



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Biología

**Efecto del pre-acondicionamiento de semillas en la resistencia a
Plomo (Pb) en *Chenopodium quinoa* Willd (Amaranthaceae)**

Tesis presentada en la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Biólogo

POR: GABRIEL MOISÉS BARROS ROJAS
Profesor guía: Dr. Teodoro Coba de la Peña
Profesora Co-guía y Patrocinante: Dra. Luisa Bascuñán Godoy

Departamento de Botánica
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Abril, 2022
Concepción, Chile

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor(a) Guía



Dr. Teodoro Coba de la Peña

Director de Tesis



Dra. Luisa Bascuñán Godoy

Ha sido aprobada por la
Siguiete Comisión
Evaluadora



Dr. Néstor Fernández



Dra. Carolina Sanhueza

Jefe de Carrera



Dr. Patricio López

DECLARACIÓN

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica de este documento.



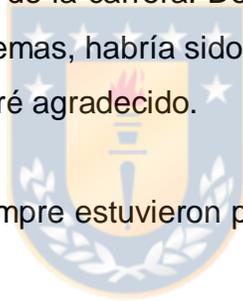
AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Doctor Teodoro Coba de la Peña, que ha tenido la voluntad de ayudarme y apoyarme en la realización de esta esta tesis. Siempre con disposición de contestar las dudas que yo pudiera tener, y siempre mandando material complementario cuando lo encontraba.

Quiero agradecer también a la profesora Dra. Luisa Bascuñán, quien me tomó bajo su tutela al llegar al laboratorio de fisiología vegetal y también tuvo la voluntad de ayudarme y apoyarme a lo largo de la realización de esta tesis.

Quiero agradecer también a mi familia por ser un gran pilar a lo largo de mi formación en lo que es la vida, a mi mamá y mi papá, mi abuela materna, quienes siempre me apoyaron a lo largo de la carrera. De no ser por ellos y el tiempo que dedicaban a escuchar mis problemas, habría sido difícil conseguir llegar hasta este punto. Por ello, siempre les estaré agradecido.

A mis amigos y amigas, que siempre estuvieron presente en las buenas y malas a lo largo de este viaje.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
1. RESUMEN.....	7
2. ABSTRACT.....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	9
3.1 Contaminación por metales pesados y su efecto en plantas.....	9
3.2 Contaminación y estrés inducido por plomo.....	10
3.3 Mecanismos de tolerancia de las plantas a estreses inducidos por metales pesados y por el Pb.....	11
3.4 Genes relacionados con tolerancia a Pb.....	13
3.5 Priming para la inducción de tolerancia al estrés en plantas.....	14
3.6 Interés en <i>Chenopodium quinoa</i>	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS.....	18
5.1 Objetivo General.....	18
5.2 Objetivos Específicos.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
6.1 Búsqueda y recopilación de genes relacionados con tolerancia a Pb.....	19
6.2 Alineamiento y análisis filogenético.....	20
6.3 Diseño de primers.....	21
6.4 Material Vegetal y reactivos químicos.....	22
6.5 Efecto del Pb en la germinación de semillas de <i>C. quinoa</i>	22
6.6 Efecto del priming en la germinación en presencia de Pb.....	23
6.7 Análisis estadístico.....	25
7. RESULTADOS.....	25
7.1 Búsqueda y recopilación de genes relacionados con tolerancia a Pb en especies vegetales.....	25
7.2 Identificación y caracterización de homólogos de dichos genes en el genoma de	

<i>C. quinoa</i> mediante análisis bioinformático.....	27
7.3 Análisis filogenéticos.....	30
7.4 Diseño de primers para amplificar homólogos en <i>C. quinoa</i>	36
7.5 Efecto del Pb en la germinación de semillas de <i>C. quinoa</i>	48
7.6 Efecto del hydropriming en la germinación.....	41
7.7 Efecto del priming con ácido ascórbico en la germinación.....	42
7.8 Efecto del priming con peróxido de hidrógeno en la germinación.....	45
7.9 Efecto del priming con melatonina en la germinación.....	47
8. DISCUSIÓN.....	49
8.1 Identificación de homólogos en genes de tolerancia a Pb en <i>quinoa</i>	50
8.2 Efecto del Pb en la germinación de semillas de <i>C. quinoa</i>	50
8.3 Efecto del pre-acondicionamiento (priming) en la germinación de semillas de <i>C</i> <i>.quinoa</i> en ausencia y presencia de Pb.....	51
9. CONCLUSIÓN.....	57
10. BIBLIOGRAFÍA.....	58



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético ATM3. Maximum Likelihood.....	33
Figura 2. Árbol filogenético ATM. Neighbor Joining.....	34
Figura 3. Árbol filogenético PDR12. Maximum Likelihood.....	35
Figura 4. Árbol filogenético PDR12. Neighbor Joining.....	36
Figura 5. Árbol filogenético PSE 1. Maximum Likelihood.....	37
Figura 6. Árbol filogenético PSE1. Neighbor Joining.....	38
Figura 7. Gráfico germinación <i>C. quinoa</i> en presencia de Pb.....	42
Figura 8. Gráfico hydropriming y priming AsA en ausencia y presencia Pb.....	46
Figura 9. Gráfico priming H ₂ O ₂ en ausencia y presencia Pb.....	48
Figura 10. Gráfico priming Mel en ausencia y presencia Pb.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes relacionados con resistencia a Pb en distintas especies.....	28
Tabla 2. Tabla de dominios genes de resistencia a Pb obtenidos por SMART y HMMER.....	30

1. RESUMEN

La contaminación de los suelos por plomo (Pb) es un problema actual, afectando a las plantas y cultivos a nivel fisiológico y molecular. Pero existen plantas que poseen mecanismos para hacer frente a esta amenaza, tolerando los metales pesados. *Chenopodium quinoa* se presenta como una planta que puede resistir ambientes adversos y metales pesados, además de su producción de semillas con alto nivel nutritivo; es la perfecta candidata para pruebas de cultivo en ambientes contaminados y con posibles aplicaciones en fitorremediación. En el presente trabajo se evaluó la tolerancia de quinoa al estrés por Pb. Para ello, se identificaron y caracterizaron en quinoa putativos homólogos de genes de tolerancia a Pb mediante métodos bioinformáticos. También se evaluó el efecto del estrés inducido por varias concentraciones de Pb en la germinación de semillas de *C. quinoa* (Socaire). Además, existe evidencia de que el pre-acondicionamiento o “priming”, técnica que consiste en preparar a un organismo para enfrentar un futuro estrés, ha dado resultado en aumentar la tolerancia de las plantas frente a varios escenarios adversos. Por ello, se evaluaron los efectos de varios tipos de priming (hydropriming, priming por ácido ascórbico, peróxido de hidrógeno y melatonina) en la germinación de quinoa en presencia Pb. Los resultados muestran que las semillas de quinoa toleran altas concentraciones de Pb, logrando germinar (con un porcentaje de germinación PG del 48%) incluso en presencia de Pb 125 mM. El hydropriming resultó ser la mejor opción para aumentar la tolerancia a Pb en la germinación de *C. quinoa*, aumentando los valores de PG, y disminuyendo los valores de Tiempo Medio de Germinación y Velocidad Media de Germinación. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de hydropriming y priming químicos. Los resultados sugieren que el hydropriming es una buena opción para aumentar la tolerancia de semillas de *C. quinoa* y resistir ambientes con altas concentraciones de Pb, pero aún quedan estudios por realizar, en cuanto a los efectos del Pb sobre la plántula y productividad de *C. quinoa*.

2. ABSTRACT

Soil contamination by lead (Pb) is an important current problem world-wide. This type of contamination affects plants and crops at the physiological and molecular level, decreasing their yield. Some plants have mechanisms to deal with this threat, tolerating heavy metals. *Chenopodium quinoa* is a plant that can withstand adverse environments and heavy metals, in addition to its production of seeds with high nutritional level. Quinoa is an ideal candidate for culture tests in contaminated environments and for applications in phytoremediation. In the present study, the tolerance of quinoa to stress by Pb was evaluated. For this, homologous genes putatively involved in Pb tolerance were identified and characterized in the genome of quinoa by bioinformatic methods. Besides, the effect of stress induced by Pb on the germination of quinoa (Socaire) seeds was also evaluated. In addition, there is evidence that pre-conditioning or "priming", a technique that consists of preparing an organism to face future stress, has resulted in increasing the tolerance of plants to several abiotic and biotic stresses. Therefore, the effects of several types of priming (hydropriming, and priming by ascorbic acid, hydrogen peroxide and melatonin) on the germination of quinoa in the presence and absence of Pb were evaluated. Results showed that quinoa seeds tolerate high concentrations of Pb, managing to germinate (with a germination percentage GP of 48%) even in the presence of 125 Mm Pb. Hydropriming turned out to be the best option to increase tolerance to Pb in the germination of quinoa, increasing GP values, and decreasing mean germination time and average germination speed. No significant differences between hydropriming and chemical primings were detected. Results suggest that hydropriming is a treatment of choice in order to get an increase of quinoa seed tolerance in environments with high concentrations of Pb. Additional studies must be carried out to further evaluate the effects of Pb-induced stress on seedlings and yield of quinoa.

3. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos vivos que llevan millones de años sobre la tierra, han colonizado todo tipo de ambientes y enfrentado todo tipo de situaciones adversas. ¿Cómo puede ser posible?, siendo organismos inmóviles, no como los animales que se pueden desplazar, escapar y así evitar situaciones adversas. Dado esto, solo pueden desarrollar un mecanismo de defensa que les permita enfrentar amenazas tanto externas como internas.

La población a nivel mundial aumenta de manera exponencial, esto significa que habrá más bocas que alimentar y para eso, la producción del sector agrícola debe buscar maneras de mejorar. Se estima que el estrés abiótico es la principal causa de la reducción en la producción de cultivos en casi un 70% (Acquaah, 2007; Jewell et al., 2010).

3.1 Contaminación por metales pesados y su efecto en plantas

Los metales pesados (MPs) son elementos que poseen un peso atómico sobre los 20 g/mol y/o densidad mayor a 5 g/ml (Stankovic et al., 2014; Kim et al. 2015). Estos metales se encuentran en la naturaleza y pueden tener o no una función biológica. Por ejemplo Co, Cu, Fe, Mn y Zn, son MPs que cumplen la función de micronutrientes a muy bajas concentraciones, poseyendo así, una función a nivel biológico, como el de mantener la homeostasis, pero sólo si sus niveles no exceden el límite que los vuelve tóxicos (van Bussel et al. 2014). En cambio, algunos MPs como Cd, Hg, Al y Pb, no poseen función biológica en plantas ni en otros seres vivos, y pueden ser muy tóxicos incluso a muy bajas concentraciones. (Janicka-Russak et al., 2008; Garzón et al., 2011; Shahid et al., 2012; Chong-qing et al., 2013; Gill et al., 2013)

Los MPs se encuentran en el aire, el agua y el suelo, dando lugar a ciclos biogeoquímicos. Generalmente, el estado químico y la biodisponibilidad de MPs en suelos dependen de la materia orgánica presente en el suelo, el pH, la textura del suelo (arcilloso, arenoso, limoso) y el potencial oxido-reductor del suelo (De Matos

et al. 2001; Stankovic, Kalaba, and Stankovic 2014 Mehes-Smith et al. 2014). Además, las bacterias que colonizan raíces y la formación de micorrizas pueden incrementar de manera significativa la biodisponibilidad de iones de metales para su absorción por la planta (Singh et al. 2003).

Los metales son capturados por las células de la raíz, se ligan a la pared celular y se movilizan a través la membrana plasmática gracias a la acción de bombas de protones ATP-dependientes que catalizan la extrusión de H^+ a través de la membrana. Se han reportado efectos tóxicos de los MPs en plantas y cultivos, como: reducción de la germinación, disminución de la elongación de las raíces y el tallo, alteraciones en el desarrollo de la plántula, en la transpiración, en el peso seco, y en la cantidad de proteína soluble total. También se han observado alteraciones en la estructura de la membrana, reducción en la producción de clorofila, alteración de los metabolismos de azúcares y proteínas, y pérdida de nutrientes (Ahmad and Ashraf 2011; Pourrut et al. 2011; Wang, Vinocur, and Altman 2003).

3.2 Contaminación y estrés inducido por plomo

Dentro de los estreses abióticos, uno de los retos que enfrenta la industria agrícola es la presencia de plomo en suelos (Finster, 2004).

El plomo (Pb) es un metal no esencial, y se encuentra en el segundo puesto dentro del rango de metales tóxicos (Anonymous-ATSDR, 2011). Este elemento metálico se puede encontrar de manera natural debido a erosiones de suelo, erupciones volcánicas, incendios forestales, y degradación de elementos radiactivos; pero también su presencia se ha vuelto una amenaza debido a actividades antropogénicas, como el rápido crecimiento de la industrialización, incluyendo actividades como la minería y fundición de plomo (Obiora 2016), generalizando su uso y presencia en bastantes productos, como en pinturas y tinturas (Kumar 2008), munición de armas (Yin 2010) y baterías de almacenamiento (Wang 2016). En Chile se ha reportado contaminación de suelo con Pb después de eventos de aluviones en tierras de Paipote y Tierra Amarilla, llegando a concentraciones de $57 \mu M$ en el sedimento por aluvión producido en el año 2015. Por otra parte, se han observado

concentraciones que van desde los 24 hasta los 301 μM de Pb en cuencas del río Copiapó a lo largo de todo el año 2018 (Cortés *et al.* 2015; Rojos *et al.* 2019).

El Pb se considera una de las grandes amenazas para los humanos y otros seres vivos, de hecho, se considera como uno de los MPs más tóxicos, posee un tiempo de retención en el suelo de 150-5000 años, y mantiene una alta concentración por 150 años (Nanda Kumar *et al.* 1995; Yang *et al.* 2005; Arshad *et al.* 2008; Ma *et al.* 2016). Este metal, dañino incluso a bajas concentraciones, puede suponer un gran problema para el desarrollo de las plantas y cultivos, ya que produce alteraciones en la absorción de nutrientes, en el balance hídrico y en la actividad enzimática. El estrés por Pb también produce inhibición de la fotosíntesis, incrementando así la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales oxidan moléculas biológicas y causan daños en la membrana celular, dando lugar a un mal funcionamiento de proteínas y enzimas, y produciendo deterioro del ADN. En el peor de los casos, el Pb puede llegar a alterar todo el metabolismo de la planta, evitando que las células se puedan dividir, terminando en muerte celular (Ercal 2001; Seregin & Ivanov 2001; Sharma & Dubey 2005; Singh *et al.* 2016).

3.3 Mecanismos de tolerancia de las plantas a estreses inducidos por metales pesados y por el Pb

Dentro de las estrategias principales que poseen las plantas para tolerar el estrés inducido por Pb y otros MPs, se encuentra la evasión (Dalvi & Bhalerao 2013). En este mecanismo de evasión, los MPs se pueden ver sometidos a un eflujo activo, o también a neutralización y precipitación de los iones metálicos en la rizosfera debido a la acción de sustancias producidas y secretadas por las raíces de la planta, quelando los metales (Nagajyoti *et al.* 2010). Por tanto, las plantas que presentan este tipo de mecanismo, también llamadas plantas excluidoras de MPs, son tolerantes porque poseen un mecanismo de exclusión de metales absorbidos y/o pueden evitar la absorción de estos metales, lo cual suele verse reflejado en una ausencia de acumulación en raíces y partes aéreas de la planta. (Wei *et al.* 2005). Por otro lado, hay plantas que absorben MPs, también llamadas acumuladoras e

hiperacumuladoras, que son plantas que capturan los iones metálicos del suelo a través de las raíces, utilizando mecanismos de absorción específicos para ciertos iones (Saleem *et al.* 2018). A través de diferentes mecanismos, realizan la translocación (término que se refiere a la movilización de metales desde la raíz hacia partes aéreas de la planta). Curiosamente, el Pb experimenta con frecuencia un fenómeno llamado “restricción de translocación” (Dogan *et al.* 2018), esto quiere decir que el Pb suele verse concentrado en las raíces (cerca del 95%) y una pequeña proporción (5%) se localizan en las partes de la planta que están sobre el suelo. (Zhou *et al.* 2016). Sin embargo, en algunos estudios también se ha observado que el Pb puede ser capturado por las raíces y que su transporte hacia las hojas aumenta a medida que la concentración de Pb externo aumenta (Ashraf *et al.* 2015).

Los mecanismos de tolerancia de las plantas al estrés por Pb y otros MPs incluyen la presencia de barreras físicas que se encargan de evitar el acceso de los MPs, como la presencia de cutículas gruesas, de tricomas y pared celular (Harada *et al.* 2010; Wong *et al.* 2004; Hall *et al.* 2002). Cuando estas barreras físicas no logran evitar la entrada de los MPs en la planta, la planta induce la biosíntesis de diversas biomoléculas proteicas de bajo peso molecular, las cuales actuarán como metalochaperonas y otros quelantes de metales, como por ejemplo el glutatión, fitoquelatinas, ácidos orgánicos y metalotioneínas, entre otros (Viehweger *et al.* 2014; Dalvi & Bhalerao 2013; Sharma & Dietz 2006). Algunos de los complejos formados por estas biomoléculas y los MPs se depositan en la pared celular. Otros complejos interactúan con proteínas que se encuentran en la membrana celular y de organelos, encargadas de transportar el metal ya sea hacia el interior o el exterior del organelo en el que se encuentra, o de la célula. Un ejemplo de organelo que acumula y neutraliza MPs es la vacuola, a la cual ingresan los MPs gracias a la acción de proteínas transportadoras de la familia ATP Binding-Cassette (ABC) (Cao *et al.* 2009, Lee *et al.* 2005). Otro mecanismo de tolerancia consiste en la eliminación del exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales deterioran las moléculas y estructuras de la célula a través de la oxidación de estas. Este sistema antioxidativo se compone de moléculas de dos tipos: antioxidantes enzimáticos y no

enzimáticos. El sistema antioxidativo enzimático se compone de enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), y glutatión reductasa (GR), entre otros. En cuanto al sistema no enzimático, incluye moléculas antioxidantes como el ascorbato (AsA), glutatión (GSH), carotenoides, alcaloides, prolina, tocoferoles y compuestos fenólicos que se encargan de neutralizar los radicales libres (Mourato *et al.* 2012; Sharma *et al.* 2012; Rastgoo *et al.* 2011; Michalak 2006).

