUA), Servicio Meteorológico Nacional. Obtenido de: <http://smn1.conagua.gob.mx/climatologia/analisis/reporte/Anual2015.pdf>.
- Altman, A. (2003). From plant tissue culture to biotechnology: Scientific revolutions, abiotic stress tolerance, and forestry. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *39*(2), 75–84.
- Alves, A., & Setter, T. L. (2004). Abscisic acid accumulation and osmotic adjustment in cassava under water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, *51*, 259–271.
- Ashraf, M., Ozturk, M., & Athar, H. R. (2009). *Salinity and Water Stress: Improving Crop Efficiency*, (1)1–13. Springer.
- Bachmann, M., & Keller, F. (1994). Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of *Ajuğa reptans* L. (Inter- and Intracellular Compartmentation). *Plant Physiology*, *109*(105),
- Bae, H., Herman, E., Bailey, B., Bae, H. J., & Sicher, R. (2005). Exogenous trehalose alters Arabidopsis transcripts involved in cell wall modification, abiotic stress, nitrogen metabolism, and plant defense. *Physiologia Plantarum*, *125*(1), 114–126.
- Baena-González, E. (2010). Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. *Molecular Plant*, *3*(2), 300–313.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., & Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, *448*(7156), 938–42.
- Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *24*(1), 23–58.
- Bascañan-Godoy, L., Reguera, M., Abdel-Tawab, Y. M., & Blumwald, E. (2016). Water deficit stress-induced changes in carbon and nitrogen partitioning in *Chenopodium quinoa* Willd. *Planta*, 591–603.
- Benaroudj, N.; Lee, DH. & Goldberg AL. (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276, No. 26, (June 2001), 24261-24267, ISSN 0021-9258
- Berger, A., Gremaud, G., Baumgartner, M., Rein, D., Monnard, I., Kratky, E., et al. (2003). Cholesterol-lowering properties of amaranth grain and oil in hamsters. *Int J Vitam Nutr Res*, *73*(1), 39-47.
- Bhargava, S., & Sawant, K. (2013). Drought stress adaptation: Metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*, *132*(1), 21–32.

- Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., & Sharma, K. K. (2008). Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: Retrospect and prospects. *Plant Cell Reports*, 27(3), 411–424.
- Bitá, C. E., & Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*, 4(July), 273.
- Blum, A. (2005). Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research*, 56, 1159–1168.
- Blum, A. (2016). Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant, Cell & Environment*, 1–7.
- Blumwald, E. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(4), 431–434.
- Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2(2), 48–54.
- Brenner, D.M., Baltensperger, D.D., Kulakow, P.A., Lehmann, J.W., Myers, R.L., Slabbert, M.M., Sleugh, B.B. (2000). Genetic resources and breeding of Amaranthus. *Plant Breed. Rev.*, 19: 227–285.
- Burke, J. J. (2007). Evaluation of source leaf responses to water-deficit stresses in cotton using a novel stress bioassay. *Plant Physiol.* 143, 108–121.
- 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. *Journal of Plant Physiology*, 171(11), 927–939.
- Caselato-Sousa, V. M., & Amaya-Farfán, J. (2012). State of knowledge on amaranth grain: a comprehensive review. *Journal of Food Science*, 77(4), R93–104.
- 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 Biology*, 12, 163.
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F. W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Francia, E., Stanca, A. M. (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research*, 105(1-2), 1–14.
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F. W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Francia, E., ... Stanca, A. M. (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research*, 105(1-2), 1–14.
- Cisneros-Hernández, I. (2016). *Cambios en la expresión génica de reguladores maestros del metabolismo en respuesta a la defoliación severa en amaranto de grano durante el desarrollo*. (Tesis de maestría no publicada). CINVESTAV, Irapuato, México.

- Clauw, P., Coppens, F., De Beuf, K., Dhondt, S., Van Daele, T., Maleux, K., Inzé, D. (2015). Leaf responses to mild drought stress in natural variants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 167(3), 800–16.
- Comas, L. H., Becker, S. R., Cruz, V. M. V., Byrne, P. F., & Dierig, D. (2013). Root traits contributing to plant productivity under drought. *Frontiers in Plant Science*, 4(November), 442.
- Crowe, JH; Hoekstra, FA & Crowe, LM. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*. Vol. 54, (March 1992), 579-599.
- Danquah, A., de Zelicourt, A., Colcombet, J., & Hirt, H. (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances*, 32(1), 40–52.
- Délano-Frier, J. P., Avilés-Arnaut, H., Casarrubias-Castillo, K., Casique-Arroyo, G., Castrillón-Arbeláez, P. A, Herrera-Estrella, L., Massange-Sánchez, J., Martínez-Gallardo, N., Parra-Cota, F.I., Vargas-Ortiz, E., Estrada-Hernández, M. G. (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(1), 363.
- Délano-Frier, J. P., Martínez-Gallardo, N., Martínez-de la Vega, O., Salas-Araiza, M. D., Barbosa-Jaramillo, E. R., Torres, A., Borodanenko, A. (2004). The effect of exogenous jasmonic acid on induced resistance and productivity in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) is influenced by environmental conditions. *Journal of Chemical Ecology*, 30(5), 995–1027.
- Delatte, T. L., Sedijani, P., Kondou, Y., Matsui, M., de Jong, G. J., Somsen, G. W., Schluemann, H. (2011). Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. *Plant Physiology*, 157(1), 160–74.
- Delorge, I., Janiak, M., Carpentier, S., & Van Dijck, P. (2014). Fine tuning of trehalose biosynthesis and hydrolysis as novel tools for the generation of abiotic stress tolerant plants. *Frontiers in Plant Science*, 5(April), 1–9.
- dos Santos, T. B., Budzinski, I. G. F., Marur, C. J., Petkowicz, C. L. O., Pereira, L. F. P., & Vieira, L. G. E. (2011). Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(4), 441–448.
- Dos Santos, T. B., De Lima, R. B., Nagashima, G. T., De Oliveira Petkowicz, C. L., Carpentieri-Pípolo, V., Pereira, L. F. P., & Vieira, L. G. E. (2015). Galactinol synthase transcriptional profile in two genotypes of *Coffea canephora* with contrasting tolerance to drought. *Genetics and Molecular Biology*, 38(2), 182–190.
- Downie, B., Gurusinge, S., Dahal, P., Thacker, R. R., Snyder, J. C., Nonogaki, H., Bradford, K. J. (2003). Expression of a GALACTINOL SYNTHASE Gene in Tomato Seeds Is Up-Regulated before Maturation Desiccation and Again after Imbibition whenever Radicle Protrusion Is Prevented. *Plant Physiology*, 131(March), 1347–1359.

