



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

**RESPUESTA DEL “ÁLAMO CHILENO” (*POPULUS NIGRA* VAR. *ITALICA*)
FRENTE A CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO. EVALUACIÓN DEL
EFECTO DEL EXCESO DE GERMANIO.**

Proyecto de Título presentado a la Facultad de Ciencias Forestales de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Ingeniero en
Biotecnología Vegetal

POR: Gabriel Arias Soto

Profesores Guías: Dr. Fernando Guerra Guerrero
Dr. Rafael Rubilar Pons

Octubre, 2024

Concepción, Chile

© 2024, Gabriel Ignacio Arias Soto

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

RESPUESTA DEL “ÁLAMO CHILENO” (*POPULUS NIGRA* VAR.
ITALICA) FRENTE A CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO.
EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXCESO DE GERMANIO.

Profesor Guía

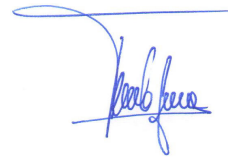


Rafael Rubilar Pons

Profesor Titular

Ingeniero Forestal, PhD.

Profesor Guía



Fernando Guerra Guerrero

Colaborador Externo

Ingeniero Forestal, Dr.

DEDICATORIA

Primero a mi familia, y luego a cada persona que abrió en su momento la puerta a mis dudas, a cada persona que me sugirió mejoras, que me dio tiempo y de su paciencia. Estaré eternamente agradecido.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto FONDECYT 1201740

Proyecto FONDEQUIP EQM 160100

Prof. Dr. Fernando Guerra Guerrero, Instituto de Cs. Biológicas, Universidad de Talca

Prof. Dr. Rafael Rubilar Pons, Facultad de Cs. Forestales, Universidad de Concepción

Prof. Dr. Yamil Neira Hinojosa, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.

Dr. Mario Moya, Instituto de Cs. Biológicas, Universidad de Talca

Javiera Valenzuela, Instituto de Cs. Biológicas, Universidad de Talca

Pablo Garrido, Facultad Agronomía Universidad de Talca

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Fitoextracción de diferentes contaminantes y la importancia estratégica de recuperación del suelo en un marco de productividad.....	2
1.2 <i>Populus nigra</i> como modelo de estudio.....	4
1.3 Genes candidatos para estudio	5
1.4 HIPÓTESIS	9
II. METODOLOGÍA.....	10
2.1 Material vegetal	10
2.2 Condiciones de crecimiento en ensayo hidropónico y tratamiento de estrés	10
2.3 Diseño experimental.....	11
2.4 Análisis de perfiles transcripcionales	12
Diseño de partidores para RT-qPCR.....	12
Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR.....	15
Análisis estadístico de datos de expresión génica	16
2.5 Análisis del contenido de elementos minerales	17
2.6 Evaluación de variables fisiológicas	17
2.7 Análisis estadístico de las variables fisiológicas.....	18
III. RESULTADOS	19
3.1. Análisis fisiológico: Conductancia estomática y tasa de transporte de electrones.....	19
3.2. Análisis elemental mediante TR-XRF.....	22
3.3. PCR y qRT-PCR	24
IV. DISCUSIÓN	29
V. CONCLUSIONES.....	37
VI. GLOSARIO.....	39
VII. BIBLIOGRAFÍA	42
VIII. APÉNDICE	51

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 3.1. Efecto del Ge sobre la conductancia estomática (<i>g_s</i>) en hojas de plantas de <i>Populus nigra</i>	20
Figura 3.2. Efecto del Ge sobre la tasa de transporte de electrones (ETR) a nivel de fotosistema II de hojas de plantas de <i>Populus nigra</i>	21
Figura 3.3. Concentración relativa de elementos para el rango ppm-ppb mediante fluorescencia de reflexión total de rayos-x en muestra “Tallo A”.	23
Figura 3.4. Productos de amplificación por PCR para los genes HMA2, HMA5, MT2-L;1, NRAMP2, NRAMP3;1 y PCS1.....	25
Figura 3.5. Expresión relativa del gen de metalotioneína, MT2-L, en hojas y raíces de plantas de <i>P. nigra</i> expuestas a Ge	26
Figura 3.6. Expresión relativa del gen del transportador de metales NRAMP2 en hojas y raíces de plantas de <i>P. nigra</i> expuestas a Ge.....	27

RESUMEN

La fitoextracción es una técnica prometedora y económica para mitigar la contaminación de suelos por metales pesados. Utiliza plantas, como por ejemplo, álamos (*Populus* spp.), para absorber y acumular metales en sus tejidos, involucrando proteínas especializadas y la expresión de genes específicos. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta de *Populus nigra* var. *italica* (álamo chileno) frente al estrés por exceso de germanio (Ge). Las plantas, cultivadas en un sistema hidropónico, fueron expuestas a una concentración de 5 μ M de óxido de Ge durante 21 horas, después de dos meses de crecimiento. Se evaluó la expresión de genes relacionados con el transporte de agua y metales, así como con mecanismos antioxidantes y quelantes peptídicos a nivel transcripcional. Adicionalmente, se realizó una caracterización elemental mediante espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF), y se analizaron las variables fisiológicas, conductancia estomática (*gs*) y tasa de transporte de electrones (ETR).

Los resultados mostraron que, aunque no hubo cambios significativos en la *gs*, se detectaron diferencias significativas en la ETR bajo estrés por Ge. Las concentraciones de Ge en los tejidos evaluados fueron indetectables con la técnica TR-XRF empleada. A nivel molecular, se observó una expresión diferencial de los genes NRAMP2 en hojas y MT2-L en raíces, lo que sugiere un

mecanismo adaptativo frente al estrés por metales divalentes. Estos genes estarían implicados en la detoxificación de metales y la protección contra el estrés oxidativo, a pesar de la falta de acumulación detectable de Ge en los tejidos.

Populus nigra var. *italica* mostró respuestas fisiológicas y moleculares específicas frente al estrés inducido por Ge, sugiriendo su potencial en estrategias de fitorremediación. A pesar de que no se detectaron concentraciones significativas de Ge en los tejidos, los cambios en la expresión de genes clave sugieren la activación de mecanismos de adaptación que podrían aprovecharse en futuras investigaciones para optimizar la fitoextracción y mitigar la contaminación por metales pesados.