3.4 Genes relacionados con tolerancia a Pb

Tomando en cuenta la fitorremediación (remediación de los suelos mediante plantas) y las plantas que se ocupan para ello, una duda que surge es qué genes se expresan bajo el estrés frente a la presencia de estos metales pesados, y cómo estas plantas pueden enfrentar este tipo de hostilidad en el ambiente. Enfocándonos en el estrés por plomo (Pb), estudios realizados anteriormente en diversas especies de plantas han descrito la participación de genes que promueven mecanismos de tolerancia. *PDR12* (Pleiotropic drug resistance) es un gen identificado en *Arabidopsis thaliana*, codifica para una proteína ABC y ha demostrado participar en la exclusión de Pb del citoplasma a través de la membrana plasmática, por consiguiente, la planta presentó una mayor tolerancia y menor concentración de Pb (Lee *et al.* 2005). *ATM3* (ABC transportador mitocondrial), es un gen encontrado en *A. thaliana*, codifica para una proteína de transporte ABC que se encuentra en la membrana de la mitocondria y su sobreexpresión aumenta la tolerancia a Pb (Kim *et al.* 2006). Otro gen hallado es *EIN2* (ethylene-insensitive), el cual está implicado en el metabolismo de la hormona etileno, la cual posee relación con la tolerancia a diversos tipos de estrés, y se sugiere que este gen participa en la tolerancia a Pb en *A. thaliana* mediante dos vías, una vía dependiente de la síntesis de glutatión y otra vía independiente de la síntesis de glutatión mediada por *AtPDR12*, las plantas mutantes sensibles (*ein2-1*) mostraron una menor tolerancia y una mayor acumulación de Pb (Cao *et al.* 2008). *ACBP1* (acyl-CoA-binding protein) es un gen obtenido de *A. thaliana*, codifica para proteínas de unión a grupos acilCoA y las

plantas que sobreexpresan este gen demuestran una mayor tolerancia y acumulación de Pb en el tallo (Xiao et al. 2007). También se han encontrado genes que codifican para metalotioneínas que aportan tolerancia a Pb, como son el caso de *KcMT2* (*Kandelia Candel*) y *OsMT-1-2-C* (*Oryza sativa*), con la sobreexpresión de *KcMT2* resultando en una mayor tolerancia y detoxificación en presencia de Pb, y con *OsMT-1-2-C* se observó que en células de levadura transgénicas con el gen *OsMT* presentaron mayor resistencia a Pb y también plántulas de arroz (Xu et al. 2007). *PSE1*, gen encontrado en *A. thaliana*, codifica para una proteína desconocida, que confiere tolerancia a Pb en plantas que poseen una sobreexpresión del gen, así, promoviendo la expresión de genes involucrados en la síntesis de fitoquelatinas (PC) dependientes de glutatión (GSH), aumentando la acumulación y tolerancia a Pb (Fan et al. 2016).

Recapitulando, entre los genes relacionados con tolerancia al Pb que se han descubierto, se encuentran *PSE1*, *EIN2*, *ACBP1*, *PDR12*, *ATM3*, *SbLRR2*, *OsMT-1-2-C* y *Kc MT2* (Fan et al. 2016; Zhu et al. 2013; Huang et al. 2012; Cao et al. 2009; Xu et al. 2007; Lee et al. 2005).

3.5 Priming para la inducción de tolerancia al estrés en plantas

El priming o “pre-acondicionamiento” ha surgido como una herramienta para la estimulación de procesos fisiológicos en condiciones de estrés (Ashraf and Foolad 2005; Paparella et al. 2015). Bruce et al. (2007) propusieron el término “pre-acondicionamiento”, “priming” o “imprint stress” para referirse al proceso de aclimatación en el que una exposición previa a un factor de estrés biótico o abiótico hace que una planta o cultivo sea más resistente a una exposición futura. Se han descrito distintos tipos de pre-acondicionamiento, tales como: pre-acondicionamiento con agua (hydropriming), pre-acondicionamiento salino (o halopriming), pre-acondicionamiento osmótico (osmopriming) y pre-acondicionamiento químico (chemical priming) (Anosheh, Sadeghi, and Emam 2011; Damalas, Koutroubas, and Fotiadis 2019; Farooq et al. 2017; Kumari et al. 2017). Una solución bastante económica, simple y también respetuosa con el medio

ambiente es el uso del hydropriming, ya que consiste en sumergir las semillas en agua destilada durante un cierto periodo de tiempo y a una temperatura apropiada (Farooq et al. 2006b). La principal característica del hydropriming, es que, al sumergir la semilla, esta absorbe agua hasta llegar a un punto de imbibición, y en este punto la semilla ha absorbido toda el agua necesaria para iniciar los procesos de reparación de ADN, la activación del sistema antioxidante, la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, la producción de ATP, y la producción de fosfolípidos y esteroides (Paparella et al., 2015). Este tipo de priming ha demostrado incrementar la capacidad de ajuste osmótico de las semillas, agilizando la germinación, y dando lugar a un mejor establecimiento de la plántula, un crecimiento vegetal con mayor vigor, y un cultivo con mayor productividad bajo distintas condiciones ambientales adversas (Harris et al. 1999; McDonald 1999; Kaur et al. 2002; Elkoca et al. 2007; Jisha et al. 2013).

Se ha informado que el priming químico de semillas mejora la germinación y la emergencia uniforme en una variedad de especies, y afecta positivamente el vigor, el establecimiento y el crecimiento de las plántulas (Bakht et al. 2011; Dezfuli, Sharifzadeh, and Janmohammadi 2008; Kaya et al. 2006; Raj and Raj 2019). Para el priming químico se han utilizado diversas moléculas como el ácido abscísico (ABA), el ácido β -aminobutírico (BABA) y el metil-jasmonato, entre otros (Ashraf and Foolad 2005; Ibrahim 2016; Paparella et al. 2015) para determinar su influencia en el incremento de la resistencia a sequía y salinidad en respuesta al priming. Se sabe que los niveles de antioxidantes como el ácido ascórbico (AsA) pueden verse muy incrementados bajo diversas condiciones de priming salino en quínoa (Cifuentes *et al.*, datos no publicados). Por otro lado, la melatonina se ha encontrado acumulada de manera natural en raíces de la planta *Amaranthacea Beta vulgaris* (Dubbels et al. 1995). Sin embargo, el rol que poseen estas sustancias como inductores de resistencia al usarlos como agentes en el priming químico es desconocido.

Muchos de estos diversos tratamientos de priming se han aplicado en las semillas y han demostrado tener un impacto positivo no solo durante la germinación, sino también en el estadio vegetativo, mejorando la elongación y división celular en plántulas, aumentando la absorción del agua, brindando estabilidad a la membrana

celular, promoviendo actividad antioxidante, y también aumentando el largo de la raíz y el tallo (Damalas, Koutroubas, and Fotiadis 2019; Farooq et al. 2017; Foti et al. 2008; Kumari et al. 2017; Shabbir et al. 2014; Vaktabhai and Kumar 2017). Adicionalmente, el uso del priming ha favorecido el desarrollo durante la etapa reproductiva, incrementando el rendimiento de distintos tipos de cultivos, tales como tomate (Vaktabhai and Kumar 2017), trigo (Muzaffar et al. 2019), y poroto de soja (Langeroodi and Noora 2017), entre otros. Es muy interesante que también se ha reportado que los cambios inducidos por efecto del priming pueden ser traspasados a la siguiente generación (F1), como es el caso del arroz (*Oryza sativa* L.), el cual fue sometido a un priming con MPs en su estado de semilla y evidenció un cambio epigenético relacionado con las ATPasas tipo-P transportadoras de MPs, cambio que fue traspasado a la siguiente generación, dando prueba de memoria transgeneracional (Cong et al. 2019; Rasmann et al. 2012). Sin embargo, esto ha sido muy poco estudiado en otras especies y se desconoce si otros mecanismos, como por ejemplo el transporte de metabolitos hacia la semilla, juegan un rol en la resistencia de la descendencia.

Los mecanismos asociados al priming pueden ocurrir a diferentes niveles, incluyendo epigenético (e.g., por modificación del ADN e histonas), transcripcional (por ejemplo cambios en la abundancia de transcritos de diversos genes y factores de transcripción), y a nivel de proteínas, o modulando actividades enzimáticas (Schwachtje et al. 2019). Sin embargo, los cambios relacionados con el priming a nivel metabólico permanecen en gran parte inexplorados, a pesar de que muchos metabolitos se ven alterados durante el proceso de priming (Schwachtje et al. 2019).

3.6 Interés en *Chenopodium quinoa*

En el contexto de cambio climático es de gran interés identificar plantas que posean la capacidad de resistir ambientes con altas concentraciones de MPs, alta salinidad, poca agua. *Chenopodium quinoa* ha ganado reconocimiento e importancia en el ámbito de la agronomía y la salud alimentaria, puesto que sus semillas son libres

de gluten, con un alto contenido de proteínas y aminoácidos esenciales, posee grasas no saturadas y alto contenido de flavonoides, minerales y vitaminas (Lutz *et al.* 2013; Gómez-Caravaca *et al.* 2012; Alvarez-Jubete *et al.* 2010; Paško *et al.* 2008). *Chenopodium quinoa* es una planta halófila, es decir que posee una alta tolerancia a estrés en ambientes salinos (Benlhabib 2015.), lo que conlleva un sistema de defensa contra el estrés oxidativo (Adolf 2013), el cual es necesario para poder establecerse en un ambiente que también posee MPs. La quinoa ha demostrado ser resistente a varios tipos de estrés abióticos, gracias a la variabilidad natural que posee, ha logrado conquistar diversos ambientes, como altiplanos, valles, salares, zonas costeras y subtropicales (Hinojosa *et al.* 2018), encontrándose diversos ecotipos de este espécimen. *Chenopodium quinoa* es una de las pocas plantas de importancia agronómica que pueden desarrollarse en las condiciones climáticas Alto andinas del Lago Titicaca, caracterizada por un clima semi-árido y frío, a 3800 metros de altura sobre el nivel del mar, y en suelos con un alto contenido de sal y MPs, incluyendo Pb, Cu y Cd, entre otros (Hinojosa *et al.* 2018; Monroy *et al.* 2014). Es por ello que la quinoa es una planta con potenciales aplicaciones en fitorremediación de suelos contaminados por MPs. Se han realizado pocos estudios en *C. quinoa* bajo estrés por Pb, y los resultados arrojan que suele acumular Pb en las raíces, por lo que se ven casi nulas cantidades de Pb en los órganos aéreos (Radovanovic *et al.* 2020). Tomando en cuenta esta evidencia, *C. quinoa* se podría catalogar como una planta acumuladora de plomo en raíces, característica importante si se quiere cultivar en suelos contaminados, y producir alimento que no sea un riesgo para el consumo de la población. Cabe destacar que el genoma de *C. quinoa* ha sido secuenciado en totalidad (Jarvis *et al.* 2017), lo que da oportunidad a realizar trabajos de análisis genéticos y moleculares en esta especie.

En el presente trabajo de Tesis, se pretende evaluar la tolerancia de *C. quinoa* al estrés por Pb y evaluar también si la aplicación de pre-acondicionamiento o priming en semillas puede inducir una tolerancia diferencial al estrés por Pb.

En primer lugar, se realizará un trabajo bioinformático consistente en buscar secuencias de genes implicados en tolerancia a Pb que han sido identificados en otras plantas, y a continuación identificar la presencia de posibles homólogos en el genoma de *C. quinoa*. A continuación, se realizará un trabajo experimental consistente en evaluar la tolerancia de semillas de quinoa al estrés por Pb durante el proceso de germinación, y el posible efecto de la aplicación de varios tipos de priming (hydropriming y priming químicos) en dicha tolerancia. Los resultados obtenidos aportarán información importante sobre el potencial de quinoa como planta tolerante a Pb y su posible uso en fitorremediación o como cultivo alimentario seguro en suelos contaminados con Pb.

4. HIPÓTESIS

La planta de interés alimentario *Chenopodium quinoa* es tolerante a plomo, y la aplicación de pre-acondicionamientos (hydropriming y priming químicos) inducirá un aumento de la tolerancia de quinoa al estrés inducido por Pb en procesos como germinación.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la tolerancia de *Chenopodium quinoa* al estrés por plomo, y estudiar el efecto del hydropriming y priming químicos (inducidos por ácido ascórbico, peróxido de hidrógeno y melatonina) en la germinación de quinoa bajo estrés por plomo.

5.2 Objetivos específicos

1. Identificar y caracterizar por métodos bioinformáticos homólogos de genes relacionados con tolerancia a plomo en el genoma de *C. quinoa*.
2. Determinar el efecto de estrés por plomo en la germinación

3. Determinar el efecto de diferentes tipos de priming en la germinación en presencia y ausencia de plomo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Búsqueda y recopilación de genes relacionados con tolerancia a Pb

Para la búsqueda de artículos académicos que trataban sobre genes de resistencia a Pb, se utilizó Google Académico (<https://scholar.google.com/>), una vez encontrados los genes, se buscaron los accession numbers en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), donde se encontraron los genes descritos en la Tabla 1 y se descargaron secuencias nucleotídicas de los genes en formato FASTA.

Para comprobar si en el genoma de *C. quinoa* hay homólogos de genes relacionados con tolerancia a Pb, se hizo uso del programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), donde se colocaron las secuencias codificantes de los genes encontrados y se comparó con el genoma de *C. quinoa*. Si bien, algunas secuencias se catalogaron como homólogas, también se realizó una identificación de los dominios tanto en los genes encontrados como en los homólogos de *C. quinoa*, y para eso se utilizaron programas que tienen como función la predicción de dominios proteicos, estos fueron: SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) y HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/phmmer>). Las imágenes que se colocaron en este trabajo pertenecen al programa HMMER. También se usaron programas para determinar su localización subcelular CELLO2GO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/cello2go/>), y si poseían dominios transmembrana MINNOU (<http://minnou.cchmc.org/>). Todo esto con el fin de conocer si las secuencias homólogas son lo más parecidas tanto en estructura como función.

6.2 Alineamiento y análisis filogenético

Una vez analizados y comparados los dominios proteicos de las secuencias homólogas (originales y *C. quinoa*), se escogieron 3 genes que mostraron mayor homología con *C. quinoa* para continuar con los posteriores análisis filogenéticos. Estos genes fueron *PSE1* (NM_120720), *PDR12* (NM_101421) y *ATM3* (AY142686).

Con el fin de conocer la relación evolutiva y conseguir una identificación clara de los genes homólogos correspondientes en *C. quinoa*, se realizó un análisis filogenético, para poder tener evidencia de qué tan cercanos o alejados evolutivamente están estos homólogos.

El análisis filogenético fue realizado por el programa MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, and Tamura 2018).

Con este fin, se incluyeron en el análisis filogenético distintas especies de interés agrícola, tanto dicotiledóneas como *C. quinoa*, las cuales fueron: *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Phaseolus vulgaris* y *Beta vulgaris*, como también, una especie monocotiledónea con el propósito de servir como outgroup (*Zea mays*). Se buscaron homólogos de *PSE1*, *PDR12* y *ATM3* en las especies nombradas previamente, haciendo uso del programa BLAST.

Una vez obtenidas las secuencias homólogas, estas fueron alineadas en MEGA X, se ocuparon 2 tipos de alineamientos, Muscle y ClustalW, dependiendo de cuántos gaps había se realizaron leves ajustes en el alineamiento y se conservó el que reflejaba mejores valores de Bootstrap en el posterior árbol filogenético obtenido. Los árboles filogenéticos fueron obtenidos a base de 2 métodos de inferencia filogenética, y para cada gen fue:

PSE1: 1) Método de Neighbor-joining, basado en el modelo evolutivo Maximum Composite Likelihood (MCL), con una robustez de nodo evaluado con el método de Bootstrap (N=2000 pseudoreplicados). 2) Método de Maximum Likelihood, basado en el modelo de Tamura-Nei, con una robustez de nodo evaluado con el método de Bootstrap (N=2000 pseudoreplicados).

PDR12: 1) Método de Neighbor-joining, basado en el modelo evolutivo Maximum Composite Likelihood (MCL), con una robustez del nodo evaluado con el método de Bootstrap (N=2000 pseudoreplicados). 2) Método de Maximum Likelihood, basado en el modelo reversible de tiempo general, con una robustez de nodo evaluado con el método de Bootstrap (N=2000 pseudoreplicados).

ATM3: 1) Método de Neighbor-joining, basado en el modelo evolutivo Maximum Composite Likelihood (MCL), con una robustez del nodo evaluado con el método de Bootstrap (N=2000 pseudoreplicados). 2) Método de Maximum Likelihood, basado en el modelo de Tamura-nei, con una robustez de nodo evaluado con el método de Bootstrap (N=2000 pseudoreplicados).

6.3 Diseño de Primers

Las secuencias genéticas obtenidas en BLAST, y alineadas anteriormente, fueron procesadas por el programa Primer3input (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), con el fin de obtener secuencias para realizar qPCR (“Reacción en cadena de la polimerasa” cuantitativa) a futuro y poder visualizar la expresión de los genes homólogos encontrados en *C. quinoa*. Las características seleccionadas fueron:

Largo de Amplicón: 50-150 pares de bases.

Largo óptimo del primer: 20 bases.

Temperatura de fusión (T_m): 58 °C a 60 °C (T_m óptimo de 59 °C).

Porcentaje de guanina y citosina (% GC): 30% a 80%.

Final 3': Los últimos 5 nucleótidos al final 3' no deben contener más de 2 residuos G+C.

6.4 Material vegetal y reactivos químicos

Se ocupó un genotipo chileno de *C. quinoa* (Willd.): Socaire, originario del altiplano chileno (Socaire, 23°35'31.58" S, 67°53'17.69" W). Las semillas se obtuvieron del Banco Nacional de Semillas gestionado por INIA-Intihuasi (Vicuña, Chile).

Los reactivos químicos utilizados fueron el nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; Laboratorio Bioquímica.cl), el ácido ascórbico (AsA, Winckler Ltda.), peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , EMD Chemicals, Inc.), y melatonina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

6.5. Efecto del Pb en la germinación de semillas de *C. quinoa*

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sobre la germinación de semillas de quinoa. Las semillas fueron lavadas y esterilizadas con hipoclorito de sodio 0.1% por 1 minuto; posteriormente, se colocaron en placas Petri con papel absorbente que contenía 5 ml de solución de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a diferentes concentraciones (0, 0.5, 0.75, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 125, 150, 200 y 300 mM). durante 24 h, a $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad. Se utilizaron cincuenta semillas para cada tratamiento, y los experimentos se realizaron por triplicado.

Durante los experimentos de germinación se determinaron los siguientes parámetros: porcentaje de germinación, tiempo medio de germinación, y velocidad media de germinación (Scott *et al.*, 1984; Ranal & Santana, 2006).

- Porcentaje de Germinación (PG), se define como el número de semillas germinadas / número de semillas totales x 100.
- El tiempo medio de germinación (TMG o \bar{t}) se calculó como la media ponderada del tiempo de germinación. El número de semillas germinadas en intervalos de tiempo establecidos para la recolección de los datos es utilizado como ponderación, dado que considera que un número diferente de semillas germinan cada vez. Por esto se calcula TMG como:

$$\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

Donde: t_i : tiempo desde el inicio del experimento a la i^{th} observación (hora); n_i : número de semillas germinadas en el tiempo i (no el número acumulado, sino el número correspondiente a la i^{th} observación); y k : último tiempo de germinación.

- La velocidad media de germinación (VGM o \bar{v}) se define como el recíproco del tiempo medio de germinación, dado a que VGM aumenta con $1/\bar{t}$ y no con \bar{t} . Para obtener VGM es necesario calcular el Coeficiente de Velocidad de Germinación (CVG), dado por:

$$CVG = \left(\frac{\sum_{i=1}^k f_i}{\sum_{i=1}^k f_i x_i} \right) \times 100$$

Donde f_i : número de semillas recién germinadas en el día i ; x_i : número de días desde la siembra; y k : último día de germinación. Dado que CVG es recíproco de TMG, puede ser utilizado para calcular VMG como $\bar{v} = CVG/100 = 1/\bar{t}$, donde \bar{t} : TMG.

Se contabilizó el número de semillas germinadas cada 2 h hasta 24 h después de la imbibición de la semilla. La germinación se consideró completa cuando la radícula emergió de la semilla.

6.6. Efecto del priming en la germinación en presencia de Pb

Las semillas de *c. quinoa* fueron sometidas a distintos tratamientos de priming, los cuales fueron:

Hydropriming (H₂O): las semillas fueron lavadas y esterilizadas con hipoclorito de sodio 0.1% por 1 minuto, como se comentó anteriormente. A continuación, las semillas se incubaron en agua destilada por 6 h en placas Petri con papel absorbente, 20°C. También se incubaron semillas por 12 h en tubos Falcon, completamente sumergidas en la solución, con una razón peso/volumen de 1:5.