- Drennan, P. M., M. T. Smith, D. Goldsworthy, and J. Van Staden. (1993). The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* Welw. *Plant Physiol.* 142:493–496.
- Eastmond, P. J., Li, Y., & Graham, I. A. (2003). Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants? *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 533–537.
- Eastmond, P. J., Van Dijken, A. J. H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A. F., Dickinson, H. G., Graham, I. A. (2002). Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant Journal*, 29(2), 225–235.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., & Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: A multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4), 17–27.
- Elbein, A.D. (1974). The metabolism of a, a-trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30: 227–257.
- Elsayed, a. I., Rafudeen, M. S., & Gollack, D. (2014). Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: Protection against abiotic stress. *Plant Biology*, 16(1), 1–8.
- Espitia Rangel, E. (Ed.). (2012). *Amaranto: Ciencia y Tecnología*. (2nd ed.). México, D.F.: INIFAP.
- FAO (Food and Agriculture Organization, United Nations) (2003) Unlocking the water potential of agriculture. [www.fao.org](http://www.fao.org). Accessed 25 July 2016.
- Fernandez, O., Béthencourt, L., Quero, A., Sangwa, R. S., & Clément Christophe, C. (2010). Trehalose and plant stress responses: Friend or foe? *Trends in Plant Science*, 15(7), 409–417.
- Foyer, C., Valadier, M., Migge, A., & Becker, T. (1998). Drought-Induced Effects on Nitrate Reductase Activity and mRNA and on the Coordination of Nitrogen and Carbon Metabolism in Maize Leaves. *Plant Physiology*, 283–292.
- Fracasso, A., Trindade, L. M., & Amaducci, S. (2016). Drought stress tolerance strategies revealed by RNA-Seq in two sorghum genotypes with contrasting WUE. *BMC Plant Biology*, 16, 115.
- Garg, A. K., Kim, J.-K., Owens, T. G., Ranwala, A. P., Choi, Y. Do, Kochian, L. V., & Wu, R. J. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), 15898–15903.
- Gilbert, G. A., Wilson, C., & Madore, M. A. (1997). Root-Zone Salinity Alters Raffinose Oligosaccharide Metabolism and Transport in *Coleus*. *Plant Physiology*, 115, 1267–1276.
- Girousse, C., Moulia, B., Silk, W., and Bonnemain, J. L. (2005). Aphid infestation causes different changes in carbon and nitrogen allocation in alfalfa stems as well as different inhibitions of longitudinal and radial expansion. *Plant Physiol.* 137, 1474–1484.
- Gómez, L. D., Gilday, A., Feil, R., Lunn, J. E., & Graham, I. A. (2010). AtTPS1-mediated trehalose 6-phosphate synthesis is essential for embryogenic and vegetative growth and responsiveness to ABA in germinating seeds and stomatal guard cells. *Plant Journal*, 64(1), 1–13.

- Hare, P. D., & Cress, W. A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21(2), 79–102.
- Hazen, S. P., Wu, Y., & Kreps, J. A. (2003). Gene expression profiling of plant responses to abiotic stress. *Functional & Integrative Genomics*, 3(3), 105–111.
- Henry, C., Bledsoe, S. W., Siekman, A., Kollman, A., Waters, B. M., Feil, R., Lagrimini, L. M. (2014). The trehalose pathway in maize: Conservation and gene regulation in response to the diurnal cycle and extended darkness. *Journal of Experimental Botany*, 65(20), 5959–5973.
- Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *Plant Journal*, 61(6), 1041–1052.
- Hoffmann, C. M. (2010). Sucrose accumulation in sugar beet under drought stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 196(4), 243–252.
- Hottiger, T.; Boller, T. & Wiemken, A. (1987). Rapid changes of heat and desiccation content correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Letters*. Vol. 220, No. 10, (October 2008), 1223-1229.
- Hounsa, CG.; Brandt.; Thevelein, J.; Hohmann, S. & Prior, BA. (1998). Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*. Vol. 144, Pt. 3, (March 1998), 671-680.
- Huerta-Ocampo, J. A., León-Galván, M. F., Ortega-Cruz, L. B., Barrera-Pacheco, A., De León-Rodríguez, A., Mendoza-Hernández, G., & Barba de la Rosa, A. P. (2011). Water stress induces up-regulation of DOF1 and MIF1 transcription factors and down-regulation of proteins involved in secondary metabolism in amaranth roots (*Amaranthus hypochondriacus* L.). *Plant Biology*, 13(3), 472–482.
- Huerta-Ocampo, J., & Barba de la Rosa, A. (2011). Amaranth: A Pseudo-Cereal with Nutraceutical Properties. *Current Nutrition & Food Science*, 7(1), 1–9.
- Hummel, I., Pantin, F., Sulpice, R., Piques, M., Rolland, G., & Dauzat, M., et al. (2010). Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiol.* 154, 357– 372.
- Iordachescu, M., & Imai, R. (2008). Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(10), 1223–1229.
- Iturriaga G., Gaff D. F., Zentella R. (2000). New desiccation-tolerant plants including a grass, in the central highlands of Mexico, accumulate trehalose. *Aust. J. Bot.* 48 153–158.
- Johnson, B., & Henderson, T. (2002). Water use patterns of grain amaranth in the northern Great Plains. *Agronomy Journal*, 1437–1443.
- Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A., Lone, A. A., Singla-Pareek, S. L. (2016). Transcription Factors and Plants Response to Drought Stress: Current Understanding and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1029.

- Kang, Y., Han, Y., Torres-Jerez, I., Wang, M., Tang, Y., Monteros, M., & Udvardi, M. (2011). System responses to long-term drought and re-watering of two contrasting alfalfa varieties. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 68(5), 871–89.
- Karim, S., Aronsson, H., Ericson, H., Pirhonen, M., Leyman, B., Welin, B., Holmström, K. O. (2007). Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. *Plant Molecular Biology*, 64(4), 371–386.
- Karner, U., Peterbauer, T., Raboy, V., Jones, D. A., Hedley, C. L., & Richter, A. (2004). myo-Inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. *Journal of Experimental Botany*, 55(405), 1981–1987.
- Keller, F., Pharr, D. (1996) *Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: galactosyl- sucrose oligosaccharides*. In: Zamski E, Schaffer AA, editors. Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships. New York: Marcel Dekker.
- 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 Science*, 54(1), 220–228.
- Kigel, J. (1994). Development and ecophysiology of amaranths. Pp. 39- 73 in *Amaranth: Biology, Chemistry, and Technology* (O. ParedesLópez, ed.). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kosmas, S. A., Argyrokastritis, A., Loukas, M. G., Eliopoulos, E., Tsakas, S., & Kaltsikes, P. J. (2006). Isolation and characterization of drought-related trehalose 6-phosphate-synthase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta*, 223(2), 329–339.
- Kulik, A., Wawer, I., Krzywińska, E., Bucholc, M., & Dobrowolska, G. (2011). SnRK2 Protein Kinases—Key Regulators of Plant Response to Abiotic Stresses. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 15(12), 859–872.
- Lemoine, R. (2000). Sucrose transporters in plants: Update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1465(1–2), 246–262. [http://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00142-5](http://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00142-5)
- Lemoine, R., La Camera, S., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., & Durand, M. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science*, 4(July), 272.
- Leyman, B., Van Dijck, P., & Thevelein, J. M. (2001). An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science*, 6(11), 510–513.
- Li, Z., Wakao, S., Fischer, B. B., & Niyogi, K. K. (2009). Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 239–60.
- 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 (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
- Lunn, J. E., Delorge, I., Figueroa, C. M., Van Dijck, P., & Stitt, M. (2014). Trehalose metabolism in plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 544–567.