ABSTRACT

Phytoextraction is a promising and economical technique to mitigate heavy metal contamination of soils. It utilizes plants such as poplars (*Populus* spp.) to absorb and accumulate metals in their tissues through the expression of specific genes. The objective of this study was to evaluate the response of *Populus nigra* var. *italica* (Chilean poplar) to germanium (Ge) excess stress. Plants, grown in a hydroponic system, were exposed to a 5 μ M concentration of Ge oxide for 21 hours after two months of growth. The expression of genes related to water and metal transport, as well as antioxidant and peptide chelating mechanisms was evaluated at the transcriptional level. In addition, elemental characterization was performed by X-ray fluorescence spectrometry (XRF), and the physiological variables stomatal conductance (gs) and electron transport rate (ETR) were analyzed.

The results showed that, although there were no significant changes in gs, significant differences were detected in ETR under Ge stress. Ge concentrations in the tissues evaluated were undetectable with the applied technique. At the molecular level, differential expression of NRAMP2 genes in leaves and MT2-L in roots was observed, suggesting an adaptive mechanism against divalent metal stress. These genes would be involved in metal detoxification and protection

against oxidative stress, despite the lack of detectable Ge accumulation in tissues.

Populus nigra var. *italica* showed specific physiological and molecular responses to Ge-induced stress, suggesting its potential in phytoremediation strategies. Although no significant Ge concentrations were detected in tissues, changes in the expression of key genes suggest the activation of adaptive mechanisms that could be exploited in future research to optimize phytoextraction and mitigate heavy metal contamination.

I. INTRODUCCIÓN

Existen nuevas necesidades y tecnologías de remediación de suelos contaminados que, a causa de la diversidad de elementos contaminantes y condiciones medioambientales, deben ser abordados de manera diferenciada. La identificación de estos desafíos implica dar paso a una mayor individualización de las variables y factores que median el fenómeno de fitoextracción y avocar los esfuerzos en encontrar enfoques y aplicabilidades, para luego, maximizar la eficacia de los tratamientos aplicados (Giudicianni et al., 2017; Hu et al., 2024).

La fitoextracción es un fenómeno observado en las plantas, las cuales pueden absorber contaminantes y otros solutos desde sustratos sólidos o líquidos, incluyendo metales pesados, pudiendo también acumularlos en órganos y tejidos. Es un proceso natural relacionado con diferentes factores, incluyendo los estados de estrés y aspectos nutricionales de la planta. Este proceso es el principio básico de las técnicas de fitorremediación, las cuales han demostrado ser alternativas económicas y ecológicas para la remediación de suelos y cuerpos de agua contaminados, en comparación con los métodos convencionales de remediación. En los últimos años, hay un creciente interés en la aplicación de tanto herramientas como métodos biotecnológicos para mejorar la eficacia de las diferentes alternativas de fitorremediación, y en específico de la fitoextracción (Asgari Lajayer et al., 2019; Baker & Brooks, 1989; Jiménez-Moleón et al., 2015)

En el caso de la fitoextracción con especies arbóreas, su estratificación vertical natural permite optimizar la captura y acumulación de contaminantes, minimizando los riesgos de lixiviación y volatilización. Además, esta estrategia presenta un alto potencial para la producción de biomasa y la restauración de servicios ecosistémicos. (Alcaíno Concha, 2012; Harris et al., 2024; Lukić et al., 2024; Mendarte-Alquisira et al., 2021)

1.1 Fitoextracción de diferentes contaminantes y la importancia estratégica de recuperación del suelo en un marco de productividad

La contaminación por metales pesados y metaloides en el suelo es un problema ambiental global, ya que éstos pueden tener efectos negativos en la salud humana y el medio ambiente (Londoño-Franco et al., 2016). La fitoextracción ha surgido como una solución potencialmente efectiva y económica para remediar la contaminación y acumular trazas que serían difícilmente obtenibles usando métodos tradicionales de remediación de suelos. Algunos de estos minerales también tienen una gran importancia estratégica para el desarrollo de tecnologías que involucran dispositivos electrónicos, energías renovables, o aplicaciones en el ámbito de la medicina y la defensa (Lima et al., 2021; Wen et al., 2024). Sin embargo, su extracción minera y procesamiento genera grandes impactos

ambientales y sanitarios, debido a la presencia de metales pesados en las zonas de explotación y los residuos generados relacionados con la industria de la minería en general (Rascio & Navari-Izzo, 2011; Wang et al., 2005).

Tomando en cuenta una posible aplicación en una rehabilitación ecosistémica, la fitoextracción también es una alternativa rentable en comparación con otras técnicas de extracción de contaminantes presentes en cuerpos de aguas (Ayaz et al., 2020). Dichos cuerpos se asocian a áreas donde se desarrollan faenas mineras, los cuales también tienden a acumular metales pesados (El-Amier et al., 2020; Gbogbo & Otoo, 2015; Heisi et al., 2023).

La fitoextracción también es una alternativa atractiva para obtener o recuperar elementos minerales de alto valor económico, que están presentes en cantidades traza en los suelos. Un ejemplo son las tierras raras, y otros recursos dentro de los cuales está el Ge (Ramírez et al., 2018). Desde el punto biológico, este metaloide no es considerado esencial para las plantas. Por esto, el conocimiento de la respuesta de ellas frente a la presencia de este elemento es fundamental para determinar su potencial toxicidad, o la capacidad de las plantas para extraerlo desde el suelo.

Las plantas muestran una batería de respuestas frente a la exposición a estrés por elementos minerales. Algunos de los mecanismos exhibidos incluyen la quelación de los iones libres, el transporte dirigido hacia organelos, y la transformación de moléculas, como las especies reactivas de oxígeno, en otras

menos reactivas o fitotóxicas (Ahmad et al., 2019; Ahmed & Chaumont, 2023; Peralta-Pérez & Volke-Sepúlveda, 2012).

Los mecanismos que regulan las respuestas de los vegetales frente a condiciones de estrés son complejos, contando como elemento común, la regulación de la expresión de genes que subyace la activación de mecanismos defensivos. En ese sentido, por ejemplo, la detección y caracterización de genes involucrados en la absorción y translocación de iones minerales puede ser fundamental para mejorar el entendimiento del fenómeno y la eficiencia de la fitoextracción. Este tipo de información puede ser utilizado para guiar procesos de mejoramiento genético, a través de aproximaciones tradicionales, o biotecnológicas, para desarrollar plantas adecuadas para fitoextracción de minerales de importancia económica o ambiental (Choi et al., 2013; Javot & Maurel, 2002; Pinton et al., 2016; Wang et al., 2008; Wang et al., 2018).