Priming químico con Ácido ascórbico (AsA): después de la esterilización, las semillas se incubaron por 6 h en placas Petri con papel absorbente y 5 mL de solución de AsA a diferentes concentraciones (25 mM, 50 mM). También se incubaron semillas por 12 h en tubos Falcon, con la solución AsA a varias concentraciones (5, 25, 50 y 75 mM), con las semillas completamente sumergidas

en la solución, con una razón peso/volumen de 1:5.

Priming con peróxido de hidrógeno (H₂O₂): después de la esterilización, las semillas se incubaron por 6 h en placas Petri con papel absorbente y 5 mL de solución H₂O₂ a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM). También se incubaron semillas por 12 h en tubos Falcon con la solución de H₂O₂ (0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM).

Priming con Melatonina (Mel): después de esterilización, las semillas se incubaron por 6 h en placas Petri con papel absorbente y 5 mL de solución de Mel a diferentes concentraciones (0.1, 0.4, 0.7 y 1 mM). También se incubaron semillas en tubos Falcon por 12 h con la solución Mel (0.1, 0.4, 0.7 y 1 mM).

Cumplidas las horas de pre-acondicionamiento, las semillas fueron lavadas 3 veces con agua destilada para remover cualquier resto de la solución de tratamiento. A continuación, las semillas se secaron con papel absorbente y se dejaron secar a temperatura ambiente, en oscuridad, por 24 h, hasta que las semillas recuperaran el peso que tenían antes de ser tratadas con el pre-acondicionamiento. Una vez pasadas las 24 h de secado, las semillas estaban listas para hacer los experimentos de germinación en placa con solución de Pb.

A continuación, las semillas fueron expuestas a una concentración 125 mM de de Pb (NO₃)₂ (elegida previamente a partir de los resultados de los ensayos de germinación), durante 24 h a 20°C ± 2°C en oscuridad. Se utilizaron cincuenta semillas para cada tratamiento y los experimentos se realizaron por triplicado.

Para calcular los efectos de hydropriming, y de los priming por AsA, H₂O₂ y Mel en la germinación de las semillas, se calculó el Porcentaje de Germinación (GP), la Velocidad media de germinación (VGM), y el Tiempo medio de germinación (TMG), de la misma manera descrita en la metodología de germinación.

6.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos de los experimentos de germinación, se aplicó ANOVA de una vía con mediciones repetidas, utilizando como factores: priming y Pre-acondicionamiento (pre-acondicionado con hydropriming, ácido ascórbico, o peróxido de hidrógeno, melatonina y no pre-acondicionado) y estrés (Pb o control).

Se utilizará una prueba de Tuckey HSD (con un valor de significancia $p < 0.05$) como prueba posthoc, con el objetivo de evaluar diferencias significativas.

7. RESULTADOS

7.1. Búsqueda y recopilación de genes relacionados con tolerancia a Pb en especies vegetales



Consultando las bases de datos y bibliografía, se identificaron diversos genes relacionados con tolerancia al Pb en diversas especies vegetales, así como sus secuencias génicas y proteínicas. Dichos genes, se exponen en la siguiente Tabla 1:

Gen	Acc.N/Loc	Especie	Descripción	% identity	E value	Query Cover	Ref. Bibliográfica	Posibles homólogos en <i>C. quinoa</i>
PSE1	Atg5g06370/NM_120720	Arabidopsis thaliana	779pb, mRNA. Su sobre expresión resulta en una mayor acumulación de Pb y un aumento en la expresión de PDR12.	69.85%	5e-85	91%	(Fan et al., 2016)	LOC110735406 LOC110733850
EIN2	At5g03280/NM_120406	Arabidopsis thaliana	3884pb, mRNA. Proteína de la familia de las transportadoras de iones metales. Media resistencia a Pb a través de un mecanismo dependiente de GSH y uno independiente de GSH mediado por atPDR12	73.29%	7e-72	49%	(Cao et al., 2009)	LOC110696496 LOC110682798
ACBP1	At5g53470/NM_124726.4	Arabidopsis thaliana	659pb, mRNA. Mayor acumulación de Pb en brotes	71.82%	6e-113	49%	(Xiao et al., 2008)	LOC110738841 LOC110728375
PDR12	At1g15520/NM_101421	Arabidopsis thaliana	4271 pb, mRNA. Bomba que excluye Pb del citoplasma	71.79%	0.0	87%	(Lee et al., 2005)	LOC110698721 LOC110703309 LOC110723123 LOC110712155
ATM3	At5g58270/AY142686	Arabidopsis thaliana	2187pb, mRNA. Transportador ATP-binding cassette, transporta Cd-conjugado con glutamina sintetasa a través de membrana mitocondrial	77.17%	0.0	79%	(Kim et al., 2006)	LOC110717407 LOC110716773
SbLRR2	-	-	-	-	-	-		No homólogos
OsMT-1-2-C	AF001396	Oryza sativa	188pb, metalotioneína de clase 1, su transcripción se ve aumentada significativamente en presencia de Pb ²⁺ . También aumenta la tolerancia al estrés por Pb en células de levadura sensibles a plomo.	71.20%	1e-08	32%	(Xu et al., 2007)	LOC110720171
Kc MT2	DQ414691	Kandelia Candel	239pb, metalotioneína de clase 2, alta respuesta transcripcional en presencia de Pb. Se expresó en <i>Escherichia coli</i> BL21 como una extensión terminal-carboxi de la glutatión-S-transferasa, lo cual resultó en un mayor crecimiento de la bacteria en un medio con Pb.	71.08%	2e-25	35%	(Huang et al., 2012)	LOC110706238

Tabla 1. Genes relacionados con resistencia a Pb, su número de acceso, especie a la que pertenecen, breve descripción que posee el largo de la zona codificante del gen y su función. Seguido se puede observar los valores que se toman en cuenta para ver si poseen homólogos en *C. quinoa*. El gen que codifica para SbLRR2 no aparece en la tabla porque no posee homólogos en quinoa, por lo que se evitó su descripción.

Se encontraron 8 genes relacionados con la tolerancia a Pb, y uno de ellos (*SbLRR2*) no poseía ningún tipo de homología en *C. quinoa*. (Tabla 1). Si bien, no todos los genes ocupados en este trabajo poseen una homología casi idéntica en genes de *C. quinoa*, algunos sí presentaban un Query Cover bastante similar, esto nos dice qué tanto la secuencia que estamos consultando está cubierta por la secuencia objetivo (posible homóloga), dato que necesita estar acompañado del Porcentaje de Identidad, el cual nos indica el porcentaje de número de bases que coinciden sobre el número de alineación de las columnas. Para asegurarnos, hubo que observar también el E-value, el cual nos indica el número de aciertos esperados

de calidad similar que se pueden encontrar por casualidad, por lo que se busca el E-value más bajo posible, asegurando que los aciertos sean por la menor casualidad posible.

En cuanto a los dominios, realmente todos los genes de origen tienen una alta homología con los genes de *C. quinoa*, los dominios presentes muchas veces son casi idénticos, pero hay leves diferencias en algunos, por ejemplo *PSE1* (Tabla 2), donde su posible homólogo en *C. quinoa* posee 2 péptidos señal de transmembrana, péptido señales que el gen de *A. thaliana* no posee. Otros casos son de *ATM3* y *EIN2*, donde cada gen y su posible homólogo varían solo en 1 péptido señal.

Dentro de los genes estudiados, 3 poseen porcentajes altos tanto en Query Cover y Porcentaje de Identidad, y a la vez un E-value bajo, estos genes son: *PSE1*, *PDR12*, y *ATM3*. Estos genes fueron seleccionados para hacer un posterior análisis bioinformático.

7.2. Identificación y caracterización de homólogos de dichos genes en el genoma de *C. quinoa* mediante análisis bioinformático

En la anterior Tabla 1 se indican también los putativos genes homólogos identificados en el genoma de *C. quinoa*. En la Tabla 2 se detallan los dominios identificados en la secuencia codificante de dichos genes.

	Especie/accession number o locus	Dominios
PSE1	Arabidopsis thaliana/ NM_120720	LRAT
	Chenopodium quinoa/ LOC110735406	LRAT, 2 péptido señal de transmembrana
EIN2	Arabidopsis thaliana/ NM_120406	Nramp, 12 péptido señal de transmembrana
	Chenopodium quinoa/ LOC110696496	Nramp, 13 péptido señal de transmembrana
ACBP1	Arabidopsis thaliana/ NM_124426	ACBP,3 repeticiones Ankirin, 1 péptido señal de transmembrana
	Chenopodium quinoa/ LOC110738841	ACBP, 3 repeticiones Ankirin, 1 péptido señal de transmembrana
PDR12	Arabidopsis thaliana/ NM_101421	Transportador ABC N-terminal, 2 transportador ABC, 2 transportador ABC tipo 2 membrana, 1 transportador planta PDR asociado a ABC tipo 2, 13 péptido señal de transmembrana.
	Chenopodium quinoa/ LOC110698721	Transportador ABC N-terminal, 2 transportador ABC, 2 transportador ABC tipo 2 membrana, 1 transportador planta PDR asociado a ABC tipo 2, 13 peptido señal de transmembrana.
ATM3	Arabidopsis thaliana/ AY142686	Región transportador ABC de transmembranamembrana, transportador ABC, 5 peptido señal de transmembrana.
	Chenopodium quinoa/ LOC110717407	Región transportador ABC de transmembranamembrana, transportador ABC, 4 peptido señal de transmembrana.
OsMT-1,2-C	Oryza sativa/ AF001396	Nada
	Chenopodium quinoa/ LOC110720171	Nada
Kc MT2	Kandelia candel/ DQ414691	Metalotioneína cercana a clase 2
	Chenopodium quinoa/ LOC110706238	Metalotioneína cercana a clase 2

Tabla 2. Tabla que representa dominios obtenidos por el programa SMART y HMMER. En la primera columna está el nombre del gen, en la segunda columna se encuentra la especie a la que pertenece y el locus/o número de acceso, y en la tercera columna los grupos de dominios encontrados en la secuencia genómica que codifica para cada gen y su respectivo homólogo en *C. quinoa*.

A continuación, se detalla un Glosario de los dominios identificados (definiciones

obtenidas de InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)

LRAT: La aciltransferasa LRAT es la principal enzima que cataliza la esterificación de la vitamina A. Las proteínas LRAT y similares a LRAT comparten un pliegue de dominio catalítico común representado por esta entrada.

Nramp: La familia NRAMP es una nueva familia de proteínas relacionadas funcionalmente definidas por un núcleo hidrófobo conservado de diez dominios transmembrana. Nramp1 es una proteína de membrana integral expresada exclusivamente en células del sistema inmunológico y se recluta en la membrana de un fagosoma tras la fagocitosis. Nramp2 es un transportador de cationes divalentes múltiples para Fe^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} entre otros.

ACBP: El dominio ACB consta de cuatro hélices alfa dispuestas en forma de cuenco con un sitio de unión a acil-CoA muy expuesto. El ligando se une a través de interacciones específicas con residuos en la proteína, más notablemente varias cargas positivas conservadas que interactúan con el grupo fosfato en el resto adenosina-3'fosfato, y la cadena de acilo está intercalada entre las superficies hidrófobas de CoA y la proteína. Aunque ACBP se presenta como una proteína completamente independiente, se han identificado dominios ACB intactos en varias proteínas grandes y multifuncionales en una variedad de especies eucariotas. Estos incluyen grandes proteínas asociadas a la membrana con dominios ACB N-terminales, enzimas multifuncionales con dominios ACB y enoil-CoA peroxisomal Delta (3), Delta (2) -enoil-CoA isomerasa y proteínas con un dominio ACB y repeticiones de anquirina.

Ankyrin: La repetición de anquirina es un motivo estructural común que se encuentra en una variedad de proteínas funcionalmente diversas. Cada repetición consta de 33 residuos que son propensos a sustituciones. Se ha demostrado que muchas repeticiones de anquirina moderan las interacciones proteína-proteína, p. Ej. en proteínas citoesqueléticas, de membrana y reguladoras. La diversidad de sus

secuencias conduce a su eficacia como mediadores de interacción, siendo el carácter y la especificidad de la interacción mediada por repeticiones particulares.

Transportador ABC: Los transportadores ABC pertenecen a la superfamilia ATP-Binding Cassette (ABC) que utiliza la hidrólisis de ATP para energizar diversos sistemas biológicos de importación y exportación. Los transportadores ABC están mínimamente constituidos por dos regiones conservadas: un casete de unión de ATP altamente conservado (ABC) y un dominio transmembrana menos conservado (TMD). Estas regiones se pueden encontrar en la misma proteína.

Pero en un subgrupo de exportadores, la región transmembrana está codificada por un polipéptido separado, la proteína de membrana integral del sistema de transporte tipo ABC-2.

Transportador ABC n-terminal: Este dominio se encuentra en el N-terminal de las proteínas transportadoras ABC desde hongos, plantas hasta eucariotas superiores. Se predice que será un dominio intracelular.

Metalotioneínas: Las metalotioneínas (MT) son pequeñas proteínas que se unen a metales pesados, como zinc, cobre, cadmio, níquel, etc. Tienen un alto contenido de residuos de cisteína que unen los iones metálicos a través de grupos de enlaces tiolato.

7.3. Análisis filogenéticos

Se realizaron reconstrucciones filogenéticas para elucidar las relaciones evolutivas de genes de tolerancia a Pb identificados en diversas especies vegetales y sus putativos homólogos en quinoa. Estos análisis filogenéticos han permitido identificar con mayor precisión dichos homólogos putativamente implicados en tolerancia a Pb en el genoma de quinoa. En estos árboles, los genes sombreados en morado corresponden a los genes implicados en la tolerancia al Pb, según diversos autores han comprobado experimentalmente en diversas especies vegetales. Los genes

sombreados en azul corresponden a los putativos homólogos de ese gen que hemos identificado en el genoma de quinoa.

ATM3

Se puede observar que se agrupa con homólogos de *B. napus*, y el gen homólogo presente en quinoa se encuentra agrupado en otro clado junto con *B. vulgaris*. Este resultado se puede ver reflejado tanto en los árboles filogenéticos obtenidos con Maximum Likelihood (Fig. 1) y Neighbor Joining (Fig. 2).

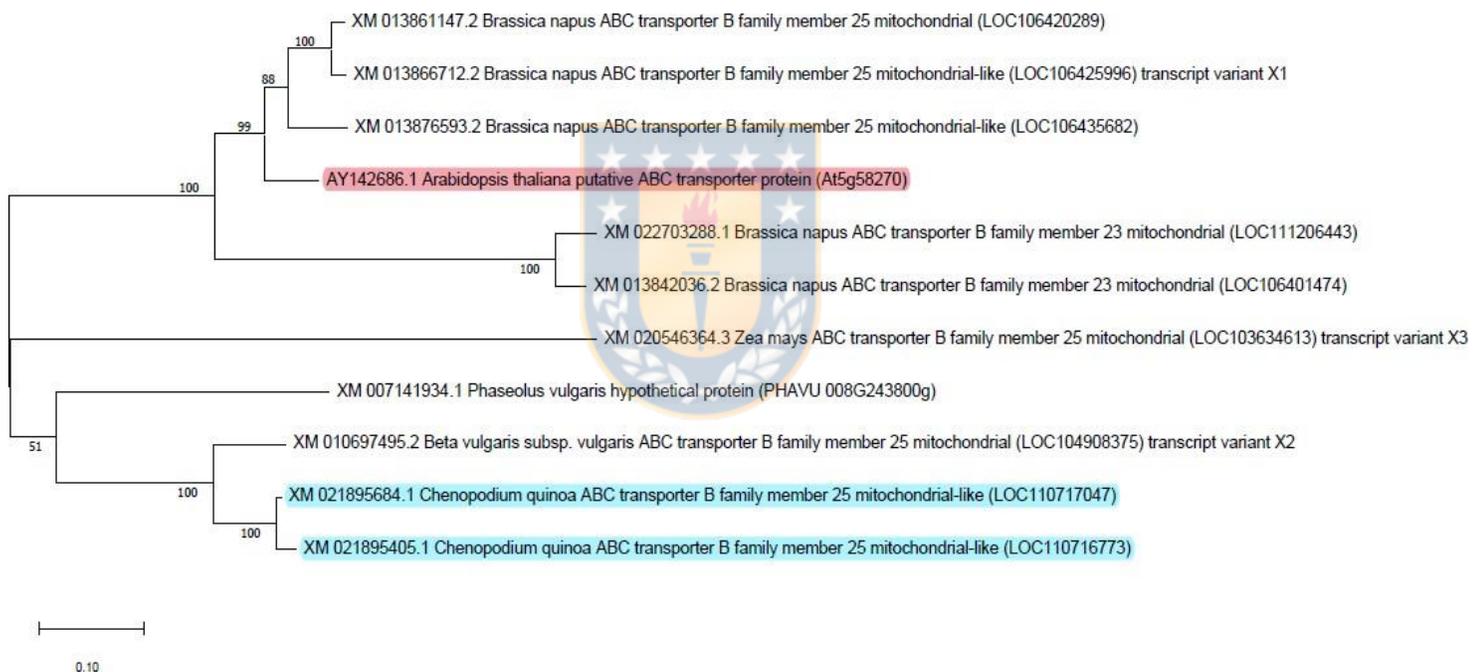


Figura 1. Árbol filogenético de *ATM3* y genes homólogos relacionados. *ATM3* y homólogos relacionados presentes en la base de datos GeneBank y árbol filogenético construido por el método de Maximum Likelihood. Los números por debajo y por encima de los puntos de bifurcación señalan los niveles de confianza de la relación de las secuencias emparejadas.

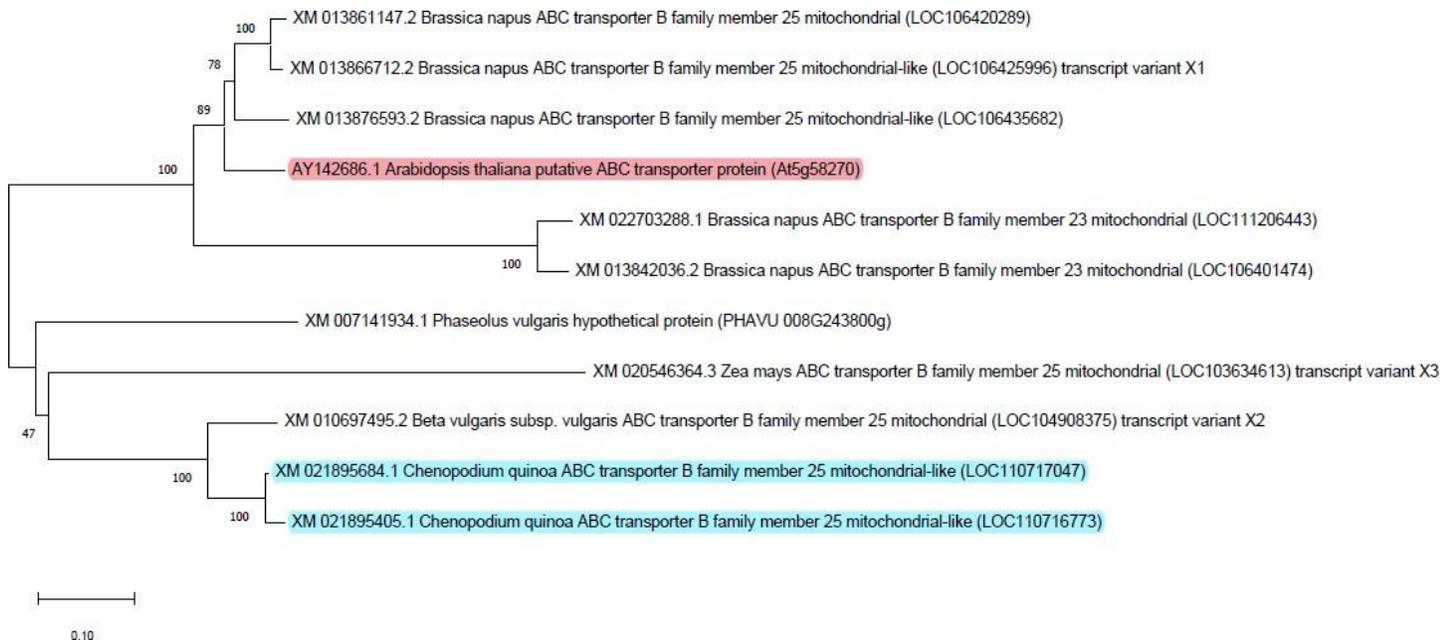


Figura 2. Árbol filogenético de *ATM3* y genes homólogos relacionados. *ATM3* y homólogos relacionados presentes en la base de datos GeneBank y árbol filogenético construido por el método de Neighbor Joining. Los números por debajo y por encima de los puntos de bifurcación señalan los niveles de confianza de la relación de las secuencias emparejadas determinadas por el análisis estadístico de Bootstrap. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio.