- Lunn, J. E., Feil, R., Hendriks, J. H., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., Stitt, M. (2006). Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J*, 397(1), 139–148.
- Madlung, A., & Comai, L. (2004). The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals of Botany*, 94(4), 481–495.
- Mahajan, S., Mahajan, S., Tuteja, N., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2), 139–58.
- Martins, M. C. M., Hejazi, M., Fettke, J., Steup, M., Feil, R., Krause, U., Lunn, J. E. (2013). Feedback inhibition of starch degradation in *Arabidopsis* leaves mediated by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiology*, 163(3).
- McClung de Tapia, E., Martínez Yrizar, D., Ibarra Morales, E., & Adriano Morán, C. C. (2014). Los orígenes prehispánicos de una tradición alimentaria en la cuenca de México. *Anales de Antropología*, 48(1), 97–121.
- Mewis, I., Khan, M. A. M., Glaw- ischnig, E., Schreiner, M., and Ulrichs, C. (2012). Water stress and aphid feeding differentially influence metabolite composition in *Arabidopsis thaliana* (L.). *PLoS ONE*.
- Moumeni, A., Satoh, K., Venuprasad, R., Serraj, R., Kumar, A., Leung, H., & Kikuchi, S. (2015). Transcriptional profiling of the leaves of near-isogenic rice lines with contrasting drought tolerance at the reproductive stage in response to water deficit. *BMC Genomics*, 16(1), 1110.
- Mújica, A; M. Berti & José Izquierdo (1997). El cultivo de amaranto (*Amaranthus spp.*): Producción, Mejoramiento Genético y Utilización. 145p. FAO. Oficina Regional para América Latina y el Caribe, Santiago, Chile.
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2014). The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in Plant Science*, 5(May), 170.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., & Shigeoka, S. (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*, 147(3), 1251–1263.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L.-S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5(March), 86.
- Panikulangara, T. J., Eggers-schumacher, G., Wunderlich, M., Stransky, H., Pflanzen, M. Der, & P, A. G. T. J. (2004). Galactinol synthase1. A Novel Heat Shock Factor Target Gene Responsible for Heat-Induced Synthesis of Raffinose Family Oligosaccharides in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136(October), 3148–3158.
- Pareek A., Sopory S. K., Bohnert H. K., Govindjee (2010). Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation. Dordrecht: *Springer*.

- Parent, B., Hachez, C., Redondo, E., & Simonneau, T. (2012). Drought and Abscisic Acid Effects on Aquaporin Content Translate into Changes in Hydraulic Conductivity and Leaf Growth Rate: A Trans-Scale Approach. *Plant Physiology*, *149*, 2000–2012.
- Pattanagul, W., & Madore, M. a. (1999). Water Deficit Effects on Raffinose Family Oligosaccharide Metabolism in Coleus. *Plant Physiology*, *121*(11), 987–993.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurreea, D., & Zhang, Y. (2008). Trehalose Metabolism and Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, *59*(1), 417–441.
- Pelleschi, S., Rocher, J. P., and Prioul, J. L. (1997). Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant Cell Environ.* *20*, 493–503.
- Pennisi, E. (2008). Plant genetics. The blue revolution, drop by drop, gene by gene. *Science*, *320*(5873), 171–173.
- Peterbauer, T., Lahuta, L. B., Blo, A., Mucha, J., Jones, D. A., Hedley, C. L., Richter, A. (2001). Analysis of the Raffinose Family Oligosaccharide Pathway in Pea Seeds with Contrasting Carbohydrate Composition 1, *127*, 1764–1772.
- Peters, S., & Keller, F. (2009). Frost tolerance in excised leaves of the common bugle (*Ajuga reptans* L.) correlates positively with the concentrations of raffinose family oligosaccharides (RFOs). *Plant, Cell and Environment*, *32*(8), 1099–1107.
- Peters, S., Mundree, S. G., Thomson, J. A., Farrant, J. M., & Keller, F. (2007). Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): Both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, *58*(8), 1947–1956.
- Pramanik, M. H. R., & Imai, R. (2005). Functional identification of a trehalose 6-phosphate phosphatase gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice. *Plant Molecular Biology*, *58*(6), 751–762.
- R Development Core Team. (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.r-project.org/>
- Ramon, M., De Smet, I., Vandesteene, L., Naudts, M., Leyman, B., Van Dijck, P., Thevelein, J. M. (2009). Extensive expression regulation and lack of heterologous enzymatic activity of the Class II trehalose metabolism proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, *32*(8), 1015–1032.
- Ramon, M., Rolland, F., & Sheen, J. (2008). Sugar sensing and signaling. *The Arabidopsis Book*, *6*, e0117.
- Ramon, M., Rolland, F., Thevelein, J. M., Van Dijck, P., & Leyman, B. (2007). ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown. *Plant Molecular Biology*, *63*(2), 195–206.

- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., & Mittler, R. (2004). When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiology*, *134*, 1683–1696.
- Rodas, B., & Bressani, R. (2009). The oil, fatty acid and squalene content of varieties of raw and processed amaranth grain. *Arch Latinoam Nutr*, *59*(1), 82-87.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J. a, Hilal, M., & Prado, F. E. (2009). Soluble sugars-metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. *Plant Signaling & Behavior*, *4*(5), 388–393.
- Saito, M., & Yoshida, M. (2011). Expression analysis of the gene family associated with raffinose accumulation in rice seedlings under cold stress. *Journal of Plant Physiology*, *168*(18), 2268–2271.
- Salerno, G. L., & Curatti, L. (2003). Origin of sucrose metabolism in higher plants: When, how and why? *Trends in Plant Science*, *8*(2), 63–69.
- Santelia, D., Trost, P., & Sparla, F. (2015). New insights into redox control of starch degradation. *Current Opinion in Plant Biology*, *25*, 1–9.
- Sauer, J. D. (1967). The grain Amaranths and their relatives: A revised taxonomic and geographic survey. *Ann. Missouri Bot Gard*. *54*: 103–137.
- Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S., & Paul, M. (2003). Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(11), 6849–6854.
- Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M., & Smeekens, S. (2004). Trehalose Mediated Growth Inhibition of Arabidopsis Seedlings Is Due to Trehalose-6-Phosphate Accumulation. *Plant Physiology*, *135*(2), 879–890.
- Sengupta, S., Mukherjee, S., Basak, P., & Majumder, A. L. (2015). Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*, *6*(August), 1–11.
- Shao, H., Guo, Q., Chu, L., Zhao, X., Su, Z., Hu, Y., & Cheng, J. (2007). Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, *54*(1), 37–45.
- Stevenson, J. M., Perera, I. Y., Heilmann, I., Persson, S., & Boss, W. F. (2000). Inositol signaling and plant growth. *Trends in Plant Science*, *5*(6), 252–258.
- Szabados, L., & Saviouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, *15*(2), 89–97.
- Székely, G., Ábrahám, E., Cséplő, Á., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., & Szabados, L. (2008). Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant Journal*, *53*(1), 11–28.

- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., & Shinozaki, K. (2002). Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 29(4), 417–426.
- Thalmann, M., Pazmino, D., Seung, D., Horrer, D., Nigro, A., Tiago M., Kolling, K., Zeeman, S., & Santelia D. (2016) Regulation of leaf starch degradation by abscisic acid is important for osmotic stress tolerance in plants. *The Plant Cell*. 28(8): 1860–1878.
- Thameur, A., Ferchichi, A., & López-Carbonell, M. (2011). Quantification of free and conjugated abscisic acid in five genotypes of barley (*Hordeum vulgare* L.) under water stress conditions. *South African Journal of Botany*, 77(1), 222–228. JOUR.
- Thole, J. M., & Nielsen, E. (2008). Phosphoinositides in plants: novel functions in membrane trafficking. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(6), 620–631.
- Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), 145–154.
- Tinner, W., & Kandler, O. (1968). myo-Inositol, a Cofactor in the Biosynthesis of Stachyose. *European J. Biochem.*, (4), 233–239.
- Tsai, A. Y. L., & Gazzarrini, S. (2014). Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture. *Frontiers in Plant Science*, 5, 119.
- Tuteja N., & Gill S. (2013). Climate change and plant abiotic stress tolerance. *Wiley Online Library*.
- Ulbricht, C., Abrams, T., Conquer, J., Costa, D., Grimes, M., Taylor, S. & Varghese, M. (2009) An Evidence-Based Systematic Review of Amaranth (*Amaranthus* spp.). *Journal of Dietary Supplements*. 6: 390-417.
- Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., & Tanokura, M. (2010). Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport ABA is a major phytohormone that regulates a broad range. *Plant & Cell Physiology*, 51(11), 1821–1839.
- Van den Ende, W. (2013). Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Frontiers in Plant Science*, 4(July Article 247), 1–11.
- van Dijken, A. J. H., Schlupepmann, H., & Smeekens, S. C. M. (2004). *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiology*, 135(2), 969–977.
- Vandesteene, L., Lopez-Galvis, L., Vanneste, K., Feil, R., Maere, S., Lammens, W., Van Dijck, P. (2012). Expansive Evolution of the trehalose-6-phosphate phosphatase Gene Family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 160(2), 884–896.
- Vandesteene, L., Ramon, M., Le Roy, K., Van Dijck, P., & Rolland, F. (2010). A single active trehalose-6-P synthase (TPS) and a family of putative regulatory TPS-like proteins in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 3(2), 406–419.

- 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(7), 1–13.
- Velasco, A., & Villeda, S. (2016). El amaranto. *Arqueología Mexicana*. 138, 21.
- Walter, J., Nagy, L., Hein, R., Rascher, U., Beierkuhnlein, C., Willner, E., & Jentsch, A. (2011). Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. *Environmental and Experimental Botany*, 71(1), 34–40.
- Wang, C., Yang, A., Yin, H. & Zhang, J. (2008), Influence of Water Stress on Endogenous Hormone Contents and Cell Damage of Maize Seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (427–434).
- Wang, R.-S., Pandey, S., Li, S., Gookin, T. E., Zhao, Z., Albert, R., & Assmann, S. M. (2011). Common and unique elements of the ABA-regulated transcriptome of Arabidopsis guard cells. *BMC Genomics*, 12(1), 216. article.
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1–14.
- Wang, Z., Zhu, Y., Wang, L., Liu, X., Liu, Y., Phillips, J., & Deng, X. (2009). A WRKY transcription factor participates in dehydration tolerance in *Boea hygrometrica* by binding to the W-box elements of the galactinol synthase (BhGOLS1) promoter. *Planta*, 230(6), 1155–1166.
- Weber, L.E. (1990). Amaranth grain production guide. *Rodale Press, Emmaus, PA*. 28.
- Wingler, A., Fritzius, T., Wiemken, A., Boller, T., & Aeschbacher, R. A. (2000). Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 124(1), 105–114.
- Wright, D. P., Read, D. J., & Scholes, J. D. (1998). Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment*, 21(9), 881–891.
- Xie ZJ, Jiang D, Cao WX, Dai TB, & Jing Q. (2003). Relationships of endogenous plant hormones to accumulation of grain protein and starch in winter wheat under different post anthesis soil water statuses. *Plant Growth Regul*, 41(117-127).
- Xu, Z., Zhou, G., & Shimizu, H. (2010). Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signaling & Behavior*, (June), 649–654.
- Yadav, U. P., Ivakov, A., Feil, R., Duan, G. Y., Walther, D., Giavalisco, P., Lunn, J. E. (2014). The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: Specificity and mechanisms of sucrose signalling by. *Journal of Experimental Botany*, 65(4), 1051–1068.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010), AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal*, 61 (672–685).

- Zanella, M., Borghi, G. L., Pirone, C., Thalmann, M., Pazmino, D., Costa, A., & Sparla, F. (2016). *B*-amylase 1 (BAM1) degrades transitory starch to sustain proline biosynthesis during drought stress. *Journal of Experimental Botany*, *67*(6), 1819–1826.
- Zeeman, S. C., Kossmann, J., & Smith, A. M. (2010). Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *61*, 209–234.
- Zhang, L., & Becker, D. F. (2015). Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 552.
- Zhang, Y., Primavesi, L. F., Jhurreea, D., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A. C., Powers, S. J., Paul, M. J. (2009). Inhibition of SNF1-Related Protein Kinase1 Activity and Regulation of Metabolic Pathways by Trehalose-6-Phosphate. *Plant Physiology*, *149*(4), 1860–1871.
- Zhao, T. Y., Martin, D., Meeley, R. B., & Downie, B. (2004). Expression of the maize GALACTINOL SYNTHASE gene family: (II) Kernel abscission, environmental stress and myo-inositol influences accumulation of transcript in developing seeds and callus cells. *Physiologia Plantarum*, *121*(4), 647–655.
- Zhao, T. Y., Thacker, R., Corum, J. W., Snyder, J. C., Meeley, R. B., Obendorf, R. L., & Downie, B. (2004). Expression of the maize GALACTINOL SYNTHASE gene family: (I) Expression of two different genes during seed development and germination. *Physiologia Plantarum*, *121*(4), 634–646.
- Zhou, M. L., Zhang, Q., Zhou, M., Sun, Z. M., Zhu, X. M., Shao, J. R., & Wu, Y. M. (2012). Genome-wide identification of genes involved in raffinose metabolism in Maize. *Glycobiology*, *22*(12), 1775–1785.
- Zhou, T., Zhang, R., & Guo, S. (2011). Molecular Cloning and Characterization of GhGolS1, a Novel Gene Encoding Galactinol Synthase from Cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Molecular Biology Reporter*, *30*(3), 699–709.
- Zhu, J. K. (2001). Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology*, *4*(5), 401–406.
- Zuther, E., Büchel, K., Hundertmark, M., Stitt, M., Hinch, D. K., & Heyer, A. G. (2004). The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, *576*(1-2), 169–173.

## 12) APÉNDICES

Apéndice 1. Fotografías de las especies de amaranto utilizadas en este trabajo.