1.2 *Populus nigra* como modelo de estudio

Populus nigra, conocido como álamo negro, es una especie arbórea de hoja comúnmente caduca, perteneciente a la familia Salicaceae (Du et al., 2022; Maillard et al., 2015). Esta especie ha sido ampliamente estudiada en diversos campos de la biotecnología vegetal debido a su rápido crecimiento, su capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales y su habilidad para acumular

metales pesados, como por ejemplo Cd y Cr (Alizadeh & Mirarab-Razi, 2016; Jakovljević et al., 2015) y otros contaminantes en el suelo. Ello, sumado a una alta producción de biomasa, lo convierte en un modelo interesante para fitoextracción (Salehi et al., 2023; Samara et al., 2020). En el caso de metaloides, la capacidad de esta especie para acumular metales pesados se ha relacionado con la expresión de genes específicos, incluyendo acuaporinas y otros genes asociados al transporte y translocación de metales (Campos del Pozo, 2011; Delgadillo-López et al., 2011; Majeti & Freitas, 2003; Rajkumar et al., 2010; Ruttens et al., 2011).

1.3 Genes candidatos para estudio

Dada la complejidad de los mecanismos biológicos que subyacen la respuesta de las plantas frente a las condiciones de estrés impuestas por la presencia de metales o metaloides en el suelo, en este estudio se considera la realización de una revisión bibliográfica para orientar la definición de genes candidatos a evaluar. Dicha revisión es fundamental para identificar genes previamente relacionados con funciones biológicas asociadas a la respuesta defensiva de las plantas (Navarro Aviñó et al., 2007; Pérez et al., 2014; Tang et al., 2019).

Adicionalmente, el análisis de algunas fuentes de información, como la ontología génica (GO) disponible en distintas plataformas (ej., <https://geneontology.org/>),

que relaciona los genes con los procesos biológicos en los cuales están involucrados, también proporciona una base sólida para seleccionar genes con un papel crucial, por ejemplo, en procesos de transporte en el citosol y regulación de la actividad transmembranal. A continuación, se describen las principales categorías de genes definidas para efectos de este estudio.

Acuaporinas

Las acuaporinas son uno de los principales tipos de proteínas relacionadas con la dinámica de translocación de agua y solutos en las plantas. Entre los distintos tipos de acuaporinas se incluye:

- Proteínas Intrínsecas de Membrana Plasmática (PIPs). Es una familia de proteínas de membrana altamente especializadas que se encuentran en una variedad de organismos, incluyendo plantas y animales. Estas proteínas actúan como canales de transporte selectivos para el movimiento de agua a través de las membranas celulares (Patel et al., 2020; Tangahu et al., 2011)

- Proteínas Intrínsecas de Tonoplasto (TIPs). Es una familia de proteínas de membrana de transporte presentes en plantas y otros organismos. Estas proteínas se caracterizan por facilitar el transporte selectivo de agua y otros solutos, incluyendo iones, a través de las membranas de la vacuola (Isayenkov & Maathuis, 2008).

- *Nodulin 26-like Intrinsic Protein* (NIPs). Es una familia de proteínas de membrana de transporte encontradas en plantas que pertenecen a la familia de las proteínas de la “nodulina 26-like”. Estas proteínas son conocidas por su papel en la regulación del transporte de agua y otros solutos a través de las membranas celulares en las plantas (Beamer, 2022).

Transportadores de metales

- Proteínas Asociadas a Metales Pesados (HMAs). Es una categoría de proteínas especializadas que se encuentran en una variedad de especies, incluyendo plantas y microorganismos. Estas proteínas tienen la capacidad de unirse a metales pesados tóxicos, como Cd, el Pb y el Zn, y desempeñan un papel crucial en la homeostasis de metales y la detoxificación.(Bernal Ibáñez, 2006; Gómez Gallego, 2019; Pérez Palacios, 2015).

- Proteína Asociada a la Resistencia Natural en Macrófagos (NRAMPs). Es una familia de proteínas de membrana que juegan un papel clave en la regulación del transporte de metales, especialmente de Fe y Mn, en una amplia gama de organismos, incluyendo humanos, plantas y microorganismos (Ramanadane et al., 2021; Ray et al., 2022; Ray & Gaudet, 2023; Y. Yang et al., 2023).

Quelantes peptídicos

- Fitoquelatinas (PCs). Son péptidos de bajo peso molecular, producidos por la polimerización de glutatión, que desempeñan un papel fundamental en la homeostasis de metales en plantas y microorganismos. Estos péptidos están implicados en la unión, quelación y detoxificación de metales pesados tóxicos, como el Cd, el Pb y el Hg, en el interior de las células (Del Buono et al., 2020; Pavel et al., 2013; Reddy & Prasad, 1990)

- Metalotioneínas (MTs). Corresponden a una familia de proteínas de bajo peso molecular que se encuentran en una variedad de organismos, incluyendo plantas, animales y microorganismos. Estas proteínas están altamente especializadas en la unión, almacenamiento y detoxificación de metales esenciales, como Zn y Cu, así como de metales pesados tóxicos, como el Cd y Hg (Paylar et al., 2023; J. Yang et al., 2023)

Dadas las oportunidades y desafíos de desarrollar sistemas de fitoextracción, y entendiendo la necesidad de un marco de productividad y restauración ecológica, es importante estudiar respuestas de las plantas frente a diferentes fuentes de estrés, y en particular a las inducidas por metales pesados. En ese sentido *P. nigra* var. *Italica* es una especie forestal con potencial para fitorremediación. Sin embargo, su respuesta bajo condiciones de exceso de Ge es desconocida.

Considerando ese contexto, en este trabajo se plantea la siguiente hipótesis de investigación:

1.4 HIPÓTESIS

La exposición de plantas de Populus nigra var Italica a Ge induce en ellas una condición de desbalance fisiológico, la cual activa una respuesta defensiva y una acumulación de este elemento en órganos específicos. Dicha respuesta es mediada por la expresión diferencial de genes asociados al transporte y quelación de metales.

OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

General

Evaluar la respuesta fisiológica, transcripcional y de acumulación del “álamo chileno” (*Populus nigra* var *Italica*) frente al estrés por exceso de Ge.

Específicos

1. Analizar el efecto de condiciones de estrés por Ge en la respuesta fisiológica y patrones de acumulación de este elemento en plantas de álamo.
2. Evaluar la respuesta transcripcional de genes asociados a diferentes mecanismos de defensa, en plantas de álamo sometidas a estrés por Ge.