PDR12

Este gen se ubica en un clado que contiene tanto a *C. quinoa* como *B. vulgaris* y *B. napus*. Esto, acompañado de valores de Bootstrap que están sobre 80 en los nodos pertenecientes al clado en el que se encuentra el gen *PDR12* y sus homólogos, confirman la robustez del análisis desarrollado. Estos resultados se pueden observar en árboles obtenidos tanto por Maximum Likelihood (Fig. 3) y Neighbor Joining (Fig.4).

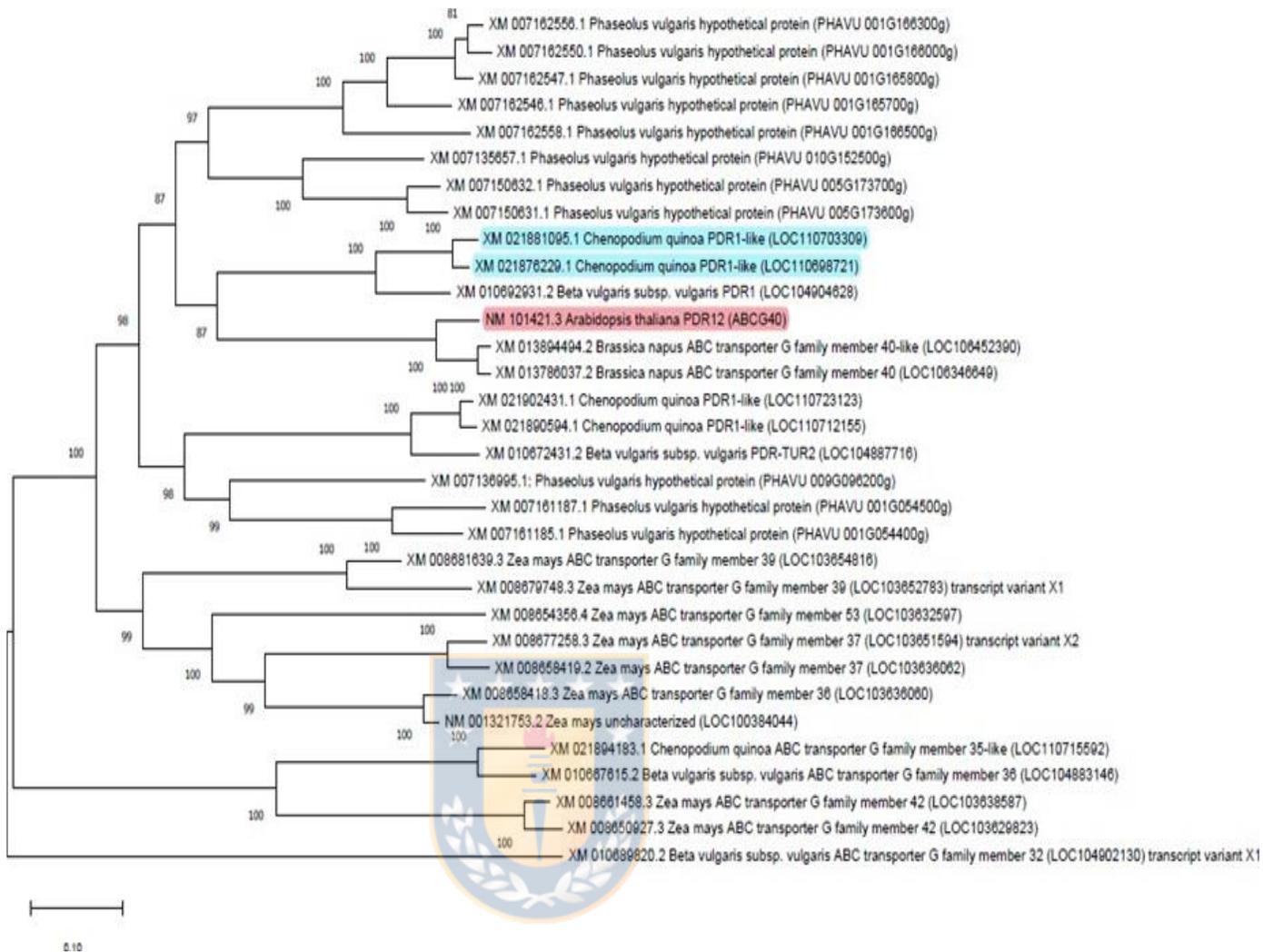


Figura 3. Árbol filogenético de *PDR12* y genes homólogos relacionados. *PDR12* y homólogos relacionados presentes en la base de datos GeneBank y árbol filogenético construido por el método de Maximum Likelihood. Los números por debajo y por encima de los puntos de bifurcación señalan los niveles de confianza de la relación de las secuencias emparejadas determinadas por el análisis estadístico de Bootstrap. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio.

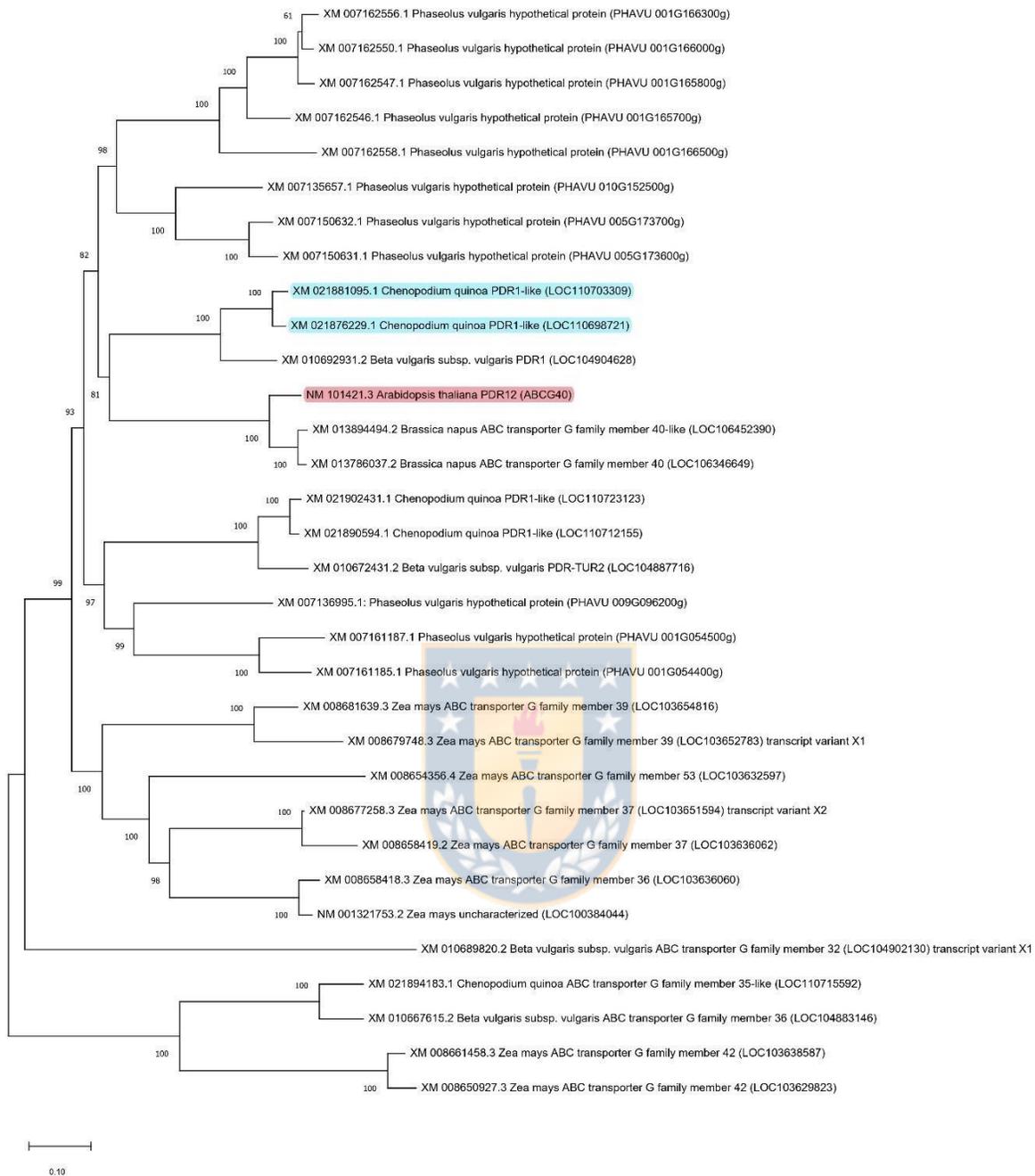


Figura 4. Árbol filogenético de *PDR12* y genes homólogos relacionados. *PDR12* y homólogos relacionados presentes en la base de datos GeneBank y árbol filogenético construido por el método de Neighbor Joining. Los números por debajo y por encima de los puntos de bifurcación señalan los niveles de confianza de la relación de las secuencias emparejadas determinadas por el análisis estadístico de Bootstrap. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas

en el número de sustituciones por sitio.

PSE1

En cuanto al gen *PSE1*, el árbol obtenido con Maximum Likelihood (Fig. 5) muestra que el homólogo encontrado en *C. quinoa* se encuentra agrupado junto con *B. vulgaris*, y el gen originario de *A. thaliana* se encuentra agrupado con *B. napus*. También se establece de manera lógica que el outgroup ocupado (*Z. mays*) se encuentra cumpliendo su función. En cambio, en el árbol obtenido con Neighbor Joining, los homólogos presentes en *C. quinoa* se encuentran agrupados con *B. vulgaris*, pero el gen originario de *A. thaliana* no se encuentra agrupado en un clado con *B. napus*, y también se puede observar como un gen de *Z. mays* (monocotiledónea) se encuentra dentro de un clado de dicotiledóneas.

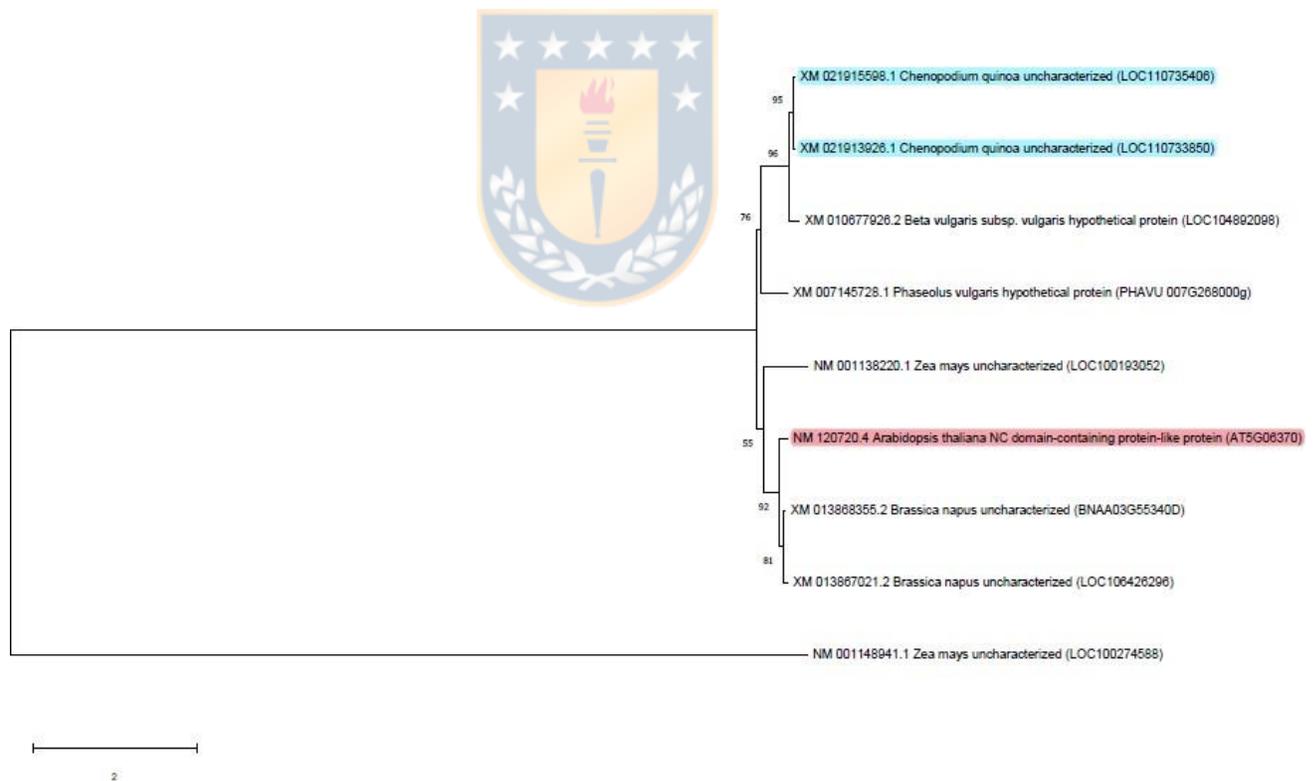


Figura 5. Árbol filogenético de *PSE1* y genes homólogos relacionados. *PSE1* y homólogos relacionados presentes en la base de datos GeneBank y árbol filogenético construido por el método de Maximum Likelihood. Los números por

debajo y por encima de los puntos de bifurcación señalan los niveles de confianza de la relación de las secuencias emparejadas determinadas por el análisis estadístico de Bootstrap. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio.

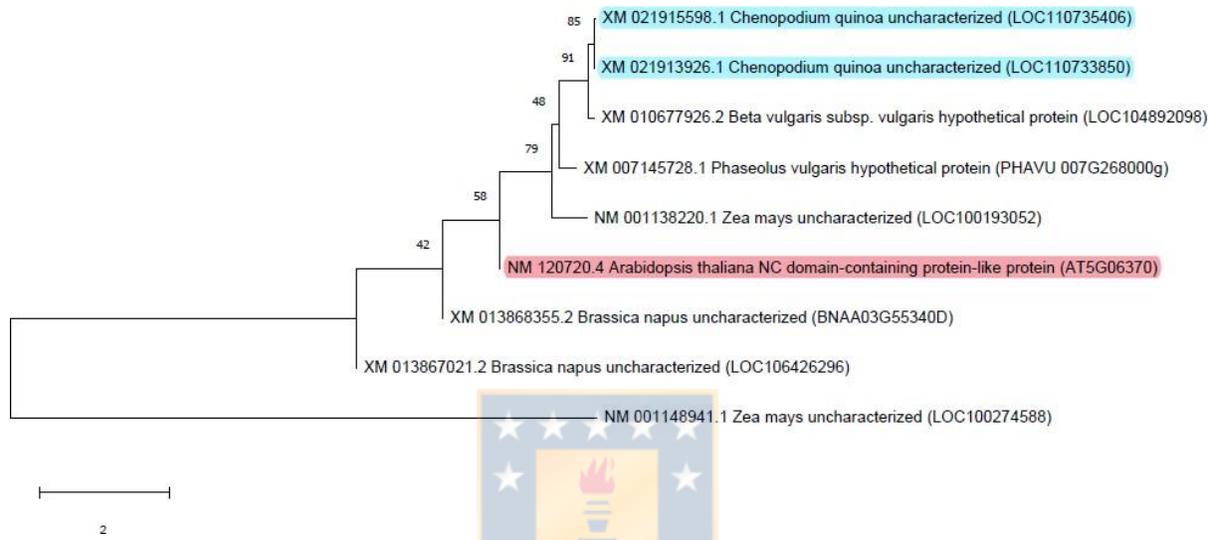


Figura 6. Árbol filogenético de *PSE1* y genes homólogos relacionados. *PSE1* y homólogos relacionados presentes en la base de datos GeneBank y árbol filogenético construido por el método de Neighbor Joining. Los números por debajo y por encima de los puntos de bifurcación señalan los niveles de confianza de la relación de las secuencias emparejadas determinadas por el análisis estadístico de Bootstrap. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio.

7.4. Diseño de Primers para amplificar homólogos en *C. quinoa*

Hemos diseñado diversos primers posibles para amplificar los homólogos putativamente implicados en tolerancia a Pb en quinoa. Entre todos ellos, los candidatos *a priori* óptimos son los siguientes:

Homólogos *ATM3*

LOC110717047

Primer izquierdo 5' GAATTTTGGGGGATTTGGTA 3'

Primer derecho 5' GCGTATGACCGGAGATGTAA 3'

Tamaño del producto: 63 pb.

Primer izquierdo 5' AAACGAATTTTGGGGGATTT 3'

Primer derecho 5' GCGTATGACCGGAGATGTAA 3'

Tamaño del producto: 67 pb.

Homólogos *PDR12*

LOC110698721

Primer izquierdo 5' TCCTAACAGGACGAGGCTTT 3'

Primer derecho 5' TGAGAGCAAAAATGGTGAGG 3'

Tamaño del producto: 68 pb.

Homólogos *PSE1*

LOC110735406

Primer izquierdo 5' CTGCTGCTTATCGTGGTTGT 3'

Primer derecho 5' CGATCAAGATTTTGCCTACG 3'

Tamaño del producto: 84 pb.

LOC110733850

Primer izquierdo 5' TTAGCGTTGCTTAACCTCCA 3'

Primer derecho 5' TTTTCTTGGTTCTCTGGGAAA 3'

Tamaño del producto: 64 pb.

7.5. Efecto del Pb en la germinación de semillas de *C. quinoa*

El porcentaje de germinación (PG) nos indica cuántas semillas germinaron en un período de 24 h. El PG observado en ausencia de Pb fue de 90% (Figura 7A). Entre el tratamiento control, en ausencia de Pb (0 mM) y el tratamiento con 50 mM Pb, no se ven diferencias significativas (PG entre 90%-80%) al cabo de 24 h. El porcentaje de germinación final se ve significativamente reducido con exposición a concentraciones de Pb a partir de 75mM de Pb (PG 73%) (Figura 7A). Entre los tratamientos 100mM y 125mM no existe diferencia significativa (51%-48%), pero estos tratamientos sí se diferencian significativamente de los demás, y alcanzan un PG aproximado de 49.5%. A partir de la concentración de 125 mM (PG del 48%) se genera otra pendiente pronunciada, donde la concentración de 150mM representa un PG de 22%, siendo significativamente diferente a todas las concentraciones iguales y menores a 125mM, pero no significativamente diferente al PG de concentraciones como 175mM (12%). No existen diferencias significativas entre 175 mM, 200 mM, donde el PG respectivo es de 12%, 5%. Desde concentraciones como 250 mM hacia arriba, se produce una inhibición total de la germinación.