*A. hypochondriacus*



*A. cruentus*



*A. caudatus*



*A. hybridus*

**Apéndice 2.** Secuencias y traducción *in silico* de los transcritos provenientes del transcriptoma de amaranto utilizados en este trabajo (Délano-Frier 2011). Además, se muestra el primer resultado del alineamiento contra *Arabidopsis thaliana* y *Beta vulgaris*, así como los sitios de unión de los oligonucleótidos y la región amplificada mediante qRT-PCR.

**Nombre del gen:** RABC2a o RAB18

🌱 **Isotig:** 10826  
 🌱 **Isogrupo:** 06085  
 🌱 **Longitud:** 1123

**Secuencia (ARNm):**

AGAGAATGTGTATGAGATAAATATTTTCTTTCCTAATAAGGATCATTTTCTAGCAGTACAGCGCATTAAAGCGTTCA  
 ACAATAGATATATCATTGTCAGTTCATACAAACTGTTCTGCTGATCTATACGTACAAGCTCTCGAGGCTGAGGCT  
 ACAAACCCATATGCCGAGACGAGACAAAACGCCATGCCTGTGAACTCACTATTATACAAACTCATAACATGTTT  
 TTCGACTCCTATGATACAACTGAAGCGCA**GCCCAGTGAAACAAGCAATAC**AGCAGAGAAGTAAAAGAAACAA  
 AAGAATTACCATGTACATAATTCGACAGCAACATTCCACAAATAACGAAGTGCAGTTCAGTTAAGACCCATTT  
 TT**GAAGTTACGGAGTCTCTGGC**TTAAGCACAAACCACTCGAAGCAGGTGTCCTTTGCTCTTGCTTGTTT  
 CAAGACGTTCCTTTTCCCGCATTAGTTCCTTCTTCCAACAGACTCGGAACATCCATAATCTTCAAAGCAAGCTC  
 TTGAAAGCACTGCTCTACATTTTCTCGAGTTTTAGCGCTGCATTCAAGAAATAGACTTCCTAACTGTTGCGCAAG  
 AGCCGAACCTTCTTCCCTAGTCACAGCTCTTCCGAATCCTTATCAACTTTATTTCCGACAAGCATCCTCACACA  
 ATCTTGATTAGTTGAATAAAGCTCAACCTCTTAGCCCAAACATCCGACAAGTTGGTAAAAGTCTCTTCTAGT  
 GACATCATACTAAAATAATCCCTTGGGCCCTCTGTAGTAGGAAGTTGTTAATGTTCTGAACCTCTCTTGCC  
 AGCGGTGTCCCATATCGTAAGTTTTATCCTCTTTTACGAACAGTGAGCATCTTAATCTTGAAATCCACTCCAAT  
 AGTAGGAGTAAGATCATCAAGAACATTAGAAATGAAGCTAACAAGTAACTACTTTTACCCACACCAGAATCACC  
 AATTAACAACACTTTAAATGATAGATCATATGAAGAAGCTTGATTATTTGAAGTTGAACCCATTTTTTTATCTTTAT  
 TCATATATTTCCCCTCTCTAGATTCAATATTTATGTATTTATGTGTGTGTA AAAATAAAAAATGGAGCTTTT

**Alineamiento:**

Organismo	Descripción	Cobertura (%)	Identidad (%)
<i>B. vulgaris</i>	Ras-related protein RABC2a	69%	81%
<i>A. thaliana</i>	Ras-related protein RABC2a	51%	76%

**Secuencia (Proteína 3'5'):**

KLHFLFLHTHKYINIESREGKYMNDKMKMGSTSNQASSYDLSFKVLLIGDSGVGKSSLLVFSISNVLDDLT  
 PTIGVDFKIKMLTVREKRIKLIWDTAGQERFRTLTSYRGAQGIIIVYDVTRRETFTNLSDVWAKEVELYST  
 NQDCVRMLVGNKVDKDSERAVTREGSALAQLGSLFLECSAKTRENVEQCFQELALKIMDVPSLLEEETN  
 AGKRNVLKHKQEQRTPASSGCCA\*ARDSVNFKNGS\*TAVALRYLWNVAVELCTW\*FFCFYFSAVLLVSLG  
 CASVYHRSRKTCYEFV\*\*\*VSQAWRFVSSRHMGL\*PQPRELVRIDQQNSLYELTMIYLLLNACAVLLEND  
 PY\*ERKYLSTHSL

Nombre del gen: PP2C o ABI1

🌸 Isotig: 05786  
 🌸 Isogrupo: 01931  
 🌸 Longitud: 1224

**Secuencia:**

CGTCGTAACACCTTCAAATGAGGATAACTACGATTCACAAGGAAGCACGTGCAGCGGAGTGCACGGTGCCGT  
 GTCGGTGATGGGAAGAAGAAGAGAAATGGAAGACGCGTTACAGTCGAGAAAGATTTAGTTTTAGAAAGTAC  
 GATTACTTCGGAGTATACGACGGTCATGGAGGTAGTCAAGTGGCGGAAGCGTGTAGAGACCGGATGCACTCG  
 ATTCTTCTAGAAGAGATGGAGAGATGTGATACGCGGATGAAAATTAACGGTCCGATGAAGATGAAGATAACG  
 GTAACGGCGAAAATGATAAAGAAAATGTTGATTGGGAGAAGGTGATGGGGAAGTGTTCGCCAGAATGGATGA  
 AGAAGTTGGAAGAGGAGGAGAGAGAGAGATAATGTGGAAGAAATGACGGTGGGGTCCACAGTAGTGGTTG  
 CTGTTGTAGGGAGGGAAGAGGTTGTTGTGGCGAATTGTGGAGATTCTAGGGCTGTTATTTGTCGTAACGGTGT  
 TGCTGTTCCGTTATCCGTTGATCATAAGCCCACAGACCAGACGAGTTGGCTAGAATTGAAGACGCTGGTGGT  
 CGAGTGATCAACTGGAATGGCTATCGTGTCTTGGAGTCTTGGCGACTTCGAGATCAATAGGCGACTATTACCT  
 AAAACCGTATGTATCGTCCATAACCGAAGTTATGATCAGCAAAGAACGGAAGCGGATGAGTTTTTGATACTTG  
 CGACAGACGGTTTTATGGGACATGATCTCTAACGAAGTCGCTTGTCAAGTGGTAAGACGATGTCTTAGCGGCCG  
 GATTAACCGCAAGATTTTTAACCATATTAACAAAATTAGCAATAACCGAGCAGAAGTTGCAGCGGTTT **TA**  
**CGCGGAATTAGCCATCG**CTAAGGGAAGCAAGGACAATATTAGTGAATTGTTGTAGATTTAAGAATCAGTAGAT  
 TTACATGTTCATAAAAAAGATTTATCTTTCTGTTT **AGTCAGCATGGAAAGATAACCT**AAATTTTTGACATTCTTCA  
 CCTTCTTTGTAATGGTTGCACCTTGTAAGAGGTTTTGTTGTACAGAAGACATACAATCAAAATTTTCAGACAGATC  
 TATTCTACTAATAAAGTTGGAATGAGAGGTGTTTCATTAGTTACAAGGTCTGATGAATGTCGGATACTCAAGTT  
 TGTTTAGTCAGAAATTTAATAAAAAAGCTTTTGCAATACAATTGCTT