II. METODOLOGÍA

2.1 Material vegetal

Las plantas utilizadas correspondieron a accesiones en formas de estacas de dos subvariedades, tanto semisiempreverdes como caducifolias de *Populus nigra* var *Italica*, colectadas en el marco del proyecto FONDECYT 1201740, desde los alrededores de Rengo, Región de O'Higgins, en agosto de 2023. Se consideró un número inicial de 40 estacas, las que fueron tratadas con fungicida y mantenidas en cámara de frío (4°C) hasta su establecimiento, a modo de alcanzar la cantidad de horas de frío necesarias para un enraizamiento exitoso.

2.2 Condiciones de crecimiento en ensayo hidropónico y tratamiento de estrés

El establecimiento del ensayo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Genética y Biotecnología Forestal, del Instituto de Ciencias Biológicas, de la Universidad de Talca, en Talca. Se utilizaron bandejas plásticas recubiertas con papel aluminio, para evitar la luz en el sistema radicular. Cada bandeja se rellenó con 4 l de solución nutritiva. En cada una de ellas se establecieron 4 estacas que fueron mantenidas durante 10 semanas hasta alcanzar un desarrollo significativo en sistema radicular de más de 10 cm y más de 15 hojas en la parte aérea.

Durante las semanas de enraizamiento las plantas recibieron una solución nutritiva de Hoagland (PhytoTechnology Laboratories, EE. UU.), a $\frac{1}{4}$ de fuerza. El medio de crecimiento contó con un sistema de aireación que permitió la oxigenación de las raíces. El área de ensayo fue mantenida considerando luz y temperatura ambiente. Durante las últimas 3 semanas se procedió a realizar un pretratamiento que consistió en mantener el cultivo hidropónico con agua destilada, reemplazando el agua potable utilizada hasta ese momento, a fin de un mejor control de los minerales en solución.

El tratamiento de estrés consistió en la exposición de las plantas a una concentración subletal de 5 μM de Ge (GeO_2 ; Sigma-Aldrich, número catálogo 483702), la cual fue adicionada a la solución posterior a la tercera semana de pretratamiento. La elección de la concentración de Ge se basó en información reportada por la literatura como dosis letal en cebada (Wiche et al., 2018). El tratamiento de estrés se extendió por 21h.

2.3 Diseño experimental

Durante el desarrollo del experimento se observó la muerte de parte de plantas cultivadas hidropónicamente. Ello habría derivado del uso de agua potable, debido a la falla de un equipo destilador, la cual habría tenido una carga importante de cloro. Esto obligó a modificar el diseño experimental inicial a uno

más simple, que consideró medidas repetidas(3) en variables fijas sin interacción, con dos niveles (control y aplicación de Ge). Para las variables fisiológicas se consideró adicionalmente el tiempo como un segundo factor para lograr evidenciar el efecto del estrés inducido separado del estrés intrínseco del medio, incluyendo dos niveles (antes y después del período de exposición de un día).

2.4 Análisis de perfiles transcripcionales

Diseño de partidores para RT-qPCR

La selección de un conjunto de genes, asociados a la respuesta adaptativa de *P.nigra* frente a exceso de metales, fue llevada a cabo mediante una revisión bibliográfica y el análisis de la correlación funcional de los productos génicos resultantes asociada a la anotación de ontología genética (GO), disponible en la plataforma UNIPROT (Consortium, 2019). La lista incluyó genes codificantes de metalotioneinas, fitoquelatina sintetasa, acuaporinas y transportadores de metales pesados. Los parámetros de diseño consideraron los criterios indicados a continuación.

Longitud y temperatura de fusión

Las condiciones estándar para llevar a cabo una PCR o qPCR son críticas para asegurar la precisión y la reproducibilidad de la amplificación del ADN. En

particular, el tamaño de los partidores generalmente está en el rango de 60 a 80 pares de bases (pb). Éste se selecciona estratégicamente para equilibrar la especificidad de la unión a la secuencia objetivo y la eficiencia de la amplificación. Las temperaturas de denaturación y fusión se ajustaron siguiendo las recomendaciones del software Primer-BLAST (Ye et al., 2012), en este caso, 57, 60 y 63 °C, como mínima, óptima y máxima, respectivamente. Esto garantiza una denaturación adecuada para separar las hebras de ADN y un alineamiento específico de los partidores a la secuencia diana.

Especificidad y regiones conservadas

Las regiones con la mayor cantidad de exones para las distintas regiones con los genes de interés, dentro del genoma de *Populus trichocarpa* (Richards et al., 2020; Tuskan et al., 2006), fueron exploradas a través del programa *Genome Data Viewer* (Rangwala et al., 2021), con el propósito de identificar áreas altamente conservadas y específicas. Estas regiones fueron posteriormente investigadas en *P. nigra*, utilizando la herramienta BLAST (Chen et al., 2015). En cada gen, las regiones seleccionadas se definieron tomando como referencia la segunda sección con señal más intensa de exón río abajo del sitio de inicio de la transcripción, priorizando las regiones más conservadas y con mayor cantidad de señales de exones codificantes. (Wolfsberg, 2010).

Homogeneidad del amplicón

El diseño de los partidores consideró la obtención de amplicones de 60 a 80 pb, priorizando la menor cantidad de isoformas posibles, usando para ello *Primer-BLAST* y la secuencia de referencia de *P. nigra* var *italica* (Genome assembly ddPopNigr1.1) disponible en NCBI(Schoch et al., 2020).

Validación y amplificación de fragmentos de genes de interés mediante PCR de punto final en ADN.

En primera instancia se verificó la capacidad de amplificación de los partidores, para lo cual se utilizó ADN de las plantas evaluadas, antes del proceso de estrés. El ADN fue extraído y purificado usando el sistema *MAGJET DNA KIT* (Thermo Fisher), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Luego, con el kit *ABM TAQ DNA Polymerase* se llevó a cabo la PCR de punto final. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2%, debido al tamaño bajo 100pb de los fragmentos amplificados. Para validar y comparar la amplificación se utilizó cDNA de *P.nigra* disponible en el laboratorio a partir de dos procesos de formación precedentes (a y b, ver Fig. 4). El programa de PCR de punto final consistió en 30 ciclos con denaturación a 94°C, durante 3 minutos y 30 segundos, alineamiento de los partidores a 62°C, durante 30 segundos, y extensión a 72°C,

durante 40 segundos por ciclo, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR

Se realizó el aislamiento de ARN a partir de muestras colectadas inmediatamente después de la exposición a Ge, las cuales fueron mantenidas congeladas a -80°C, hasta el momento de la extracción. Las muestras fueron pulverizadas en un equipo homogenizador de muestras biológicas *MM 400* (Guillén-Watson et al., 2011). El ARN total fue aislado utilizando el sistema *Spectrum™ Plant RNA kit* (Sigma-Aldrich; STRN50)(Stephens et al., 2015).