El Tiempo medio de germinación (TGM) nos indica las horas que tarda las semillas en alcanzar el 50% de germinación. Observando la Figura 7B, se puede notar que hasta 5 mM Pb se observan valores de TGM similares que los observados a 0 mM. El primer aumento significativo respecto al control es en presencia de 10 mM. Desde 50 mM Pb en adelante comienzan a subir los valores de TGM, alcanzando un pico a la concentración de 200 mM Pb con un valor TGM de 22hrs, indicando que, a mayor concentración de Pb, más tiempo tardan en germinar el 50% de las semillas. La Velocidad media de germinación (VGM) es el recíproco de TGM, lo que nos indica qué tan rápido germinan las semillas en función del tiempo (cada 2h). Mientras menor sea el valor de VGM, más lenta es la germinación de las semillas. En la Figura 7C, se puede observar que la mayor VGM (0.064/2h) corresponde al

control 0mM Pb, mientras que a partir de 10 mM disminuye de una manera significativa (0.0457/2h) y disminuye progresivamente a medida que aumenta la concentración de Pb. Ya, en concentraciones de Pb 250 y 300 mM, VGM es 0 porque no hubo germinación alguna.



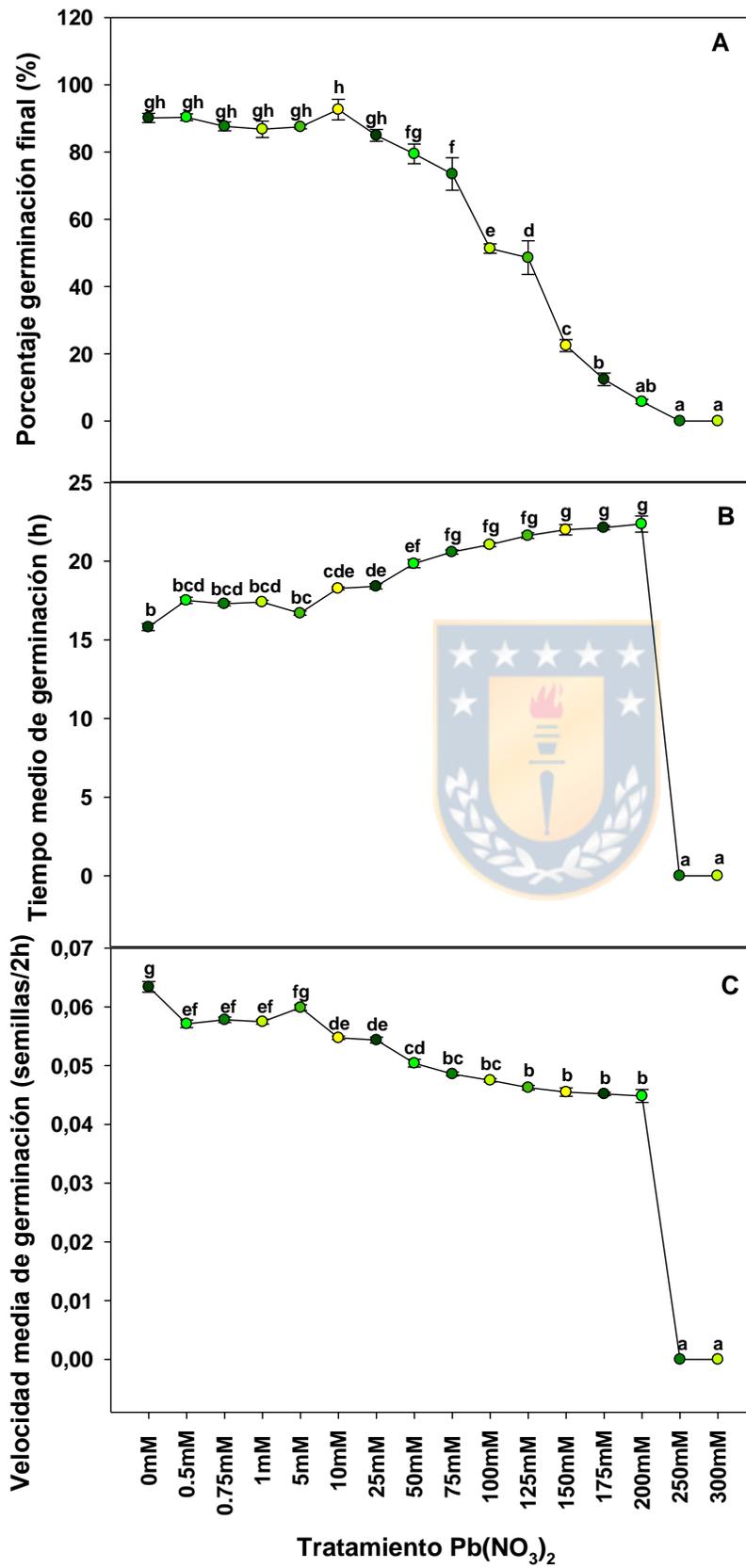


Figura 7. Germinación de semillas de *C. quinoa* al cabo de 24 h en presencia de concentraciones crecientes (0-300 mM) de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. (A) Porcentaje de Germinación. (B) Tiempo Medio de Germinación. (C) Velocidad Media de Germinación. (C). Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos según la prueba de Tuckey ($p < 0,005$).

7.6. Efecto del hydropriming en la germinación de semillas de *C. quinoa*

Se realizaron ensayos de germinación de semillas de quinoa en ausencia de Pb (0 mM) y en presencia de Pb 125 mM durante 24 h. Estas semillas se sometieron a un tratamiento previo de hydropriming (imbibición en agua durante 6 h o 12 h), y se compararon con semillas no sometidas a un hydropriming previo. Los resultados de germinación obtenidos se pueden observar en las Figuras 8, 9 y 10.

En ausencia de hydropriming, el porcentaje de germinación (PG) en ausencia de Pb (muestra "0mM" en Figuras 8, 9 y 10) es de aproximadamente un 88% (90,87,83% respectivamente), tal como se observó en resultados previos. Si las semillas se han sometido previamente a hydropriming (muestra "HP"), el PG de las semillas en ausencia de Pb es similar al observado en ausencia de hydropriming. Sin embargo, se observa que el TMG con hydropriming es significativamente menor que el observado en ausencia de hydropriming. Además, la VMG en presencia de hydropriming es significativamente mayor que la observada en ausencia de hydropriming (Figura 8, y sus réplicas en las Figuras 9 y 10). Por tanto, existe un efecto del hydropriming en la cinética de germinación de las semillas en ausencia de Pb.

En presencia de 125 mM Pb sin hydropriming previo (muestra "0mM/Pb") tiene lugar una inhibición de la germinación, siendo el PG de aproximadamente un 40%, con el consiguiente aumento en el TMG y descenso en la VMG, en comparación con los datos observados en ausencia de Pb (Figuras 8, 9 y 10). Si las semillas se han sometido a hydropriming previamente a la germinación en presencia de 125 mM Pb (muestra "HP/Pb"), se observa un aumento significativo del PG en presencia de Pb (aproximadamente un 80%) en comparación con las semillas germinadas en

presencia de 125 mM Pb sin hydropriming previo (muestra "Pb"). Al comparar estas muestras, se observa también un descenso significativo del TMG, pero no se observan diferencias significativas de la VMG (Figuras 8, 9 y 10).

Por tanto, el hydropriming induce una mejora de la germinación de las semillas de quinoa tanto en ausencia como en presencia de Pb.

7.7. Efecto del priming con ácido ascórbico en la germinación

En los experimentos de priming con ascórbico, peróxido de hidrógeno y melatonina se incluyeron muestras sometidas a hydropriming como control del priming químico (Figs. 8, 9 y 10).

En experimentos de germinación de semillas sometidas previamente a priming con ácido ascórbico (AsA) durante 6 h, y en ausencia de Pb, todos los tratamientos de priming con AsA e hydropriming dieron lugar a un porcentaje de germinación similar al de las muestras no sometidas a priming (Fig. 8A).

En cambio, todos los tratamientos de priming con AsA indujeron un aumento significativo del PG de las semillas en presencia de Pb (en torno al 80-90%) en comparación con la muestra con Pb no sometida a priming previo (0mM/Pb, 42%). Estos valores de PG son similares a los observados en las muestras sin Pb. No se encontraron diferencias significativas entre los efectos de las distintas concentraciones de AsA (25 y 50 mM AsA), y tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar el efecto del priming con AsA con el del hydropriming (Fig. 8A).

En ausencia de Pb, se observa que el TGM de las muestras con priming (tanto con AsA como con hydropriming) es similar al de la muestra control 0 mM (en torno a las 15 h; Fig. 8B). En presencia de Pb, las muestras con priming AsA tienen un TGM significativamente menor (10 h aproximadamente) que el de la muestra con Pb sin priming previo (0mMPb, 20 h aproximadamente). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos a diferentes concentraciones de AsA, ni de estos respecto al hydropriming (Fig. 8B).

Por otro lado, en ausencia de Pb, se observa un aumento significativo de la velocidad media de germinación (VGM) en las muestras tratadas con priming AsA y con hydropriming (0.1 semillas/ 2h.), en comparación con la muestra sin priming (0 mM; 0.07 semillas/2h aprox.) (Fig. 8C). No se observan diferencias significativas entre las muestras priming AsA e hydropriming.

En presencia de Pb, los tratamientos con priming AsA e hydropriming inducen un aumento de la VGM en comparación con las muestras sin priming y con Pb (0 mM Pb). La diferencia significativa se marca entre 0mM/Pb (VGM de 0.04/2h) y el tratamiento AsA 50mM/Pb (VGM de 0.06/2h) (Fig. 8C), por lo que el tratamiento de AsA 50mM podría poseer un efecto específico positivo sobre la velocidad de germinación de *C. quinoa* bajo estrés por Pb, en comparación con el hydropriming.

Finalmente, se realizó un estudio de germinación con tratamiento priming AsA (5, 25, 50 y 75 mM) e hydropriming durante 12 h, y se evaluó el PG. En ausencia de Pb, se observó que todos los tratamientos con priming daban lugar a un PG similar al observado en ausencia de priming (90-100% aprox.) (Fig. 8D).

En presencia de Pb, se observó que todos los tratamientos con priming dieron lugar a un aumento significativo del PG (80% aprox.) en comparación con la muestra sin priming (0 mM/Pb; PG 30% aprox.) (Fig. 8D). No se observan diferencias significativas entre las muestras con priming a diferentes concentraciones de AsA, ni tampoco en comparación con la de hydropriming.

A diferencia de los resultados a las 6 h de priming, en las muestras sometidas a 12 h de priming, los valores del PG de las muestras con priming en ausencia de Pb (90-100% aprox.) son significativamente mayores que los de las muestras con priming en presencia de Pb (80% aprox.).

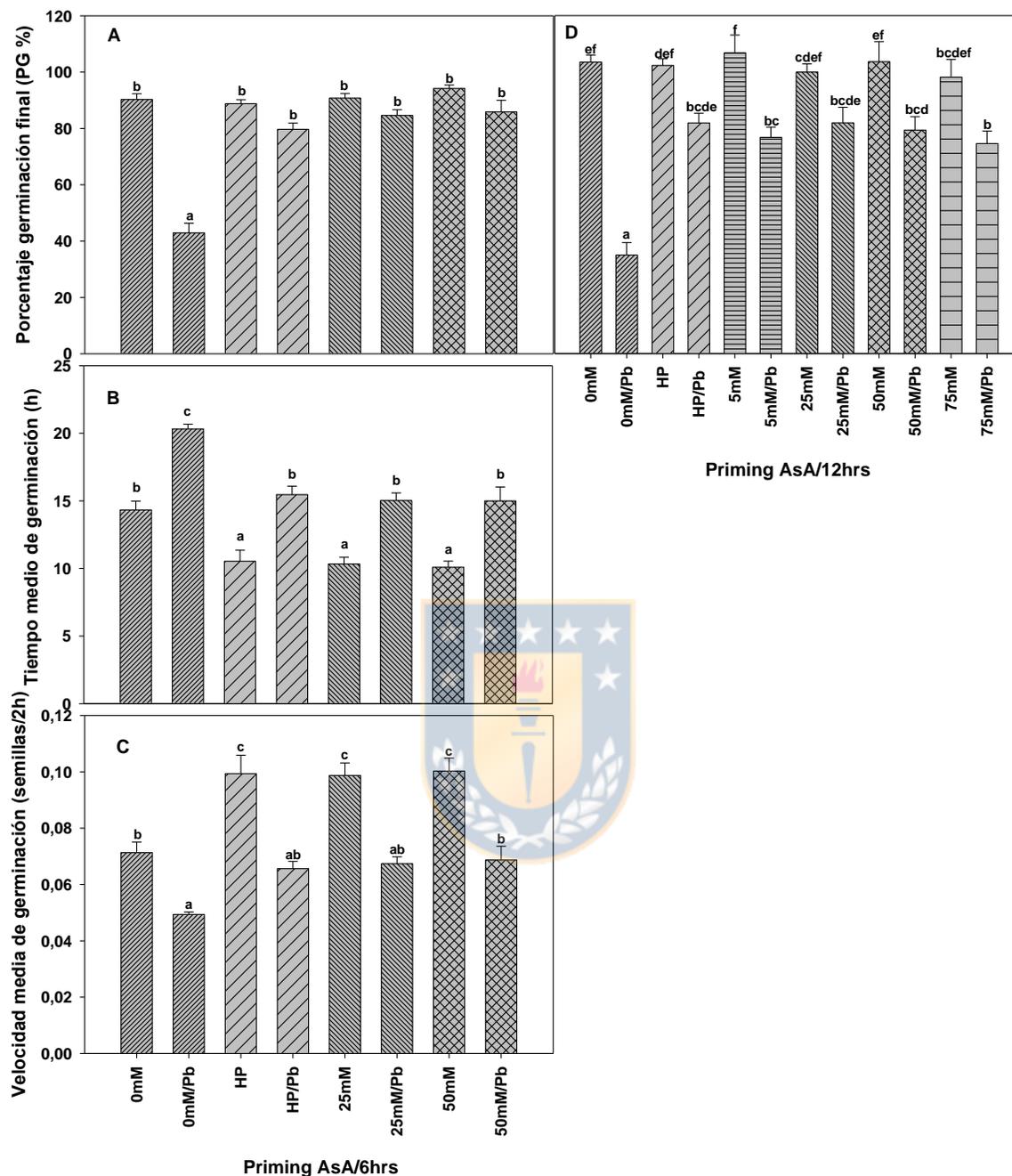


Figura 8. Efecto del hydropriming y del priming con ácido ascórbico en la germinación de *C. quinoa* en ausencia y presencia de Pb. (A) Porcentaje de germinación después de un priming de 6 h; (B) Tiempo medio de germinación después de un priming de 6 h; (C) Velocidad media de germinación después de un priming de 6 h. (D) Porcentaje de germinación después de un priming de 12 h. Las semillas se depositaron en placas Petri con 5 ml de agua o de 125 mM Pb(NO₃)₂ y

se contabilizaron las semillas germinadas hasta las 24 h. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tuckey ($p < 0,005$). Los tratamientos son los siguientes: 0 mM: muestra control sin priming y germinada en ausencia de Pb; 0 mM/Pb: muestra sin priming y germinada en presencia de Pb; HP: muestra sometida a hydropriming y germinada en ausencia de Pb; HP/Pb: muestra sometida a hydropriming y germinada en presencia de Pb; 5 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM: muestras con priming con estas respectivas concentraciones de AsA y germinadas en ausencia de Pb; 5 mM/Pb, 25 mM/Pb; 50 mM/Pb, 75 mM/Pb: muestras con priming con estas respectivas concentraciones de AsA y germinadas en presencia de Pb.

7.8. Efecto del priming con peróxido de hidrógeno en la germinación

En estos estudios se determinaron los porcentajes de germinación final (PG) después de tratamientos de priming durante 6 h y 12 h con H_2O_2 (a las concentraciones 0, 0.25, 05. 075 y 1 mM). También se aplicó hydropriming como control del priming con H_2O_2 . A las 6 h de priming, sólo se observaron las muestras con priming en presencia de Pb 125 mM (Fig. 9A). A las 12 h de priming, se observaron las muestras tanto con ausencia como con presencia de Pb 125 mM (Fig. 9B).

Como se ha comentado, los tratamientos de priming en ausencia de Pb se han estudiado solo en el experimento con 12 h de priming. Se observó que, en ausencia de Pb, los priming a las diferentes concentraciones de H_2O_2 inducen un PG similar al del control sin priming, y al observado con hydropriming (80-90% aprox.; Fig. 9B). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de priming a las diferentes concentraciones de H_2O_2 (Fig. 9B).

En presencia de Pb, tanto con 6 h como con 12 h de priming, se observó que el PG aumenta significativamente en muestras sometidas a priming con H_2O_2 (70-80%), en comparación con las muestras sin priming (30% aprox.). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con distintas concentraciones de H_2O_2 . Además, las muestras sometidas a hydropriming inducen un aumento de PG

similar al observado en las muestras con priming H_2O_2 (Figs. 9A y 9B), lo que sugiere que el aumento de PG observado en presencia de Pb es debido a la imbibición e hydropriming, y que no hay un efecto específico del H_2O_2 .

En las muestras sometidas a priming, no se observan diferencias significativas entre tratamientos en ausencia de Pb y en presencia de Pb (Fig. 9B).

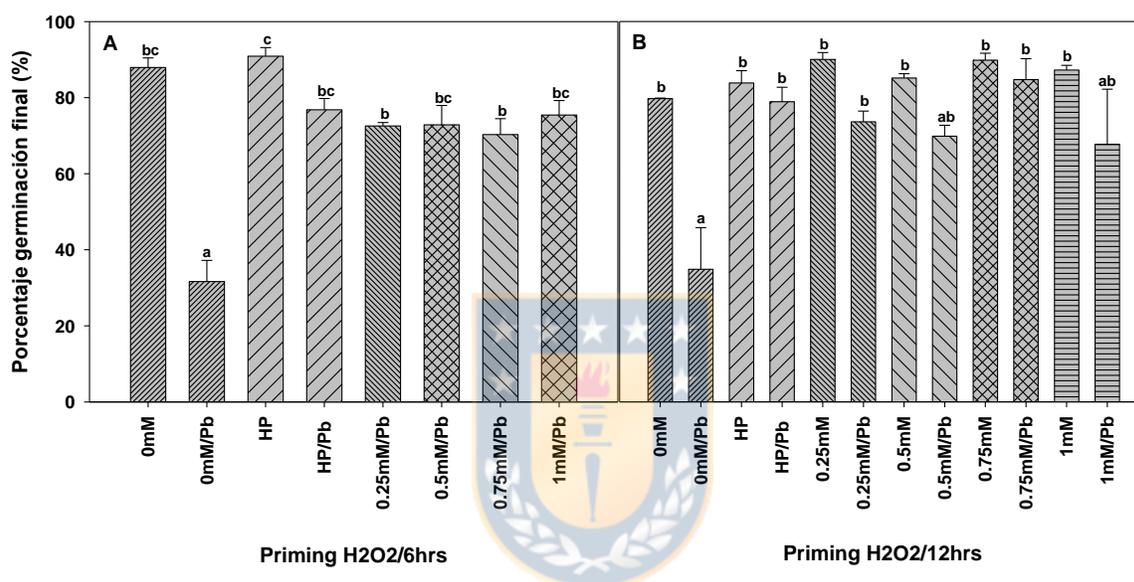


Figura 9. Porcentaje de germinación en experimentos de priming con H_2O_2 . (A) Porcentaje de germinación final en 24 h de semillas sometidas a tratamiento priming con soluciones de peróxido de hidrógeno (6h) y germinadas en placas con 5mL de Nitrato de Plomo ($Pb(NO_3)_2$) 125 mM. (B) Porcentaje de germinación final en 24h de semillas sometidas a tratamiento priming con soluciones de Peróxido de hidrógeno (12h) y germinadas en placas con 5mL de Nitrato de Plomo ($Pb(NO_3)_2$) 125 mM. Las muestras son las siguientes: 0mM: muestra control sin priming y germinada en ausencia de Pb; 0mM/Pb: muestra sin priming y germinada en presencia de Pb; HP: muestra sometida a hydropriming y germinada en ausencia de Pb; HP/Pb: muestra sometida a hydropriming y germinada en presencia de Pb; 0.25 mM, 0.5 mM, 0.75 mM, 1 mM: muestras con priming con estas respectivas concentraciones de H_2O_2 y y germinadas en ausencia de Pb; 0.25 mM/Pb, 0.5 mM/Pb; 0.75 mM/Pb, 1 mM/Pb: muestras con priming con estas respectivas

concentraciones de H₂O₂ y germinadas en presencia de Pb. Las letras indican diferencia significativa entre tratamientos según la prueba de Tuckey ($p < 0,005$).