**Alineamiento:**

Organismo	Descripción	Cobertura (%)	Identidad (%)
<i>B. vulgaris</i>	Probable protein phosphatase 2C (ABI1)	73%	76%
<i>A .thaliana</i>	Protein phosphatase 2CA (PP2C)	23%	71%

**Secuencia (Proteína 5'3'):**

VVTPSNEDNYDSQGSTCSGVHGA V SVMGRRREMEDAVTVEKDLVFRKYDYFGVYDGHGGSQVAEACRDR  
 MHSILLEEMERCDTRMKINGSDEDEDNNGENDKENVDWEKVMGKCFARMDEEVGRGGERGDNVEE  
 MTVGSTVVAVVGREEVVANCGDSRAVICRNGVAVPLSVDHKPDRPDELARIEDAGGRVINWNGYRVLGV  
 LATSRSIGDYLLKPYVSSIPEVMISKRTEADEFILLATDGLWDMISNEVACQVVRCLSGRIKQPQEIFNHINKIS  
 NNRAEVAAVLLAELAIKGSKDNI SIVVVDLRISRFTCS\*KRIFILFSQH GKIT\*IFDILSPSL\*WLHLVRGLLYR  
 RHTIKIFRQIYSTNIKLE\*EVFISYKV\*\*MSDTQVCLVRNFNKLLQYNCX



## Nombre del gen: DREB2C

🌸 **Isotig:** 08512  
🌸 **Isogrupo:** 03771  
🌸 **Longitud:** 1005

### Secuencia:

CAGAAAATGAAGGAAGAAAACCTATTAGAAAGGCGCCTGCAAAGGGGTGGAAGAAAGGATGTATGAGAGGTA  
AAGGCGGTCTGAGAATTCATTATGCAAATTCAGGGGAGTTAGACAGAGGACTTGGGGGAAATGGGTTGCTG  
AGATTCGTGCCCTAATCGAGGTAAGGCTTTGGCTTGGTACTTTCCCTACTGCTGTTGAAGCTGCATTGGCT  
TATGATGAAGCTGCTCGAGTAATGTATGGTTCGAGTGCTCGATTGAACCTCCCAATCAACCTTCATCATCTGTT  
TCATTGGAGGATTACAGGGA**TA**ACTCCGCAACAACAACACC**CA**ACAACAACAGCAACATCGTATACAACAGCGTC  
TGCAACATCGTCTGATACACACTCTTGAT**TCAGTCAGTTGGT**CGAATCGAAGGGATATCAATGGTGTCTAAGG  
GTGAGCCTTCTCAAACCCTTTGGAGGAAGAAGCACAGCCGGATGAAGGTGGCATCGACATCAACGAGTACC  
TACAGAACTTAACAGTCGATGAAATGTTGATGCTGACGAATTACTCGGGGCTATAGATGCTGGACCTGTTTCC  
CCTGTAGGAAATCCATGAATCCTGGTTATGATTCTTTCAAGTCTGAAGTTGAAAAAATCAATCCCCTGGAT  
AAGCCAGAAGACTGGTCATTTCTGAATTTCAATTCAGATTTCTTGCAGCAATTATCAAATCAGGATGATTCTAGTT  
TGTTTGAAGTTTGAATTCATCAGGGTGATCAAGATGATAAAGGTGTGGGATATGGATCAAATCTGTTAAG  
ACTGAAGATTCTGTTTGAAGGTTATGGCAAAGAATAAACATGAGCTTTGTTGTAGTAATAAGGGCACAAATA  
GGATTATGATGAGATGGTATTCTTTATAATCTTTGCTCTTGTGTTTATGGTTTGAATCCTTTTTAGATGTAATT  
GAAAATCATAAATATACAATCAGAAAATTGTATTCTCTGAAA

### Alineamiento:

Organismo	Descripción	Cobertura (%)	Identidad (%)
<i>B. vulgaris</i>	Dehydration-responsive element-binding protein 2C-like	69%	81%
<i>A .thaliana</i>	Chromosome 5 sequence	31%	80%

### Secuencia (Proteína 5'3'):

EN**E**GRKPIRKAPAK**G**SK**K**GC**M**R**G**K**G**PP**E**NS**L**CK**F**R**G**VR**Q**RT**W**G**K**W**V**AE**I**R**A**PN**R**G**K**RL**W**L**G**FT**A**VE**A**  
AL**A**Y**D**E**A**AR**V**MY**G**SS**A**RL**N**FP**N**Q**P**SS**S**V**S**LE**D**Y**R**DN**S**AT**T**TT**P**TT**A**TS**Y**TT**A**S**A**T**S**SD**T**HT**L**D**Q**S**V**GR**I**EG**I**S  
M**V**S**K**GE**P**SS**N**PLE**E**EA**Q**P**D**EG**G**ID**I**NE**Y**L**Q**N**L**TV**D**EM**F**DA**E**LL**G**A**I**D**A**GP**V**SP**V**GN**S**M**N**PG**Y**DS**F**K**S**EV**E**  
N**N**S**I**PL**D**K**P**ED**W**S**F**LN**F**NS**D**FL**Q**LS**N**Q**D**SS**L**FG**S**L**Q**L**H**Q**D**Q**D**K**G**V**G**Y**G**SN**L**FK**T**ED**S**V\***G**L**W**Q**R**I  
K**H**EL**C**CS**K**\***G**H**K**\***D**Y**D**EM**V**IL**Y**N**L**C**S**CF**M**V**L**N**P**FL**D**V**N**\***K**S\***I**Y**N**Q**K**IV**F**SE**X**

Nombre del gen: LEA14

🌱 Isotig: 01687  
 🌱 Isogrupo: 00260  
 🌱 Longitud: 854

CAAGAAGTCCATATACTCATGATTTGTATTAATTAAGTCATTTAACTAATTCATGGACCACCTCAGAATAAACCGC  
 CTCATACAATAATATCGTTTCATACAATAATTTGTATTTTTTTAGTATTACGATGAAACATTCATGTAAGATTAATAC  
 ACCAATAATTTTTTTTTAAAAAAGCAAAGATAGATTGCCAACATGAAAGTAAAAATGTTTCATTAACATCAAC  
 TAATGAGGGTATATATCAGTAGTGTTCCTTGTACTTCCTTATATCGCTTAAATTTGCACCATATAAATAAATAT  
 GTGAGAAACATTTCACTTATAACAATGCAAATTCAAAGAGAAATACAAGTATAAAACATGGAAACTTTTTGATTCAT  
 TCCTTGTTTTCTCCTTGTCGTCTCCTCCACTAAAAAGTCTTTGATGGAAGGAAGCTTAATCTCGCCCTTAGAA  
 GAAAGGGGAATGGTAAAGGTGCCAATAACAGGTAGGTCGATAACAAGACCCAACTCGAGTTCATAGTCGATAT  
 CCCAATCTCGAAAAATATCCCTTGCTAAGCTTACAAGAACGCTATGAGGCACCTTCATTGGCACTTCTAGCATTG  
 TTGTTTCCTTTCCTTTATTGAACCTGGGTCTGGCATTGCGCCGACAATATCTCCCTGGTATCACTTCTAAGGA  
 CATAAGTAACCTCACAATAGGAATAGATTGAGAATAAGGATTAAAAAACACCAACTTTAGCAGAGTACGTAACAC  
 CATCTTTGGCTACACCTTTAAGATCAACATCTTCTATGTTTGCTTCTGGTTTTGGTAAATCTGCTATTTTTCTTGC  
 TACATAATTTTCGTCTTTG