El ADN presente en las muestras de ARN total fue eliminado mediante el kit *TURBO DNase free* (Invitrogen, EEUU)(Jones et al., 2007), siguiendo las indicaciones del fabricante. La pureza y concentración de ARN se estimó en espectrofotómetro UV/Vis EPOCH (Paredes Hernández, 2022) y posteriormente fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. La concentración final de ARN se ajustó a 100 ng μl^{-1} . El cDNA se sintetizó a partir de 1 μg de ARN total utilizando el sistema *First Strand cDNA Synthesis* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), según instrucciones del fabricante.

Posterior a la síntesis de cDNA, se comenzó con la reacción de qPCR para evaluar la expresión relativa usando el reactivo Takyon™ No ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP(Escobar, 2019) en placas de 96 pocillos en el equipo Agilent AriaMx Real-Time PCR System (Choi et al., 2018), con un termociclado a temperatura de denaturación de 92°C por 20s y amplificación de 60°C por 30s.

Análisis estadístico de datos de expresión génica

La variación en la abundancia relativa de los transcritos se evaluó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Se incluyeron tres réplicas por tratamiento, con dos replicas técnicas en cada ocasión. Se usó la librería “pcr” disponible para descarga en Rstudio 2023.09.1+494 "Desert Sunflower" Release for Windows (Ahmed & Kim, 2018), que incluía función “lm” para valores estadísticos asociados y “métodos” para definir ΔCt y $\Delta\Delta Ct$. Estos valores se obtuvieron a partir del Ct, definido como el ciclo en el que la fluorescencia de la reacción de PCR cruza un umbral preestablecido.

2.5 Análisis del contenido de elementos minerales

Los órganos aéreos (tallos y hojas) y raíces fueron separados en cada planta, una vez concluido el tratamiento de estrés. Los componentes de la planta fueron secados en estufa a 60°C, hasta peso constante, y posteriormente fueron sometidos a una etapa que consideró un análisis cualitativo de las concentraciones de Ge, y otros elementos, el cual fue llevado a cabo específicamente en muestras de tallos de las plantas evaluadas. Para ello se usó la técnica de “reflexión total de fluorescencia de rayos x” (*Total Reflection X-ray Fluorescence*, TR-XRF), mediante el equipo Bruker S4 TStar, Bruker Nano GmbH, Germany (Ashraf et al., 2019; González-Domínguez et al., 2014), del Departamento de Química Analítica, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Concepción. Esta técnica requiere un mínimo de preparación de la muestra que consiste en pulverizar y luego usar un vidrio reloj de acrílico diseñado para soportar cantidades mínimas de muestra, lo que implica un método simple y de bajo costo.

2.6 Evaluación de variables fisiológicas

Las mediciones fisiológicas fueron llevadas a cabo durante el 2 y 3 de enero de 2024, con una diferencia de aproximadamente 21 horas entre ellas. Los valores

de conductancia estomática (*gs*) y tasa de transporte de electrones (ETR) en la hoja fueron medidos en las plantas ensayadas mediante un porómetro/fluorómetro Li-COR, LI-600(Grünhofer et al., 2022; LI-COR), facilitado por la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Talca.

2.7 Análisis estadístico de las variables fisiológicas.

Los análisis de todas las variables fisiológicas fueron llevados a cabo con los software Excel y RStudio. En relación a este último se utilizaron las librerías especializadas “readxl” (Wickham et al., 2019), “lme4” (Hothorn et al., 2015), “car” (Fox et al., 2012), “ggplot2” (Wilson et al., 2017), “multcomp” (Sultana et al., 2019), “rstatix” (Kassambara, 2019), “dplyr” (Wickham et al., 2022) y “agricolae” (De Mendiburu & Simon, 2015). Se aplicaron pruebas estadísticas de Breusch-Pagan y de Shapiro-Wilk, para confirmar homocedasticidad y distribución normal de los datos, respectivamente (Buyolo et al., 2006). El efecto de los factores experimentales fue evaluado considerando un ANOVA de dos vías, sin interacción, entre los factores día y estrés por Ge (Horton & Kleinman, 2015), seguido por una prueba Fisher LSD (Least significant difference).

III. RESULTADOS

3.1. Análisis fisiológico: Conductancia estomática y tasa de transporte de electrones

Las hojas de las plantas ensayadas fueron evaluadas respecto de g_s y ETR antes, y 21 horas después del período de estrés inducido por Ge. Para g_s , no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre las plantas expuestas a Ge y las plantas control (Figura 1). En cambio, la ETR mostró una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre las plantas tratadas con Ge y las plantas control (Fig. 2).