7.9. Efecto del priming con melatonina en la germinación

Se realizaron experimentos de germinación con pretratamientos de priming con varias concentraciones de melatonina (0.1, 0.4, 0.7 y 1 mM) durante 6 h y 12 h. También se aplicó hydropriming como muestra para comparar con los priming con melatonina. A las 6 h sólo se observaron las muestras con priming en presencia de Pb (Fig. 10A). A las 12 h de priming, se observaron todas las muestras, tanto en ausencia como en presencia de Pb (Fig. 10B). Se evaluó el PG de todas las muestras a las 24 h.

Como se ha comentado, los tratamientos de priming en ausencia de Pb se han estudiado solo en el experimento con 12 h de priming. Se observó que, en ausencia de Pb, los tratamientos con priming con las diferentes concentraciones de melatonina inducen un PG similar al del control sin priming, y al observado con hydropriming (70-80% aprox.; Fig. 10B).

En presencia de Pb, el PG de las semillas en ausencia de priming era de 20% aprox. en el experimento de 6 h, y de 40% aprox. en el experimento de 12 h (Figs. 10A y 10B). Tanto con 6 h como con 12 h de priming, se observó que el PG aumenta significativamente en muestras sometidas a priming con melatonina (60% aprox. en el priming de 6 h; 70-80% aprox. en el priming de 12 h), en comparación con las muestras sin priming. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con distintas concentraciones de melatonina. Además, las muestras sometidas a hydropriming inducen un PG similar al observado en las muestras con priming con melatonina (Figs. 4A y 4B), excepto en el caso del priming de 6 h con 0.25 mM y 0.75 mM melatonina, con PGs significativamente menores que el del hydropriming (Figs. 10A). En general, estos resultados sugieren que el aumento de PG observado en muestras de priming con melatonina y con presencia de Pb, es debido a la imbibición e hydropriming, y que no hay un efecto específico de la melatonina.

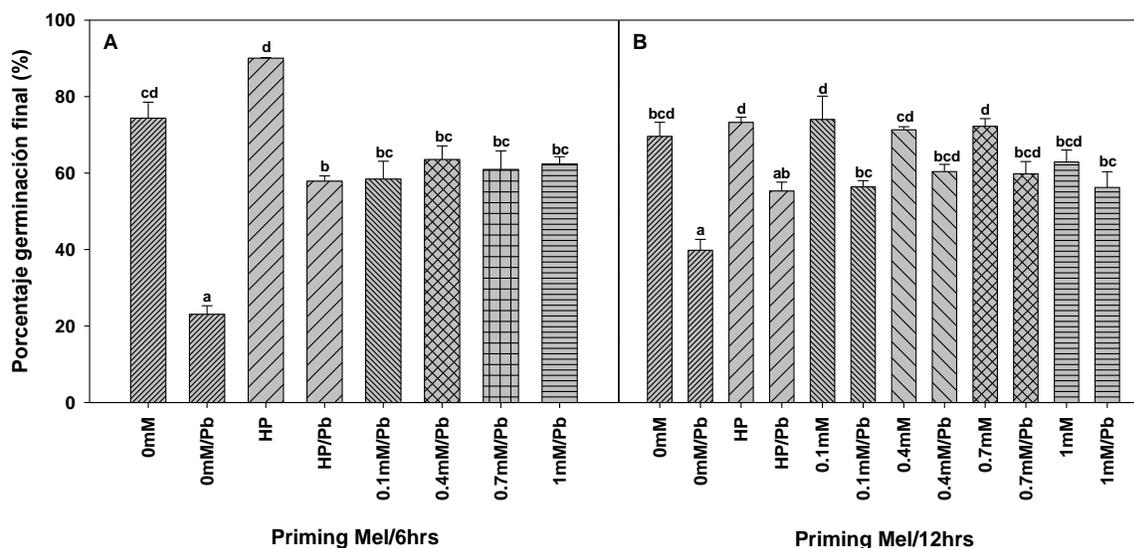


Figura 10. Porcentaje de germinación en experimentos de priming con melatonina. (A) Porcentaje de germinación final (a las 24 h) de semillas sometidas a tratamiento priming durante 6 h con soluciones de melatonina y germinadas en placas con 5 ml de Nitrato de Plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) 125 mM. (B) Porcentaje de germinación final de semillas sometidas a tratamiento priming durante 12 h con soluciones de melatonina, y germinadas en placas con 5 ml de Nitrato de Plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) 125 mM. Las muestras son las siguientes: 0mM: muestra control sin priming y germinada en ausencia de Pb; 0mM/Pb: muestra sin priming y germinada en presencia de Pb; HP: muestra sometida a hidropriming y germinada en ausencia de Pb; HP/Pb: muestra sometida a hidropriming y germinada en presencia de Pb; 0.1 mM, 0.4 mM, 0.7 mM, 1 mM: muestras con priming con estas respectivas concentraciones de melatonina y germinadas en ausencia de Pb; 0.1 mM/Pb, 0.4 mM/Pb; 0.7 mM/Pb, 1 mM/Pb: muestras con priming con estas respectivas concentraciones de melatonina y germinadas en presencia de Pb. Las letras indican diferencia significativa entre tratamientos según la prueba de Tuckey ($p < 0,005$).

8. DISCUSIÓN

8.1 Identificación de homólogos de genes de tolerancia a Pb en quínoa

En la literatura revisada no se encontraron muchos estudios acerca de la resistencia de *C. quinoa* a estrés por plomo, pero se encontraron estudios que poseen genes que al activarse confieren resistencia a las plantas.

Los dominios presentes en las secuencias utilizadas y en secuencias homólogas de *C. quinoa*, de hecho, presentan bastante similitud, demostrando que las proteínas codificadas en ellas tendrían la misma función y localización en ambas.

Fan et al. 2016 observó que la proteína codificada por el gen *PSE1* en *A. thaliana* se encuentra en el citoplasma, en cambio, el homólogo hallado en *C. quinoa* posee péptido señales de transmembrana, y en programas que aproximan la posible función y localización de genes, aparece que la posible localización del homólogo de *C. quinoa* es en la membrana plasmática.

Para *PDR12*, Lee et al. 2005 demostró que la proteína codificada se localiza en la membrana plasmática, al igual, el homólogo hallado en *C. quinoa* posee como posible localización la membrana plasmática, así demostrando que actuaría como una bomba que excluye plomo.

En cuando a *ATM3*, los resultados de esta investigación muestran que el homólogo hallado en *C. quinoa* posee una localización transmembrana y mitocondrial, coincidiendo, así, con el estudio realizado por Kim et al. 2006.

Aún con los análisis realizados en el presente trabajo, sigue faltando más estudio al respecto, como podría ser marcando las proteínas de genes homólogos de *C. quinoa* con proteína verde fluorescente, y así poder corroborar la información obtenida por los programas utilizados. O también realizar un Estudio de Asociación del genoma completo (GWAS, siglas en inglés), para poder detectar genes que se expresan más que otros bajo una situación de estrés por Pb, comparando así los genes expresados en plantas de *C. quinoa* control y otras de *C. quinoa* con Pb, como en el estudio realizado en *Brassica napus*, para poder revelar loci genéticos relacionados con resistencia a Pb durante el establecimiento de la plántula (Zhang

et al. 2020).

En cuanto a los árboles filogenéticos, nos presentan una buena visualización de la relación entre los genes homólogos que se encuentran en *C. quinoa* respecto a las plantas que poseen los genes estudiados en la resistencia a Pb.

Un problema que estuvo presente en esta investigación es que los genes homólogos presenten en *C. quinoa* son demasiado parecidos, dando problemas a la hora de encontrar primers que sean exclusivos para qPCR. Algunos de los mejores candidatos se mencionan en este estudio, pero hay que seguir buscando mejores.

8.2 Efecto del Pb en la germinación de semillas de *C. quinoa*

Numerosos estudios han demostrado la inhibición de germinación por Pb, como en el caso del arroz (*Oryza sativa* L.) (Tomulescu et al., 2004), maíz (*Zea mays* L.) (Zhang et al., 2018), lentejas (*Lens culinaris* Medikus) (Sedzik et al., 2015), y alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Sedzik et al., 2015), entre otros. Este efecto inhibitorio se puede explicar con el hecho de que el Pb retrasa la emergencia de la radícula como respuesta a una disminución en el contenido de carbohidratos y proteínas (Sethy et al., 2013) al afectar la actividad de polifenol oxidasas y peroxidasa (Singh et al., 2011). También disminuye la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos como α -amilasa, β -amilasa, fosfatasas ácidas e invertasas ácidas (Mohamed, 2011). Tiene un impacto negativo en la radícula tanto como en el crecimiento del hipocótilo (Islam et al., 2007), afectando así, la obtención de energía para poder llevar a cabo los procesos metabólicos.

En nuestros experimentos de germinación hemos observado un efecto inhibitor del Pb (Fig. 7); se observa un descenso progresivo del PG en presencia de concentraciones crecientes de Pb. También se observa un aumento progresivo de TGM, lo que se traduce en que tardan más en germinar, y también una disminución de la VGM, lo que se traduce como menos semillas germinadas cada 2h.

Chenopodium quinoa demuestra ser una planta que presenta tolerancia al Pb, logrando germinar incluso a concentraciones tan altas como 50 mM (PG = 79.4%).

Estudios previos en *Festuca arundinacea* demuestran que su germinación relativa disminuye a un 25% bajo condiciones de Pb 3mM (Lou et al., 2017). Wang et al. (2010) observaron un porcentaje de germinación de 46% en *Triticum aestivum* L. en presencia de Pb 50mM. Un trabajo realizado por Siddiqui et al., 2014, demuestra que el porcentaje de germinación de semillas de *Brassica napa* var. turnip, alcanza un 73% en presencia de Pb 13 mM. También, se ha dado el caso de plantas catalogadas como hiperacumuladoras, como *Brassica pekinensis* Rupr., donde la presencia de Pb 3mM reduce su porcentaje de germinación a un 43% (Xiong., 1998). Nuestros datos muestran que las semillas de quinoa tienen un PG mayor incluso que las de trigo a concentraciones tan altas como 50 Mm de Pb. Las semillas de quinoa son más tolerantes en la germinación en presencia de Pb que la mayoría de otras plantas reportadas.

8.3 Efecto del pre-acondicionamiento (priming) en la germinación de semillas de *C. quinoa* en ausencia y presencia de Pb

Los mayores niveles de germinación en *C. quinoa*, se observaron en hydropriming (HP) tanto para semillas en ausencia como en presencia de Pb. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento HP no aumenta significativamente el PG en ausencia de Pb, pero sí se puede observar un aumento significativo de VGM y disminución de TGM respecto del tratamiento control 0mM Pb. El tratamiento HP/Pb demostró mejorar de manera significativa los tres aspectos evaluados en la germinación (PG, TGM, VGM), en comparación con el tratamiento Pb, donde se puede observar un efecto negativo en la germinación. Resultados similares en cuanto a PG fueron obtenidos en un estudio realizado en trigo, donde semillas de trigo tratadas con hydropriming demostraron tener una germinación de 98-100% bajo condiciones de estrés por mercurio (HgCl_2) 1mM. También observaron actividad de α -amilasa del endosperma de trigo era inhibida bajo la presencia de HgCl_2 en comparación con las semillas no estresadas, sin embargo, las semillas tratadas con hydropriming demostraron poseer una actividad de α -amilasa significativamente mayor tanto en ausencia como presencia de HgCl_2 1mM (Kumar

et al., 2016). La rehidratación de la semilla ha demostrado inducir procesos metabólicos en las semillas, como la síntesis nueva de proteínas y ácidos nucleicos, la activación de antioxidantes, la producción de adenosin trifostato (ATP), la acumulación de fosfolípidos y esteroides, y también la activación del mecanismo de reparación de ADN, el cual ocurre al principio de la imbibición (Paparella et al., 2015). Estudios realizados en *Medicago truncatula* han demostrado que la aplicación de hydropriming aumenta de manera significativa el PG en semillas sembradas en dos tipos de suelos contaminados del norte de la India (Karsara, Varanasi) respecto de las semillas germinadas sin tratamiento de hydropriming; por otro lado, se pudo observar que el hydropriming promueve un aumento significativo en la expresión de genes relacionados con enzimas antioxidantes (APX, SOD), en comparación con semillas sin tratamiento hydropriming (Forti et al., 2020). En estudios realizados en trigo, se ha observado que el hydropriming promueve una emergencia temprana de la radícula, un mayor porcentaje de germinación total y un mayor peso de la semilla (Ali et al., 2013). En este trabajo se observó que el tratamiento con hydropriming presentó una disminución en el valor del TGM, como ocurre en especies como el maíz, donde se ha observado que el hydropriming promueve una mejor emergencia, aumentando los porcentajes de germinación a un 85% y 90%, y mejores valores de TGM (Ahmmad et al., 2014).

Otro punto a tomar en cuenta es que la alta actividad de enzimas como proteasas, α y β -amilasa e isocitrato-liasa, que están relacionadas a la movilización de las reservas almacenadas de carbohidratos, ya que cumplen el papel de degradar las macromoléculas necesarias para el crecimiento del embrión, se han observado en semillas sometidas a priming, lo que promueve un mejor y rápido crecimiento de las plántulas (Sisodia et al., 2018). Tomando en cuenta que el hydropriming permite la imbibición de la semilla, activando todos los procesos metabólicos pre-germinativos, también relacionados con la respuesta antioxidante y con la reparación de ADN (Ventura et al 2012). Sin embargo, existe poca información en cuanto a priming en semillas de *C. quinoa* sometidas a estrés por MPs. Cabe destacar que existe un amplio rango de estudios que quedan por realizar para poder dilucidar qué mecanismos están involucrados en estos procesos. Si bien en este estudio no se

podieron realizar análisis de enzimas presentes en plántulas de *C. quinoa*, sería interesante poder observar la actividad metabólica de plántulas en presencia de Pb en un futuro.

En cuanto a los tratamientos de priming con químicos incluidos AsA (Fig. 8A), H₂O₂ (Fig. 9A) y Mel (Fig. 10A), no se observaron diferencias significativas respecto al hydropriming. Es por ello que el efecto de estos priming químicos parece deberse a la imbibición y a una acción de hydropriming, pero no se detecta un efecto específico de los químicos empleados.

Respecto al ácido ascórbico, debemos señalar que las plantas tienen un complejo sistema de defensa enzimático para combatir el daño oxidativo y la producción excesiva de ROS (Ahammed et al. 2020; Souza et al. 2014). Por ejemplo, SOD, POD y APX son sistemas de defensa antioxidantes que protegen las membranas plasmáticas de la peroxidación provocada por un exceso de radicales libres de oxígeno (Xiao et al. 2019). En general se ha observado que enzimas como CAT, SOD y metabolitos no enzimáticos como el ascorbato, tienen una acción antioxidante y reducen los niveles de producción de H₂O₂ (Sharma et al. 2012). Teniendo en cuenta esto, esperábamos que el ácido ascórbico aumentara el porcentaje de germinación de *C. quinoa*, al reducir el estrés inducido por Pb. Una explicación para esta respuesta es que el ácido ascórbico no fue capaz de ingresar a la semilla y alterar la actividad metabólica. Sin embargo, una explicación alternativa es que el sistema antioxidante de *C. quinoa* es suficiente para tratar con el estrés por Pb, y tal vez veríamos un cambio relacionado con la actividad de APX. Amjad et al. (2021) observaron que la actividad de APX en hojas de *C. quinoa* aumentó significativamente en presencia de Pb 0.53 mM. Los resultados que arroja este estudio (Fig. 8A) muestran una leve tendencia al aumento en PG en tratamientos con AsA y ausencia de Pb, aunque no es estadísticamente significativo. Estudios anteriores muestran resultados positivos en el caso de semillas de arroz integral sometidas a priming con AsA, donde la actividad de alfa amilasa, azúcares solubles, y concentración de nutrientes relacionados con la

homeostasis de la semilla (K^+ y Ca^{2+}) se ven significativamente mejorados en comparación a las semillas control sin priming (Farooq et al., 2006a). Se sabe que el ácido ascórbico es un metabolito importante involucrado en la división celular, el ajuste osmótico (De-Gara et al., 2003), tiene un rol vital durante los inicios de la germinación (Arrigoni et al., 1997) y también posee un fuerte potencial antioxidante (Müller-Moulé et al., 2003), pero, aún se desconoce su rol en el metabolismo de semillas tratadas con estrés por MPs, ya que generalmente los estudios relacionados con priming AsA tienen la tendencia a tratar temas de estrés salino y sequía, y sobre priming AsA en *C. quinoa* poco se ha estudiado, hasta ahora, se ha hecho un estudio acerca de los metabolitos primarios y secundarios presentes en plantas de *C. quinoa* de un mes post germinación, sometidas a estrés hídrico, y con un tratamiento posterior de AsA (un mes después del tratamiento de estrés hídrico) (Aziz et al. 2018)

En cuanto al priming con H_2O_2 , si bien, no se observó un cambio significativo en el PG de semillas de *C. quinoa* tratadas con H_2O_2 , no se descarta la opción de que se puedan ver cambios reflejados en el estado de plántula, donde se ha demostrado que produce una disminución en la producción de ROS y daño oxidativo (Iqbal et al. 2018). Evidencia corrobora el efecto del H_2O_2 sobre el sistema antioxidante, al promover la activación de enzimas antioxidantes (Xu et al. 2010; Asgher et al. 2021), incrementa el contenido de glutatión (Bai et al. 2011; Yildiz et al. 2013), y regula el transporte de metales en la actividad de proteínas de transmembrana vacuolar, como las ATPasas (Kabala et al. 2019). Estudios realizados en *C. quinoa* donde las semillas fueron sometidas a priming de H_2O_2 (80 mM) y spray foliar 15 mM, bajo condiciones de déficit de agua, demostraron aumentar significativamente los niveles de actividad enzimática antioxidante (POD, CAT, APX) en comparación con plantas control; también se vio reflejado un aumento significativo en los contenidos de azúcares solubles totales y prolina; también los resultados muestran una reducción significativa de la peroxidación lipídica (Iqbal et al. 2018). En estudios de priming con H_2O_2 en arroz bajo estrés por frío, se ha observado un efecto positivo sobre la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas, aumentando de manera

significativa el PG, MGT y otros aspectos relacionados con la germinación, todo esto gracias a un priming de H_2O_2 10 mM por 24 h, en comparación con las semillas sometidas a estrés y sin priming, se vio un aumento en la capacidad antioxidante de las enzimas CAT y APX de hasta un 175.38% y 156.52%, respectivamente, en comparación con la actividad observada en plántulas sometidas a estrés y sin priming (Afrin et al. 2019). En esta Tesis se realizaron algunas pruebas de germinación (resultados preliminares, no mostrados) con H_2O_2 25 y 50 mM, donde se observó un efecto negativo sobre la germinación de *C. quinoa*, disminuyendo el PG, TGM y VGM de manera significativa en comparación con el tratamiento control sin priming en ausencia de Pb. Estos resultados, en contraste con estudios anteriores, pueden haber ocurrido debido al tiempo utilizado para el tratamiento de priming, ya que en este estudio se realizó un priming con un tiempo mucho más prolongado al reportado en el paper de Iqbal et al 2018.