Alineamiento:

Organismo	Descripción	Cobertura (%)	Identidad (%)
<i>B. vulgaris</i>	Desiccation protectant protein Lea14	55%	79%
<i>A. thaliana</i>	Chromosome 5 sequence	20%	96%

Secuencia (Proteína 5'3'):

RSPYTHDLY\*LSHLTNSWTTSE\*TASYNNIVSYNNLYFFSITMKHSCKINTPIIFF\*KKAKIDCPT\*KLKMFH\*  
 HQLMRVYISSVFLVLPYIALNLHHINKYVRNISLIQCKFEKYKYKTWKLFDSEFLVFLVVSSTKKVFDGRKLN  
 LALRRKGNKGANNR\*VDNKTQLEFIVDIPISKNI PC\*AYKNAMRHFHWHF\*HCCFLSFY\*TWVWHSPRQ  
 YLPGITSKDISNLTNRNRLRIRIKNTNFSRVRNTIFGYTFKINIFYVCFWFV\*ICYFLLHNFSSL

**Apéndice 3.** Características de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la cuantificación de la expresión por qRT-PCR. Nomenclatura: S (Sentido), D (Directo), R (Reverso), NE (No Encontrada).

Gen	S	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Longitud (pb)	ΔG dímero (kcal/mol)	ΔG lazo-asa (kcal/mol)
TPS1	D	CTCCTTACAGTTGAGAAATCGC	61.7	22	- 1.0	- 1.0
	R	TAACACTCTTGACCCAGATCG	61.7	21	- 2.0	- 0.7
TPS5.1	D	ATATAGGACATTGCCCGTGAG	62.6	21	- 0.5	NE
	R	CCAGCCCTAACATACGACTAC	60.1	21	NE	NE
TPS5.2	D	AACATCCTTAGTATCTCGCCTG	61.1	22	NE	NE
	R	AGAACAACCTCCTCACTCTCG	60.1	21	- 0.7	- 0.7
TPS6	D	TTCAGCAACAGCATAATACGC	62.7	21	NE	NE
	R	GGAAACACAGAGGGAGACATAT	60.8	22	- 0.5	NE
TPS7	D	AGGAAGCGATATTGAGGAGA	60.4	20	- 0.5	NE
	R	GCAATGGTGAAGTAAGCGAT	61.7	20	NE	NE
TPS8	D	CACCATTAGTAGGTCCAACAG	58.6	21	- 1.5	- 1.5
	R	CAAGTGATGATGAGCCAGG	62.0	19	NE	NE
TPS9.1	D	TTCTTGCTCTGCCACTCAC	61.9	19	NE	NE
	R	ATTGTCTCGGCGTATAGGA	59.7	19	- 0.3	NE
TPS9.2	D	AACAACGACAGGCTCATTAG	59.4	20	NE	NE
	R	GGCATTATCAAGACTCCGA	60.2	19	NE	NE
TPS10	D	TCCTTGAAAGACGGTCAGAAT	62.6	21	- 1.1	- 0.9
	R	CTGCTTGTGTGCTTGAAGTTA	60.7	21	- 0.5	- 0.5
TPPA	D	TGTTTCGTATTACTGCTTGGC	60.3	20	- 0.3	NE
	R	TGAGAGGGCTGACGGATA	62.1	18	NE	NE
TPPD	D	GCAGATGGATGATTGACC	58.9	18	NE	NE
	R	TTCCAACCTCCTCCTTC	60.8	19	NE	NE
TPPI	D	TTGGATTACGATGGCACTCT	62.1	20	NE	NE
	R	GGCACCTTCCACTCACTATT	60.6	20	NE	NE
TRE	D	AACAACGGTAACGGTAGGAG	60.5	20	NE	NE
	R	GCAAGCACAGATCAATGC	60.6	18	- 2.0	- 2.0
GOLS1	D	AGCCCAACTACACCCTTTATG	61.7	21	NE	NE
	R	TAATGGCACCAACAACTTCG	64.6	21	NE	NE
GOLS2	D	TCCTCCTACTCAAATATCCAA	59.3	22	NE	NE
	R	AAAGGATCTAAGCAGCAGAAG	59.3	21	NE	- 0.7

**Apéndice 2 (Continuación).** Características de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la cuantificación de la expresión por qRT-PCR. Nomenclatura: S (Sentido), D (Directo), R (Reverso), NE (No Encontrada).

Gen	S	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Longitud (pb)	ΔG dímero (kcal/mol)	ΔG lazo-asa (kcal/mol)
RAFS	D	AAGCAGTTGAGTCACTATTCCA	60.4	22	NE	- 0.8
	R	AGATGGTTCGTCTTGGCATAA	63.3	21	NE	- 0.7
STCS	D	CAATCCAAGGCAAATCAAACAC	65.2	22	NE	NE
	R	TCAAATGAGGCACCAAAGAAG	64.0	21	NE	NE
SnRK1α	D	GGACCTCAGATGCTCTTCCTT	60.0	21	- 1.4	- 1.4
	R	TGAAACACGACCATACATCAT	60.3	21	- 0.9	- 0.9
SnRK2.1	D	ATCCCAAAGTCTGAACAAGTA	57.7	21	NE	NE
	R	CGGCTCATTACAATCGTTT	60.1	19	0.0	NE
SnRK2.2	D	TCACAACAGAGGGACAATAAA	59.6	21	NE	NE
	R	GCTCTCTTCTGGGTGGA	60.6	18	NE	NE
RAB18	D	GCCCAGTGAAACAAGCAATAC	63.3	21	NE	NE
	R	GCCAGAGACTCCGTAAACTTC	61.8	21	-1.0	NE
DREB2C	D	TAACTCCGCAACAACAACACC	64.8	21	NE	NE
	R	TCGATTCGACCAACTGACTGA	65.8	21	NE	-3.1
ABI1	D	TACTTGCGGAATTAGCCATCG	65.8	21	-1.1	NE
	R	AGGTTATCTTTCCATGCTGACT	60.6	22	-2.3	NE
ABI5	D	TTTCTGAACTTCTTGCTCCAAC	63.1	23	-0.7	-0,7
	R	AGAGGAGACAAAGCGTATGA	62.7	21	NE	NE
LEA14	D	CCCACAAATATCTCCCTGGTA	64.7	21	-0.7	-0.5
	R	ACGTACTCTGCTAAAGTTGGTG	59.9	22	-0.7	-3.3
ACT	D	CGTGACCTGACTGATTACCTTA	60.6	22	NE	NE
	R	GCTCGTAGTTCTTCTCAATGGC	64.0	22	NE	NE
EF1α	D	GCCAAATATCTAAGAAACAAATGC	61.5	24	- 0.7	NE
	R	TAGCACAACCACATGATATTTCTT	61.2	24	- 2.3	NE
βTUB	D	TCTCAGCAGTATGTCTCCCTCA	63.9	22	NE	NE
	R	TCTACTTCTTTGGTGCTCATCTT	60.9	23	NE	NE

**Apéndice 4.** Resultados del experimento de selección de variedades de amaranto.

Gráfica que muestra el promedio de la medición del **potencial hídrico (MPa)** en cada una de las variedades y en cada tratamiento de estrés hídrico (n=10).