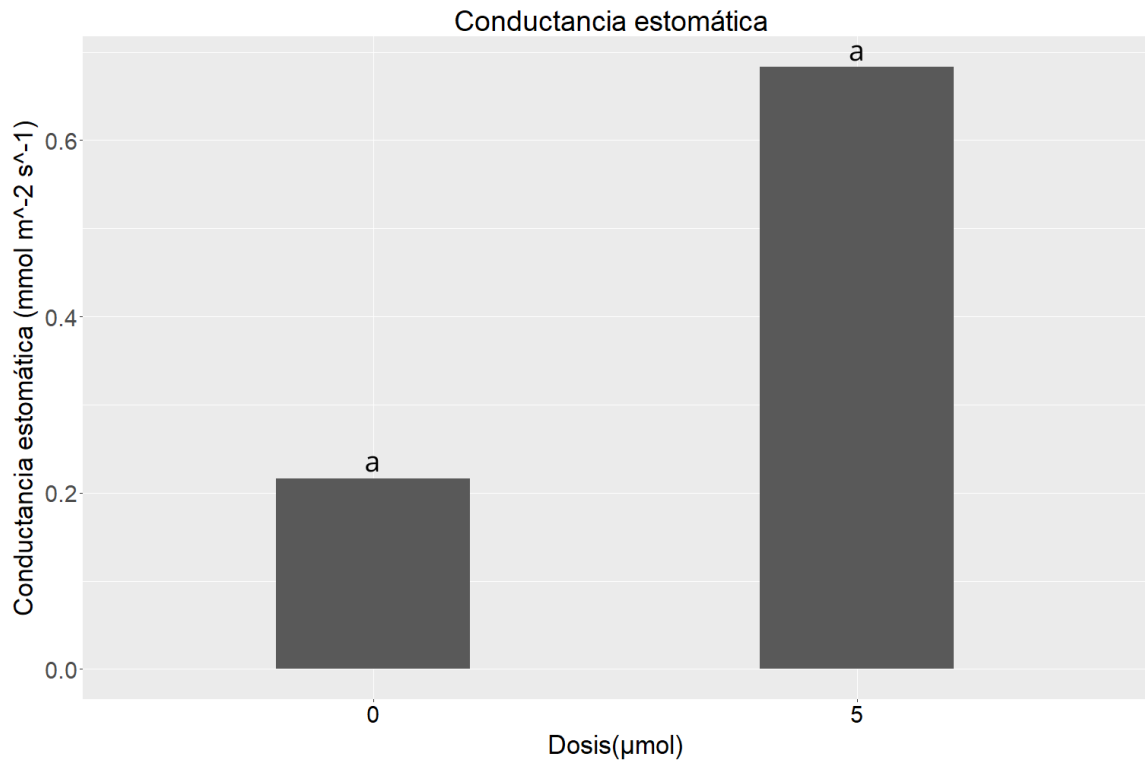


Figura 1. Efecto del Ge sobre la conductancia estomática (g_s) en hojas de plantas de *Populus nigra*. En el eje X se presenta la concentración de Ge en la solución nutritiva (μM), mientras que en el eje Y se indica la g_s en milimoles por metro cuadrado por segundo ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las barras representan los valores promedio obtenidos para cada concentración. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las dosis de Ge.

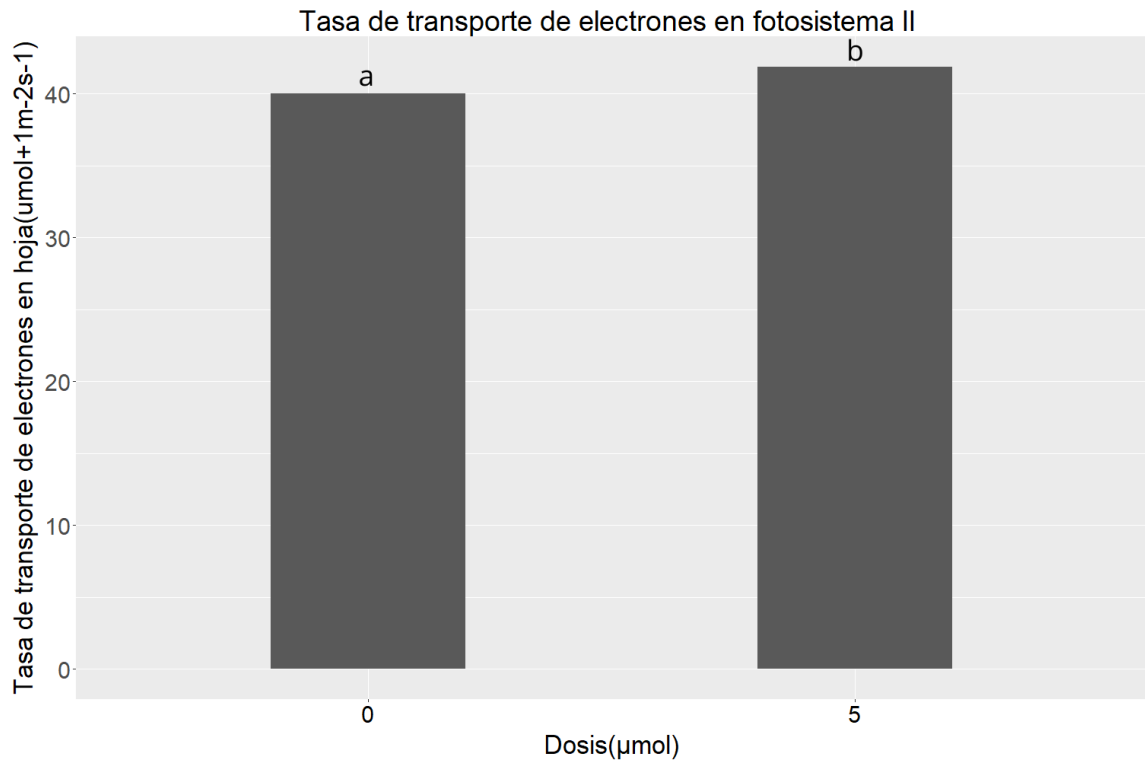


Figura 2. Efecto del Ge sobre la tasa de transporte de electrones (ETR) a nivel de fotosistema II de hojas de plantas de *Populus nigra*. En el eje X se observa la cantidad de Ge aplicada (μM), y en el eje Y la tasa de transporte de electrones en micromoles por metro cuadrado por segundo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las barras representan los valores promedio obtenidos para cada concentración. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las dosis de Ge.

3.2. Análisis elemental mediante TR-XRF

El análisis elemental mediante TR-XRF no detectó niveles cuantificables de Ge en las muestras de tallo procesadas, debido a que las concentraciones del elemento estuvieron por debajo del límite de detección para este elemento. En ese sentido, es posible que la acumulación de Ge en las plantas de *P. nigra* var. *Italica* se haya producido a niveles bajo “ultra traza” (bajo 0,5 μM), insuficientes o subóptimos para ser cuantificados con los parámetros de detección estándar de TR-XRF.

A pesar de no detectarse Ge en las plantas evaluadas, se identificaron otros elementos, tanto nutrientes esenciales como no esenciales, que se encuentran de manera natural en los vegetales. Entre los elementos minerales detectados se encuentran Fe, Cu, Zn, Ca, K, S y Mn, todos ellos con funciones metabólicas clave para el crecimiento y desarrollo vegetal. Además, se observaron elementos no esenciales como Rb, Cr y Sr, cuya presencia podría estar relacionada con las condiciones del medio de cultivo, la variabilidad genética de las plantas, o bien ser un indicativo de contaminantes ambientales absorbidos por la planta. En la Figura 3 se observa específicamente una señal de Cr, no disponible en otra sección de tejido.