Si bien el incremento de la oxidación en el momento de la germinación es una respuesta importante para el éxito del proceso, altas concentraciones de H_2O_2 pueden ser tóxicas para las células. Todo depende de los tiempos utilizados para el priming, junto con la concentración de H_2O_2 utilizada, temperatura y oxigenación del medio donde se lleva a cabo el priming.

Aquí la concentración de H_2O_2 usada en el priming, estuvo dentro del rango de concentraciones que se ha usado en otros estudios, que por lo general va desde 100 a 600 μ M (Xu et al.2010; Bai et al. 2011; Wen et al. 2013), aunque, existen casos en los que las concentraciones de H_2O_2 pueden ser de hasta 80 mM, como en el caso del estudio realizado por Iqbal et al. (2018). Si bien, no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos H_2O_2 y H_2O_2 /Pb en comparación con los tratamientos HP y HP/Pb (Fig. 9A y 9B), sí se puede ver como en el tratamiento H_2O_2 0.75mM hay una tendencia a un valor sobre el de HP/Pb, pero no es significativo (Fig. 9B).

En cuanto a la melatonina, se han realizado estudios con plántulas jóvenes de *C. quinoa* sin un factor de estrés, solo con priming de melatonina, y se observó que

incrementa valores de peso fresco (FW), Chl a, Chl b, betacarotenos, proteínas, saponinas, azúcares totales (glucosa, fructosa, galactosa, maltosa), ácidos orgánicos, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y metabolitos antioxidantes (Zrig et al 2022). Sin embargo, en el presente estudio solo estudiamos germinación, por lo que no se encontraron efectos específicos significativos del priming con melatonina. No se descarta que a nivel de plántula la melatonina tenga un efecto de incremento de tolerancia. Un ejemplo de ello es el caso de un estudio realizado en grama (césped común) bajo estrés por Pb, donde plántulas de 19 días post germinación fueron regadas con soluciones de melatonina por 6 días, día por medio, y después sometidas a tratamiento por Pb. Como resultados, se pudieron observar aumentos en el contenido de clorofila, contenido relativo del agua, una reducción en las concentraciones de prolina, reducción en la concentración de H₂O₂, un aumento en la actividad de SOD, POD, CAT, APX, GR, y un aumento en antioxidantes no enzimáticos como GSH y AsA (Xie et al. 2018). Por otro lado, en estudios de priming de melatonina en plántulas de sandía en presencia de vanadio, donde plántulas de 5 días fueron sometidas a un tratamiento de priming en solución Hoagland, y trasplantadas a un medio con vanadio por tres días, se observó que las plántulas tratadas con melatonina aumentaron su peso seco en comparación con plántulas no tratadas. Adicionalmente, se observó un aumento significativo en la actividad de SOD y CAT, como también niveles reducidos de H₂O₂, y un aumento en la transcripción de genes que codifican para enzimas antioxidantes como SOD (Nawaz et al. 2018). También se han visto resultados similares en investigaciones de trigo en presencia de cadmio (Ni et al. 2018), y malva bajo estrés por cadmio (Tousi et al. 2020).

9. CONCLUSIÓN

El mundo se enfrenta a una crisis ambiental, y los metales pesados forman parte de ella. El Plomo es parte importante de esta amenaza ambiental, ya que, está presente en todo tipo de materiales utilizados en la industria, ya que es un metal maleable y fácil de manejar. Este metal contamina los suelos y a los seres vivos que

se alimentan de los productos naturales que emergen de éstos. Una solución viable e interesante es la fitorremediación, y para poder lograr obtener plantas que puedan hacer frente a estos desafíos, se necesita tener conocimiento acerca de la fisiología de la planta, de los mecanismos moleculares y genéticos que puedan potenciar el uso de éstas poder descontaminar los suelos.

Para lograrlo, se necesita hacer estudios como los que se han realizado en este trabajo, estudios que nos permitan identificar secuencias génicas que puedan ser clave en la resistencia y posterior descontaminación de metales pesados, así como evaluar experimentalmente la tolerancia de quinoa a Pb.

En el presente estudio se identificaron genes en *C. quinoa* que poseen homología con genes que confieren tolerancia a Pb en otras plantas, así, dando paso a nuevas posibilidades para poder generar plantas con la capacidad de remediar los suelos y el medio ambiente.

Los resultados informados en esta Tesis también confirman la gran capacidad de germinación de *C. quinoa* bajo altas concentraciones de Pb (siendo capaz de germinar a concentraciones de 50 mM de Pb o incluso a mayores concentraciones), indicándola como una potencial especie tolerante a Pb, y que podría tener aplicaciones en fitorremediación, sobre todo si se comprueba si puede acumular altas concentraciones de Pb en sus tejidos.

El tratamiento de hydropriming demostró ser el que mejores resultados obtuvo, tomando en cuenta que, además, es la opción más económica y al alcance. Logró promover una mejor germinación en presencia de altas concentraciones de Pb. Por otro lado, respecto a los tratamientos de priming, no se observó que algún químico utilizado haya tenido un efecto positivo por sobre el hydropriming.

Concluyendo, podemos decir que el hydropriming, una técnica sencilla y de bajo coste, mejora la germinación de *C. quinoa* bajo concentración inhibitorias de Pb. Por

lo tanto, se ha verificado uno de los aspectos de la hipótesis del presente estudio, esto es, que el hydropriming induce un aumento de tolerancia de las semillas de quinoa al estrés inducido por Pb.

Estos resultados resultan prometedores a la hora de plantear soluciones para tratar suelos de zonas contaminadas. Si bien, los resultados de este trabajo suenan interesantes, hacen falta estudios que logren dilucidar la acción tanto del hydropriming como del priming químico, a nivel metabólico en la semilla de *C. quinoa* y sus demás estados fenológicos.

10. BIBLIOGRAFÍA

ACQUAAH, G. 2007. Principles of Plant Genetics and Breeding. Oxford, UK: Blackwell.

Adolf, V. I, S. E. Jacobsen, & S. Shabala. 2013. Salt Tolerance Mechanisms in Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.). *Environmental and Experimental Botany* 92: 43–54.

AHAMMAD, K., RAHMAN, M., ALI, M. 2014. Effect of hydropriming method on maize (*Zea mays*) seedling emergence. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 39 (1), Pp. 143–150.

AHMAD, M. S. A., & M. ASHRAF. 2011. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Essential Roles and Hazardous Effects of Nickel in Plants.

ALI, H., IQBAL, N., SHAHZAD, A.N., SARWAR, N., AHMAD, S., MEHMOOD, A. 2013. Seed priming improves irrigation water use efficiency, yield, and yield components of late-sown wheat under limited water conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37 (5), Pp. 534–544.

ALVAREZ-JUBETE, L., E. K. A., & GALLAGHER. E. 2010. Nutritive Value of Pseudocereals and Their Increasing Use as Functional Gluten-Free Ingredients. *Trends in Food Science and Technology* 21(2):106-113

ANOSHEH, H. P., SADEGHI, H. & EMAM. Y. 2011. Chemical Priming with Urea and KNO₃ Enhances Maize Hybrids (*Zea Mays* L.) Seed Viability under Abiotic Stress. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 14(4): 289–95.

APEL, K., & HIRT, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55, 373-399

ARRIGONI, O., CALABRESE, G., DE-GARA, L., BITONTI, M. B. & LISO, R. 1997. Correlation between changes in cell ascorbate and growth of *Lupinus albus* seedlings. *J. Plant Physiol.* 150, 302–308.

ASGHER, M., AHMED, S., SEHAR, Z., GAUTAM, H., GANDHI, S.G., KHAN, N.A. 2021 Hydrogen peroxide modulates activity and expression of antioxidant enzymes and protects photosynthetic activity from arsenic damage in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Hazard. Mater.* 401, 123365.

ASHRAF, M., & FOOLAD, M. R. 2005. Pre-Sowing Seed Treatment-A Shotgun Approach to Improve Germination, Plant Growth, and Crop Yield Under Saline and Non-Saline Conditions. *Advances in Agronomy* 88(05): 223–71.

ATHAR, H. UR R., KHAN, A. & ASHRAF, M. 2008. Exogenously Applied Ascorbic Acid Alleviates Salt-Induced Oxidative Stress in Wheat. *Environmental and Experimental Botany.* 63(1–3): 224–31.

AZEVEDO-NETO, A.D., PRISCO, J.T., ENEAS-FILHO, J., MEDEIROS, J.V.R., & GOMES-FILHO, E. 2005. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt stress

acclimation in maize plants. *J. Plant Physiol.* 162, 1114-1122.

AZIZ, A., AKRAM, N.A., ASHRAF, M. 2018. Influence of natural and synthetic vitamin C (ascorbic acid) on primary and secondary metabolites and associated metabolism in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) plants under water deficit regimes. *Plant Physiol Biochem.* 123:192-203

BAI, X.-J., LIU, L.-J., ZHANG, C.-H., GE, Y., CHENG, W.-D. 2011. Effect of H₂O₂ Pretreatment on Cd tolerance of different rice cultivars. *Rice Sci.* 18, 29–35.

BAKHT, J., SHAFI, M., JAMAL, Y. & SHER, H. 2011. “Response of Maize (*Zea Mays* L.) to Seed Priming with NaCl and Salinity Stress. *Spanish Journal of Agricultural Research* 9(1): 252.

BASRA, S.M.A., FAROOQ, M., TABASSUM, R., AHMED, N., 2006. Evaluation of seed vigour enhancement techniques on physiological and biochemical basis in coarse rice (*Oryza sativa* L.). *Seed Science and Technology*, 34 (3), Pp. 719–728.

BAZILE, P. C., VERNIAU, A., AL-Nusairi, M. S., D. Ba., Breidy, J., Hassan, L., Mohammed, M. I., Mambetov, O., Otambekova, M., Sepahvand, N. A., Shams, A., Souici, D., Miri, K., & Padulosi, S. 2016. “Worldwide Evaluations of Quinoa: Preliminary Results from Post International Year of Quinoa FAO Projects in Nine Countries. *Frontiers in Plant Science* 7.

BIENERT, G.P., SCHJOERRING, J. K., AND JAHN, TP. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758, 994-1003

BOLWELL, G. P., BINDSCHEDLER, L. V., BLEE, K.A., BUTT, V. S., DAVIES, D. R., GARDNER, S. L., GERRISH, C., & MINIBAYEVA, F. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a tree component system. *J. Exp. Bot.* 53, 1367-1376.

BRUCE, T. J. A., MATTHES, M. C., NAPIER, J. A., & PICKETT, J. A. 2007. Stressful 'Memories' of Plants: Evidence and Possible Mechanisms. *Plant Science* 173(6): 603–8.

CAO, S., CHEN, Z., LIU, G., JIANG, L., YUAN, H., REN, G., BIAN, X., JIAN, H., MA, X. 2009. The Arabidopsis Ethylene-Insensitive 2 gene is required for lead resistance. *Plant Physiol Biochem.*, 47(4):308-12.

CHAO, Y. Y., HSU, Y. T., & KAO, C. H. 2009. Involvement of glutathione in heat shock-and hydrogen peroxide-induced cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Soil.* 318, 37-45.

CHONG-QING, W., TAO, W., PING, M., ZI-CHAO, L., & LING, Y. 2013. Quantitative trait loci for mercury tolerance in rice seedlings. *Rice Sci.* 20, 238–242.

CONG, Y. M., XU, L., ZHANG, Y., YUAN, C., WANG, J., ZHUANG, T., LIN, X., JIANG, L., WANG, N., MA, J., SANGUINET, K. A., LIU, B., RUSTGI, S., & OU, X. 2019. Transgenerational Memory of Gene Expression Changes Induced by Heavy Metal Stress in Rice (*Oryza Sativa* L.). *BMC Plant Biology* 19(1): 1–14.

DAMALAS, C. A., KOUTROUBAS, S. D., & FOTIADIS, S. 2019. Hydro-Priming Effects on Seed Germination and Field Performance of Faba Bean in Spring Sowing. *Agriculture (Switzerland)* 9(9): 1–12.

DE MATOS, A. T., FONTES, M. P.F., DA COSTA, L. M., & MARTINEZ, M. A. 2001. Mobility of Heavy Metals as Related to Soil Chemical and Mineralogical Characteristics of Brazilian Soils. *Environmental Pollution* 111(3): 429–35.

DE-GARA, L., DE-PINTO, M. C., MOLITERNI, V. M. C., & D-EGIDIO, M. G. 2003: Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of *Triticum durum*. *J. Exp. Bot.* 54, 249–258.

DEZFULI, P.M., SHARIF-ZADEH, F., & JANMOHAMMADI, M. 2008. Influence of Priming Techniques on Seed Germination Behavior of Maize Inbred Lines (*Zea Mays* L.). *Journal of Agricultural and Biological Science* 3(3): 22–25.

DUBBELS, R. J. R., KLENKE, E., GOEBEL, A., SCHNAKENBERG, E., EHLERS, C., SCHIWARA, H. W., & SCHLOOT, W. 1995. Melatonin in Edible Plants Identified by Radioimmunoassay and by High Performance Liquid Chromatography-mass Spectrometry. *Journal of Pineal Research* 18(1): 28–31.

EAPEN, S., & D'SOUZA, S. F. 2005. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metal. *Biotechnol. Adv.* 23, 97–114.

ELKOCA, E., HALILOGLU, K., ESITKEN, A., ERCISLI, S. 2007. Hydro- and osmopriming improve chickpea germination. *Acta Agric Scand Sect B Soil Plant Sci* 57:193–200

FAN, T., YANG, L., WU, X., NI, J., JIANG, H., ZHANG, Q. A., ... & CAO, S. 2016. The PSE1 gene modulates lead tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 67(15), 4685-4695.

FAROOQ, M., BASRA, S. M. A., AFZAL, I., KHALIQ, A. 2006a. Optimization of hydropriming techniques for rice seed invigoration. *Seed Sci Technol* 34(2):507–512

FAROOQ, M., BASRA, S. M. A., KHALID, M., TABASSUM, R., & MEHMOOD, T. 2006b. Nutrient homeostasis, metabolism of reserves and seedling vigor as affected by seed priming in coarse rice. *Can. J. Bot.* 84, 1196–1202

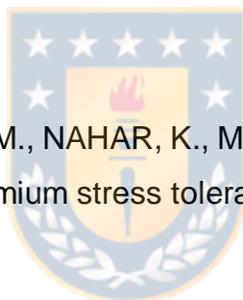
FAROOQ, M.H., JABRAN, K., HASSAN, W., RIZWAN, M. S., & YASIR, T. A. 2017. Osmopriming with CaCl₂ Improves Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Production under Water-Limited Environments. *Environmental Science and Pollution Research* 24(15): 13638–49.

FORTI, C., SHANKAR, A., SINGH, A., BALESTRAZZI, A., PRASAD, V., MACOVEI, A. 2020. Hydropriming and Biopriming Improve *Medicago truncatula* Seed Germination and Upregulate DNA Repair and Antioxidant Genes. *Genes (Basel)*.25;11(3):242.

FOTI, K. A., TIGERE, A., GOTOSA, J., & GERE J. 2008. The Efficacy of Different Seed Priming Osmotica on the Establishment of Maize (*Zea Mays L.*) Caryopses. *Journal of Arid Environments* 72(6): 1127–30.

GARZÓN, T., GUNSE, B., MORENO, A. R., TOMOS, A. D., BARCELÓ, J., & POSCHENRIEDER, C. 2011. Aluminium-induced alteration of ion homeostasis in root tip vacuoles of two maize varieties differing in Al tolerance. *Plant Sci.* 180, 709–715.

GILL, S. S., HASANUZZAMAN, M., NAHAR, K., MACOVEI, A., & TUTEJA, N. 2013. Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 63, 254–261.



GÓMEZ-CARAVACA, G. I., LAVINI, A., PULVENTO, C., CABONI, M. F., & MARCONI, E. 2012. “Phenolic Compounds and Saponins in Quinoa Samples (*Chenopodium Quinoa Willd.*) Grown under Different Saline and Nonsaline Irrigation Regimens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(18): 4620–27.

GONDIM, F.A., GOMES-FILHO, E., COSTA, J.H., ALENCAR, N.L.M., & PRISO, J.T. 2012. Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. *J. Plant Physiol. Biochem.* 56, 62-71.

GONDIM, F.A., MIRANDA, R.S., GOMES-FILHO, E., & PRISCO, J.T. 2013. Enhanced salt tolerance in maize plants induced by H₂O₂ leaf spraying is associated with improved gas exchange rather than with non-enzymatic antioxidant

system. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 25, 251

HARRIS, D., JOSHI, A., KHAN, P. A., GOTHKAR, P. ET AL. 1999 On-farm seed priming in semiarid agriculture: development and evaluation in maize, rice and chickpea in India using participatory methods. *Exp Agric* 35:15–29

HINOJOSA, J. A. G., F. H. BARRIOS-MASIAS, F. FUENTES, & K. M. MURPHY. 2018. “Quinoa Abiotic Stress Responses: A Review. *Plants* 7(4).

HOSSAIN, M.A., & FUJITA, M. 2013. Hydrogen peroxide priming stimulates drought tolerance in mustard (*Brassica juncea* L.). *Plant Gene Trait.* 4, 109-123.

IBRAHIM, A. EHAB. 2016. Seed Priming to Alleviate Salinity Stress in Germinating Seeds. *Journal of Plant Physiology* 192: 38–46.

IQBAL, H., YANING, C., WAQAS, M., REHMAN, H., SHAREEF, M., IQBAL, S. 2018. Hydrogen peroxide application improves quinoa performance by affecting physiological and biochemical mechanisms under water-deficit conditions. *J Agro Crop Sci.*00:1–13.

ISHIBASHI, Y., YAMAGUCHI, H., YUASA, T., INWAYA-INOUE, M., ARIMA, S., & ZHENG, S. 2011. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. *J. Plant Physiol.* 168, 1562-1567.

ISLAM, E., YANG, X., LI, T., LIU, D., JIN, X., MENG, F. 2007. Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *J. Hazard Mater.* 147, 806–816.

JACOBSEN, C. M., L. J. CORCUERA, L. A. BRAVO, J. L. CHRISTIANSEN, & A. MUJICA. 2007. Frost Resistance Mechanisms in Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.). *European Journal of Agronomy* 26(4): 471–75.

JACOBSEN, S. E., MUJICA, A., & JENSEN, C. R. 2003. The Resistance of Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) to Adverse Abiotic Factors. *Food Reviews International* 19(1–2): 99–109.