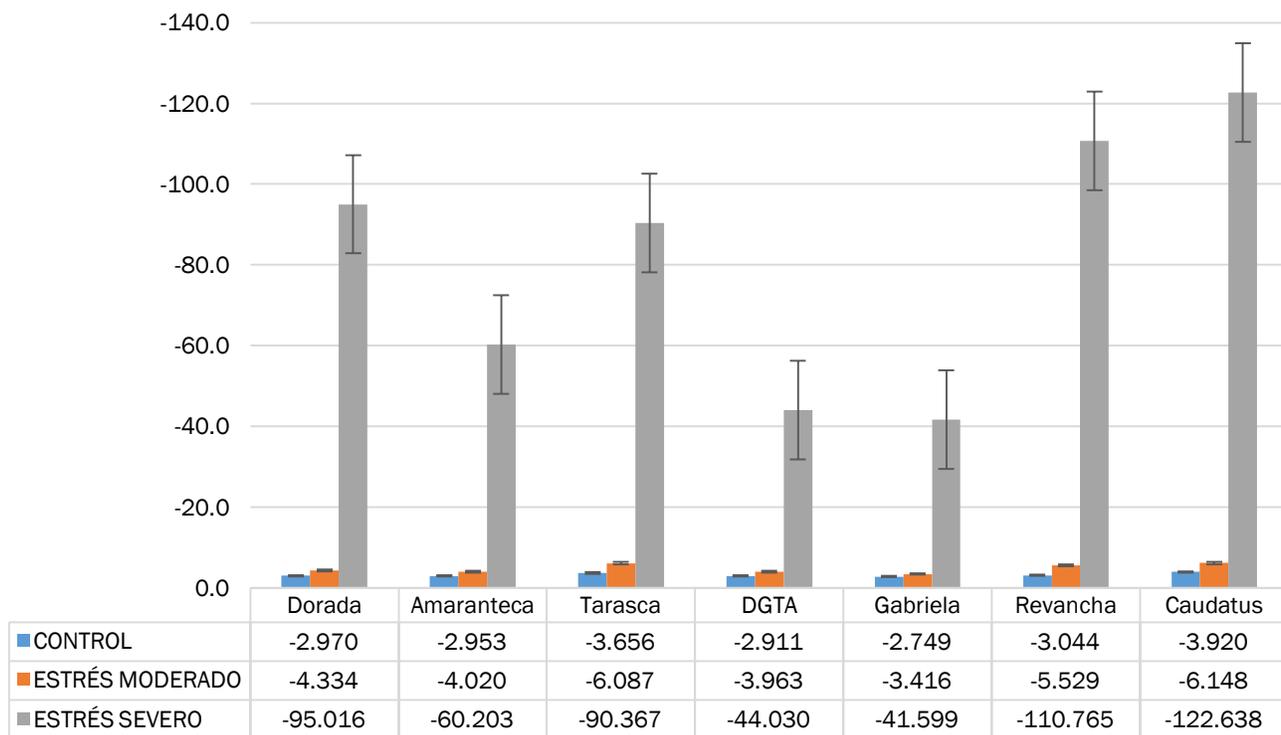


Tabla del total de **plantas recuperadas** después de cada uno de los tratamientos de estrés hídrico (n=10, por variedad y por tratamiento).

Genotipo	Variedad	Estrés medio	Estrés severo	Total
<i>A. cruentus</i>	Dorada	5	4	9
	Amaranteca	6	3	9
	Tarasca	3	2	5
<i>A. hypochondriacus</i>	DGTA	9	2	11
	Gabriela	9	3	12
	Revancha	1	1	2
<i>A. caudatus</i>	Caudatus	7	0	7

**Apéndice 5.** Tabla de comparación múltiple de medias entre todas las especies de amaranto y todos los tratamientos para cada metabolito analizado en las hojas. Las letras diferentes representan diferencias significativas. Prueba estadística de Tukey  $P < 0.05$ . Especies: *A. hyp* (*A. hypochondriacus*), *A. cru* (*A. cruentus*), *A. hyb* (*A. hybridus*), *A. cau* (*A. caudatus*). Tratamientos: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación).

			Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Almidón	Prolina
<b>HOJA</b>	<i>A. hyp</i>	CT	gh	h	gh	cde	fg
		EHM	c	a	d	hi	d
		EHS	fg	efg	c	i	a
		REC	ef	e	ef	gh	efg
	<i>A. cru</i>	CT	h	h	h	a	g
		EHM	fg	gh	fgh	de	fg
		EHS	ef	ef	a	i	b
		REC	fg	h	fgh	fg	efg
	<i>A. hyb</i>	CT	gh	h	fgh	a	efg
		EHM	b	b	c	cd	ef
		EHS	a	bc	bc	ef	c
		REC	cd	cd	e	bc	efg
	<i>A. cau</i>	CT	fg	fgh	fgh	b	g
		EHM	b	ab	d	cd	fg
		EHS	b	b	b	ef	e
		REC	de	de	efg	cd	fg

**Apéndice 5 (Continuación).** Tabla de comparación múltiple de medias entre todas las especies de amaranto y todos los tratamientos para cada metabolito analizado en las raíces. Las letras diferentes representan diferencias significativas. Prueba estadística de Tukey  $P < 0.05$ . Especies: *A. hyp* (*A. hypochondriacus*), *A. cru* (*A. cruentus*), *A. hyb* (*A. hybridus*), *A. cau* (*A. caudatus*). Tratamientos: CT (control), EHM (estrés hídrico moderado), EHS (estrés hídrico severo), REC (recuperación).

			Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Almidón	Prolina
<b>RAÍZ</b>	<i>A. hyp</i>	CT	bc	b	gh	a	d
		EHM	b	a	d	defg	d
		EHS	b	a	c	g	a
		REC	a	a	ef	efg	d
	<i>A. cru</i>	CT	f	f	h	a	d
		EHM	def	d	fgh	bcd	d
		EHS	def	cd	a	g	a
		REC	ef	def	fgh	fg	d
	<i>A. hyb</i>	CT	ef	ef	fgh	ab	d
		EHM	ef	de	c	ab	c
		EHS	ef	b	bc	bcd	a
		REC	de	cd	e	abc	bc
	<i>A. cau</i>	CT	ef	def	fgh	abc	d
		EHM	def	bcd	d	cde	d
		EHS	def	b	b	defg	b
		REC	cd	bc	efg	def	d