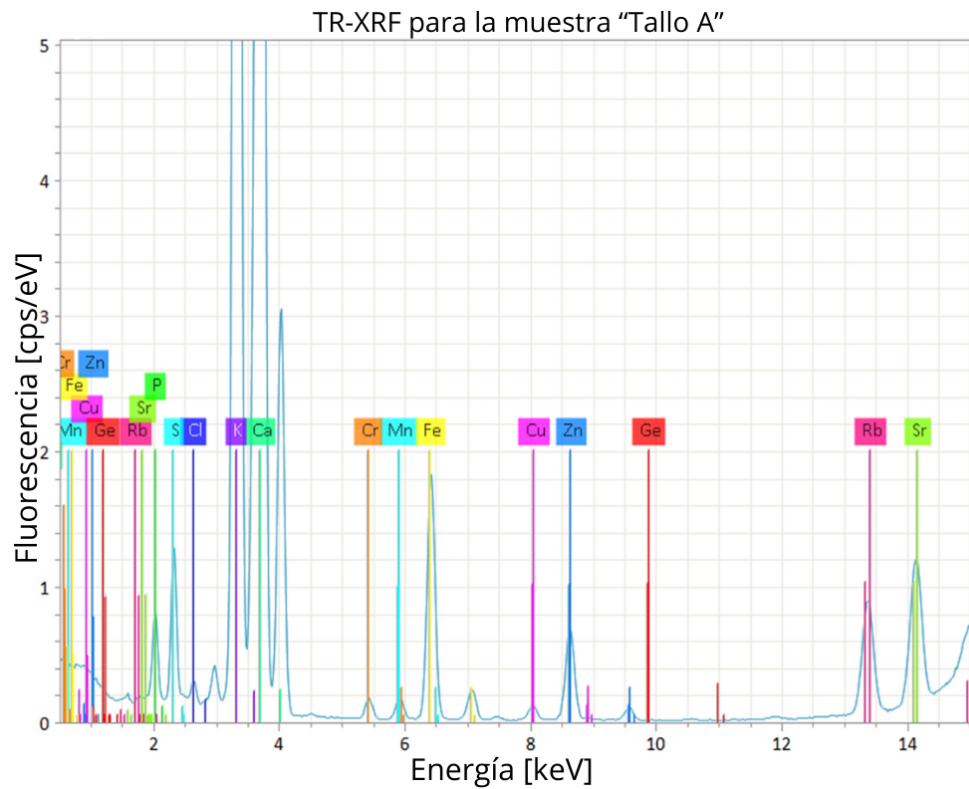


Figura 3. Concentración relativa de elementos para el rango ppm-ppb mediante fluorescencia de reflexión total de rayos-x en muestra "Tallo A". En el eje X se observa el nivel de energía necesaria para excitar el elemento, además el eje Y corresponde al número de cuentas por cada eV. En la señal de color rojo se puede observar que no hay un pico de fluorescencia correspondiente a Ge.

3.3. PCR y qRT-PCR

Un conjunto de 15 partidores fue diseñado para evaluar la expresión, a nivel transcripcional, de genes asociados a distintos mecanismos involucrados en la respuesta adaptativa de *P. nigra*. Del este conjunto inicial, los partidores de 5 genes fueron validados respecto a su capacidad de amplificación (sin interferencias aparentes en la medición de su señal) mediante PCR de punto final, con DNA y cDNA, en condiciones restrictivas, con temperatura de alineamiento de 62°C y 15 s de reacción de alineamiento, el cual estableció los partidores útiles para el siguiente paso del análisis transcripcional. La presencia de bandas en los diferentes carriles del gel de la Fig. 4 muestra la amplificación exitosa de algunos de los genes de interés (específicamente MT2L y NRAMP2) que incluye algunos fragmentos inespecíficos. En el gel se incluyó un marcador de peso molecular (*ladder* 100 bp), para facilitar la estimación del tamaño de los productos amplificados. Los partidores para los restantes 10 genes no pudieron ser validados, debido a una amplificación inespecífica (generaban más de un producto de amplificación) o ausencia de bandas (APÉNDICE 2).

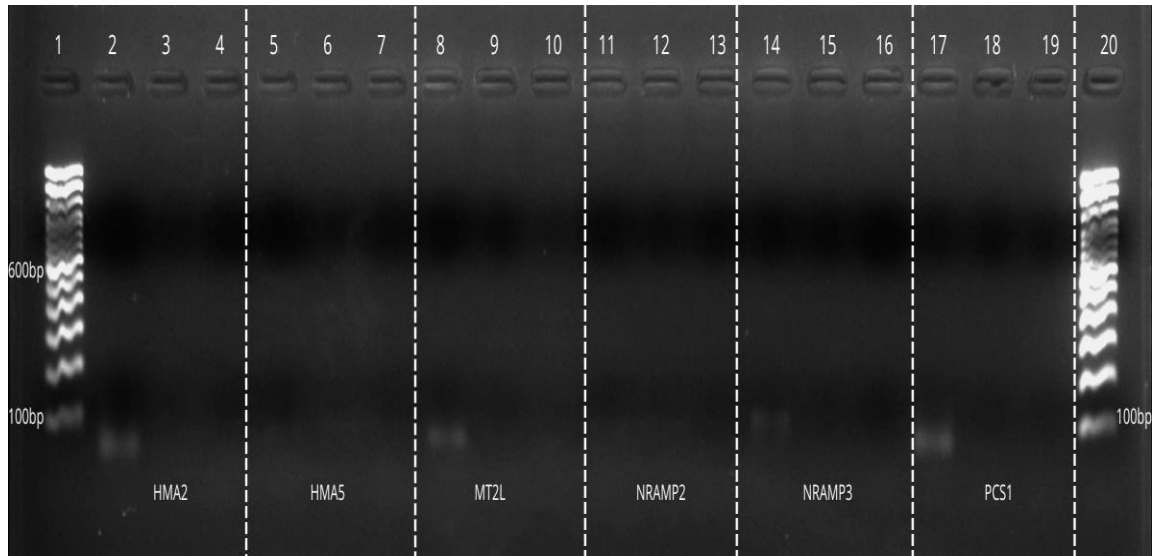


Figura 4. Productos de amplificación por PCR para los genes HMA2, HMA5, MT2-L;1, NRAMP2, NRAMP3;1 y PCS1. Los carriles 1 y 20 corresponden a marcadores de peso molecular. Las marcas de cada partidor se ordenan tomando en cuenta cDNA A, cDNA B y control negativo. Gel de agarosa al 2%.

Los tamaños de las bandas observadas coinciden con los tamaños esperados para los diferentes amplicones. Sin embargo, hay bandas de tamaño similar acompañando a la objetivo, que son muy difíciles de identificar, como en el caso del gen de la fitoquelatina sintasa (PCS1). Las bandas únicas indican la presencia de los productos de PCR correspondientes a cada gen, validando así los cebadores utilizados para la amplificación.