JANAS, K. M., & POSMYK, M. M. 2013. Melatonin, an Underestimated Natural Substance with Great Potential for Agricultural Application. *Acta Physiologiae Plantarum* 35(12): 3285–92.

JANICKA-RUSSAK, M., KABAŁA, K., BURZYŃSKI, M., & KŁOBUS, G. 2008. Response of plasma membrane H⁺-ATPase to heavy metal stress in *Cucumis sativus* roots. *J. Exp. Bot.* 59, 3721–3728.

JARVIS, D. E., HO, Y. S., LIGHTFOOT, D. J., SCHMÖCKEL, S. M., LI, B., BORM, T. J., ... & TESTER, M. 2017. The genome of *Chenopodium quinoa*. *Nature*, 542(7641), 307-312.

JEWELL, M. C., CAMPBELL, B. C., & GODWIN, I. D. 2010. Transgenic plants for abiotic stress resistance, in *Transgenic Crop Plants*, eds C. Kole, C. H. Michler, A. G. Abbott, and T. C. Hall (Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag), 67–31.

JISHA, K.C., VIJAYAKUMARI, K., PUTHUR, J.T. 2013. Seed priming for abiotic stress tolerance: an over- view. *Acta Physiol Plant* 35:1381–1396

KABAŁA, K., ZBOIŃSKA, M., GŁOWIAK, D., REDA, M., JAKUBOWSKA, D., JANICKA, M. 2019. Interaction between the signaling molecules hydrogen sulfide and hydrogen peroxide and their role in vacuolar H⁺-ATPase regulation in cadmium-stressed cucumber roots. *Physiol. Plant.*, 166, 688–704.

KAUR, S., GUPTA, A.K., KAUR, N. 2002. Effect of osmo- and hydropriming of chickpea on seedling growth and carbohydrate metabolism under water deficit

stress. *Plant Growth Regul* 37:17–22

KAVAMURA, V. N., & ESPOSITO, E. 2010. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metal. *Biotechnol. Adv.* 28, 61–69.

KAYA, G. O., ATAK, M., CIKILI, Y., & KOLSARICI, Ö. 2006. Seed Treatments to Overcome Salt and Drought Stress during Germination in Sunflower (*Helianthus Annuus* L.). *European Journal of Agronomy* 24(4): 291–95.

KIM, D.Y., BOVET, L., KUSHNIR, S., NOH, E.W., MARTINOIA, E., LEE, Y. 2006. AtATM3 is involved in heavy metal resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 140(3):922-32.

KIM, J. J., KIM, T., YANG, J. E., OWENS, G., & KIM, K. 2015. Bioavailability of Heavy Metals in Soils: Definitions and Practical Implementation—a Critical Review. *Environmental Geochemistry and Health* 37(6): 1041–61.

KUMAR, M., PANT, B., MONDAL, S. ET AL. 2016. Hydro and halo priming: influenced germination responses in wheat Var-HUW-468 under heavy metal stress. *Acta Physiol Plant* 38, 217.

KUMARI, P. K. R., BARA, B. M., & SINGH, I. 2017. Effect of Halo Priming and Hormonal Priming on Seed Germination and Seedling Vigour in Maize (*Zea Mays* L) Seeds. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6(4): 27–30.

LANGEROODI, A. R. S., & NOORA, R. 2017. Seed Priming Improves the Germination and Field Performance of Soybean under Drought Stress. *Journal of Animal and Plant Sciences* 27(5): 1611–20.

LEE, M., LEE, K., LEE, J., NOH, E.W. & LEE, Y. 2005. AtPDR12 contributes to lead resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 138: 827–836.

LIU, Z. J., GUO, Y. K., BAI, J. G. 2010a. Exogenous hydrogen peroxide changes antioxidant enzyme activity and protects ultrastructure in leaves of two cucumber ecotypes under osmotic stress. *J. Plant Growth Regul.* 29,171-183

LOU, Y., ZHAO, P., WANG, D., AMOMBO, E., SUN, X., WANG, H., ET AL. 2017 Germination, Physiological Responses and Gene Expression of Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) Growing under Pb and Cd. *PLoS ONE* 12(1): e0169495.

LUTZ, M., MARTÍNEZ, & MARTÍNEZ, E. A. 2013. Daidzein and Genistein Contents in Seeds of Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) from Local Ecotypes Grown in Arid Chile. *Industrial Crops and Products* 49: 117–21.

MARUTA, T., NOSHI, M., TANOUCHI, A., TAMOI, M., YABUTA, Y., YOSHIMURA, K., ISHIKAWA, T., & SHIEOGKA, S. 2012. H₂O₂-triggered retrograde signalling from chloroplasts to nucleus plays specific role in response to stress. *J. Biol. Chem.* 287, 11717-29.

McDonald, M.B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci Technol* 27:177–237

MEHES-SMITH, M., NKONGOLO, K. K., NARENDRULA, R., & CHOLEWA, E. 2014. Mobility of Heavy Metals in Plants and Soil: A Case Study from a Mining Region in Canada. *American Journal of Environmental Sciences* 9(6): 483–93.

MOHAMED, H. I. 2011. Molecular and biochemical studies on the effect of gamma rays on lead toxicity in cowpea (*Vigna sinensis*) plants. *Biol. Trace Elem. Res.* 144, 1205–1218.

MONROY, M., MACEDA-VEIGA, A., & DE SOSTOA, A. 2014. Metal Concentration in Water, Sediment and Four Fish Species from Lake Titicaca Reveals a Large-Scale

Environmental Concern. *Science of the Total Environment* 487(1): 233–44.

MÜLLER-MOULE´, P., HAVAUX, M., & NIYOGLI, K. K. 2003. Zea-xanthin deficiency enhances the high light sensitivity of an ascorbate-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133, 748–760.

MUZAFFAR, R. A., HUSSAIN, M., FAROOQ, M., & WAKEEL, A. 2019. Influence of Seed Priming and Sowing Methods on Growth and Productivity of Wheat Cultivars Differing in Seed Size in Rice-Wheat Cropping System of Punjab, Pakistan. *International Journal of Agriculture and Biology* 21(4): 803–9.

NANDAKUMAR, P. B. A., DUSHENKOV, V., MOTTO, H., & RASKIN, I. 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metal from soils. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1232–1238.

NAWAZ, M.A., JIAO, Y., CHEN, C., SHIREEN, F., ZHENG, Z., IMTIAZ, M., BIE, Z., HUANG, Y. 2018. Melatonin pretreatment improves vanadium stress tolerance of watermelon seedlings by reducing vanadium concentration in the leaves and regulating melatonin biosynthesis and antioxidant-related gene expression. *J. Plant Physiol.*, 220, 115–127.

NI, J., WANG, Q., SHAH, F.A., LIU, W., WANG, D., HUANG, S., FU, S., WU, L. 2018. Exogenous melatonin confers cadmium tolerance by counterbalancing the hydrogen peroxide homeostasis in wheat seedlings. *Molecules*, 23, 799. [CrossRef] [PubMed]

Noctor, G., Mhamdi, A., and Foyer, C.H. 2014. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiol.* 164, 1636-1648.

PAPARELLA, S. S. A., ROSSI, G., WIJAYASINGHE, M., CARBONERA, D., & BALESTRAZZI, A. 2015. Seed Priming: State of the Art and New Perspectives. *Plant Cell Reports* 34(8): 1281–93.

PAPARELLA, S., ARAÚJO, S.S., ROSSI, G., WIJAYASINGHE, M., CARBONERA, D., BALESTRAZZI, A. 2015. Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant cell reports*, 34 (8), Pp. 1281–1293.

PARK, W. 2011. Melatonin as an Endogenous Plant Regulatory Signal: Debates and Perspectives. *Journal of Plant Biology* 54(3): 143–49.

PAŠKO, P., SAJEWICZ, M., GORINSTEIN, S., & ZACHWIEJA, Z. 2008. Analysis of Selected Phenolic Acids and Flavonoids in *Amaranthus Cruentus* and *Chenopodium Quinoa* Seeds and Sprouts by HPLC. *Acta Chromatographica* 20(4): 661–72.

PETROV, V.D., & VAN BREUSEGEM, F. 2012. Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants*. pls014.

POURRUT, M. S., DUMAT, C., WINTERTON, P., & PINELLI, E. 2011. Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 213(June 2017): 113–36.

RADOVANOVIC, V., DJEKIC, I., & ZARKOVIC, B. 2020. Characteristics of Cadmium and Lead Accumulation and Transfer by *Chenopodium Quinoa* Will. *Sustainability (Switzerland)* 12(9).

RAJ, B. A., & RAJ, S. K. 2019. Seed Priming: An Approach towards Agricultural Sustainability. *Journal of Applied and Natural Science* 11(1): 227–34.

RASMANN, M. D. V., CASTEEL, C. L., TIAN, D., HALITSCHKE, R., SUN, J. Y., AGRAWAL, A. A., FELTON, G. W., & JANDER, G. 2012. Herbivory in the Previous Generation Primes Plants for Enhanced Insect Resistance. *Plant Physiology* 158(2): 854–63.

REITER, D. T., ZHOU, Z., CRUZ, M. H. C., FUENTES-BROTO, L., & GALANO, A. 2015. 20 Molecules Phytemelatonin: Assisting Plants to Survive and Thrive 20(4) 7396:7437

RUIZ, S. B., OSES, R., ACUÑA-RODRÍGUEZ, I. S., ANTOGNONI, F., MARTINEZ-MOSQUEIRA, E. A., COULIBALY, A., CANAHUA-MURILLO, A., PINTO, M., ZURITA-SILVA, A., BAZILE, D., JACOBSEN, S., & MOLINA-MONTENEGRO, M. A. 2014. Quinoa Biodiversity and Sustainability for Food Security under Climate Change. A Review. *Agronomy for Sustainable Development* 34(2): 349–59.

SCHWACHTJE, S. J. W., FIRMINO, A. A. P., ZUTHER, E., HINCHA, D. K., & KOPKA, J. 2019. Induced, Imprinted, and Primed Responses to Changing Environments: Does Metabolism Store and Process Information? *Frontiers in Plant Science* 10(February).

SEDZIK, M., SMOLIK, B., KRUPA-MALKIEWICZ, M., 2015. Effect of lead on germination and some morphological and physiological parameters of 10-day-old seedlings of various plant species. *Environ. Prot. Nat. Resour.* 26, 22–27.

SENGAR, R.S., GAUTAM, M., SENGAR, R.S., GARG, S.K., SENGAR, K., CHAUDHARY, R., 2009. Lead stress effects on physiobiochemical activities of higher plants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 196, 1–21.

SETHY, S.K., GHOSH, S. 2013. Effect of heavy metals on germination of seeds. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 4, 272–275.

SHABBIR, M. A., TAHIR, M., BILAL, M., TANVEER, A., HUSSAIN, M., & AFZAL, M. 2014. Impact of Priming Techniques on Emergence and Seedling Growth of Sesame (*Sesamum Indicum* L.) Genotypes. *Scientia Agriculturae* 1(3): 3–7.

SHAHID, M., PINELLI, E., & DUMAT, C. 2012. Review of Pb availability and toxicity

to plants in relation with metal speciation; role of synthetic and natural organic ligands. *J. Hazard. Mater.* 219–220, 1–12.

SHARMA, P., JHA, A.B., DUBEY, R.S., PESSARAKLI, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot.* 2012:1–26.

SHARMA, P., & DUBEY, R. S. 2005. Lead Toxicity in Plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17(1): 35–52.

SHARMA, S. S., & DIETZ, K. J. 2009. The Relationship between Metal Toxicity and Cellular Redox Imbalance. *Trends in Plant Science* 14(1): 43–50.

SHI, C. J., YE, T., TAN, D., REITER, R. J., ZHANG, H., LIU, R., & CHAN, Z. 2015. Comparative Physiological, Metabolomic, and Transcriptomic Analyses Reveal Mechanisms of Improved Abiotic Stress Resistance in Bermudagrass [*Cynodon Dactylon* (L). Pers.] by Exogenous Melatonin. *Journal of Experimental Botany* 66(3): 681–94.

SIDDIQUI, M. M., ABBASI, B. H., AHMAD, N., ALI, M., & MAHMOOD, T. 2014. Toxic effects of heavy metals (Cd, Cr and Pb) on seed germination and growth and DPPH-scavenging activity in *Brassica rapa* var. turnip. *Toxicology and Industrial Health*, 30(3), 238-249.

SINGH, H.P., KAUR, G., BATISH, D.R., KOHLI, R.K. 2011. Lead (Pb)-inhibited radicle emergence in *Brassica campestris* involves alterations in starch-metabolizing enzymes. *Biol. Trace Elem. Res.* 144, 1295–1301.

SINGH, P. P., SINGH, R., SINGH, V. P., & PRASAD, S. M. 2016. Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. *Frontiers in Plant Science* 6(FEB2016): 1–36.

SINGH, S. L., PANDEY, G., BUDHIRAJA, R., & JAIN, R. K. 2003. Phytoremediation: An Overview of Metallic Ion Decontamination from Soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61(5–6): 405–12.

SISODIA, A., PADHI, M., PAL, A.K., BARMAN, K., SINGH, A. 2018. Seed Priming on Germination, Growth and Flowering in Flowers and Ornamental Trees., 10.1007/978-981-13-0032-5_14.

STANKOVIC, S., KALABA, P., & STANKOVIC, A. R. 2014. Biota as Toxic Metal Indicators. *Environmental Chemistry Letters* 12(1): 63–84.

THOMAS, E. C., & LAVKULICH, L. M. (LES). 2015. Aspects Communautaires de La Culture Du Quinoa En Zone Urbaine. *Canadian Journal of Plant Science* 95(2): 397–404.

TOMULESCU, I.M., RADOVICIU, E.M., MERCA, V.V., TUDUCE, A.D. 2004. Effect of copper, zinc and lead and their combinations on the germination capacity of two cereals. *J. Agric. Sci.* 15, 39–42

TOUSI, S., ZOUFAN, P., GHAHFARROKHIE, A.R. 2020. Alleviation of cadmium-induced phytotoxicity and growth improvement by exogenous melatonin pretreatment in mallow (*Malva parviflora*) plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 206, 111403.

VAKTABHAI, C. K., & KUMAR, S. 2017. Seedling Invigouration by Halo Priming in Tomato against Salt Stress. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6(6): 716–22.

VAN BUSSEL, C. G.J., SCHROEDER, J. P., MAHLMANN, L., & SCHULZ, C. 2014. Aquatic Accumulation of Dietary Metals (Fe, Zn, Cu, Co, Mn) in Recirculating

Aquaculture Systems (RAS) Changes Body Composition but Not Performance and Health of Juvenile Turbot (Psetta Maxima). *Aquacultural Engineering* 61: 35–42.

VENTURA, L., DONÀ, M., MACOVEI, A., CARBONERA, D., BUTTAFAVA, A., MONDONI, A., ROSSI, G., BALESTRAZZI, A. 2012. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. *Plant physiology and biochemistry: PPB*, 60, Pp. 196–206.

WANG, H., ZHONG, G., SHI, G., & PAN, F. 2010. Toxicity of Cu, Pb, and Zn on seed germination and young seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). In *International Conference on Computer and Computing Technologies in Agriculture* (pp. 231-240). Springer, Berlin, Heidelberg.

WANG, W., VINO CUR, B., & ALTMAN, A. 2003. Plant Responses to Drought, Salinity and Extreme Temperatures: Towards Genetic Engineering for Stress Tolerance. *Planta* 218(1): 1–14.

WANG, Y., LI, J., WANG, J., & LI, Z. 2010a. Exogenous H₂O₂ improves the chilling tolerance of manilagrass and mascarenegrass by activating the antioxidative system. *Plant Growth Regul.* 61, 195-204.

WANG, Y., ZHANG, J., LI, J.L., & MA, X.R. 2014a. Exogenous hydrogen peroxide enhanced the thermotolerance of *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne* by increasing the antioxidative capacity. *Acta Physiol. Plant* 36, 2915-2924.

WEI, Q. L., CHU, Y., REITER, R. J., YU, X., ZHU, D., ZHANG, W., MA, B., LIN, Q., ZHANG, J., & CHEN, S. 2015. Melatonin Enhances Plant Growth and Abiotic Stress Tolerance in Soybean Plants. *Journal of Experimental Botany* 66(3): 695–707.

WEN, J.-F., GONG, M., LIU, Y., HU, J.-L., DENG, M.-H. 2013. Effect of hydrogen peroxide on growth and activity of some enzymes involved in proline metabolism of

sweet corn seedlings under copper stress. *Sci. Hortic.*, 164, 366–371.

WUANA, R. A., & OKIEIMEN, F. E. 2011. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology* 2011: 1–20.

XIAO, S., GAO, W., CHEN, Q.F., RAMALINGAM, S., CHYE, M.L. 2008. Overexpression of membrane-associated acyl-CoA-binding protein ACBP1 enhances lead tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J*, 54(1):141-51.

XIE, C., XIONG, X., HUANG, Z., SUN, L., MA, J., CAI, S., YU, F., ZHONG, W., CHEN, S., LI, X. 2018. Exogenous melatonin improves lead tolerance of bermudagrass through modulation of the antioxidant defense system. *Int. J. Phytoremed.*, 20, 1408–1417.

XIONG, Z. T. 1998. Lead uptake and effects on seed germination and plant growth in a Pb hyperaccumulator *Brassica pekinensis* Rupr. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 60(2), 285-291.

XU, F.J., JIN, C.W., LIU, W.J., ZHANG, Y.S., & LIN, X.Y. 2010. Pretreatment with H₂O₂ alleviates aluminum-induced oxidative stress in wheat seedlings. *J. Integr. Plant Biol.* 54, 44-53.

XU, Y., ZHOU, G., ZHOU, L. ET AL. 2007. Expression patterns of the rice class I metallothionein gene family in response to lead stress in rice seedlings and functional complementation of its members in lead-sensitive yeast cells. *CHINESE SCI BULL* 52, 2203–2209

YANG, X., FENG, Y., HE, Z., & STOFFELL, P. J. 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 339–353.

YILDIZ, M., TERZI, H., BINGÜL, N., YILDIZ, M. 2013. Protective role of hydrogen peroxide pretreatment on defense systems and BnMP1 gene expression in Cr (VI)-

stressed canola seedlings. *Ecotoxicology*, 22, 1303–1312.

ZHANG, H. M., & ZHANG, Y. 2014. Melatonin: A Well-Documented Antioxidant with Conditional pro-Oxidant Actions. *Journal of Pineal Research* 57(2): 131–46.

ZHANG, Y., DENG, B., LI, Z. 2018. In hibition of NADPH oxidase increases defense enzyme activities and improves maize seed germination under Pb stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 158, 187–192

Zhang, F., Xiao, X., Xu, K., Chieng, X., Xie, T., Hu, J., Wu, X. 2020. Genome-wide association study (GWAS) reveals genetic loci of lead (Pb) tolerance during seedling establishment in rapeseed (*Brassica napus* L.). *BMC Genomics* 21, 139

ZRIG, AHLEM & SALEH, AHMED & SHETEIWY, DR. MOHAMED & HAMOUDA, FOUED & SELIM, SAMY & ABDEL-MAWGOUD, MOHAMED & ALMUHAYAWI, MOHAMMED & OKLA, MOHAMMAD & ZAHID, ABBAS & AL-QAHTANI, WHAIDA & YEHIA, RAMY & ABDELGAWAD, HAMADA. (2022). Melatonin priming as a promising approach to improve biomass accumulation and the nutritional values of *Chenopodium quinoa* sprouts: A genotype-based study. *Scientia Horticulturae*. 301. 111088.