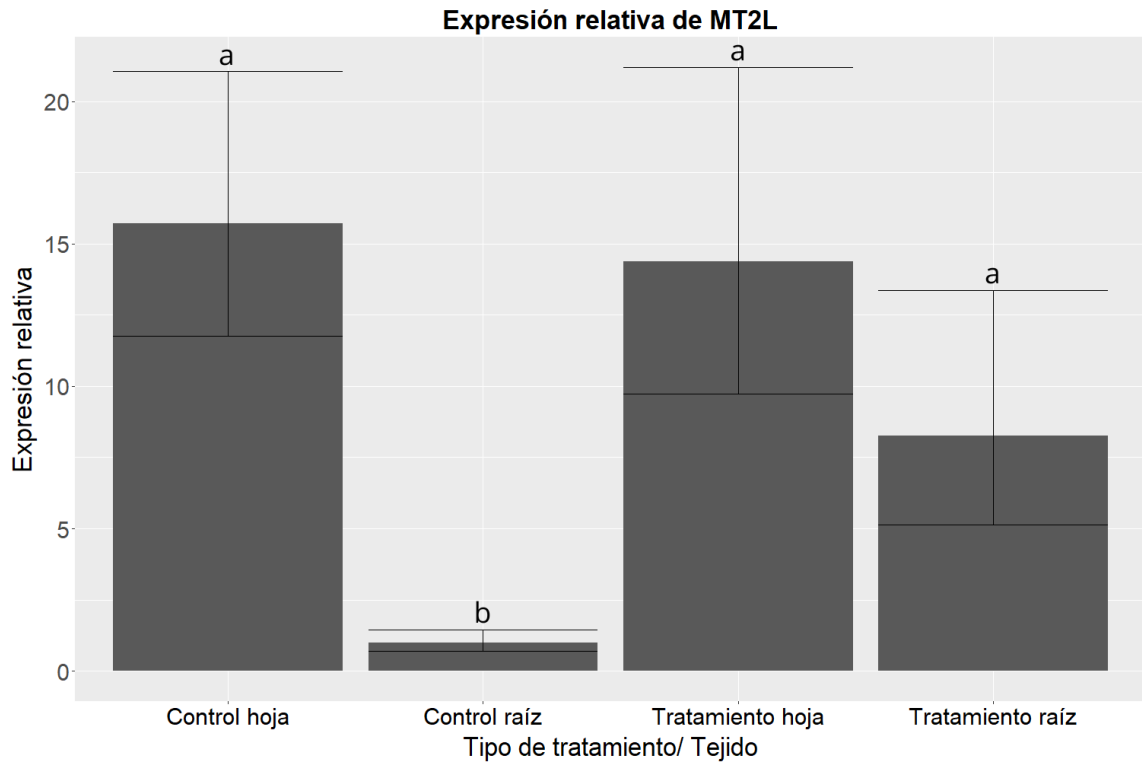


Figura 5. Expresión relativa del gen de metalotioneína, MT2-L, en hojas y raíces de plantas de *P. nigra* expuestas a Ge. En el eje X se presentan los tejidos evaluados (hojas y raíces), y en el eje Y se indica la expresión relativa (respecto del gen de normalización). Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios de expresión. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos/tejidos.

Los transcritos del gen MT2-L se incrementaron significativamente ($p < 0,05$) en las raíces expuestas a Ge, respecto de las raíces de las plantas control, indicando una inducción del gen, y sugiriendo un aumento en la producción de metalotioneínas a nivel de este órgano (Fig. 5). Por su parte, en las hojas de las plantas evaluadas los transcritos no variaron significativamente. Las

metalotioneínas juegan un papel crucial en la quelación de metales (divalentes) a nivel del citosol, lo que sugiere una respuesta adaptativa que facilitaría la quelación y detoxificación del Ge, a nivel de raíces (bajo las condiciones evaluadas).

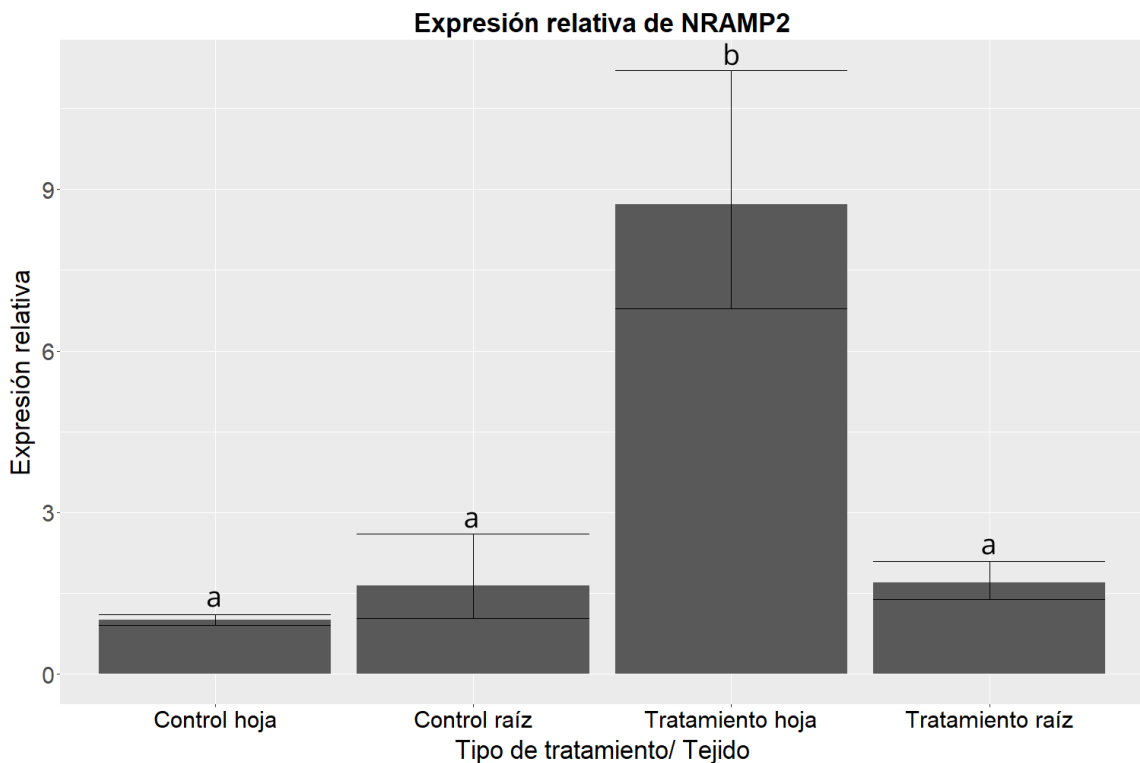


Figura 6. Expresión relativa del gen del transportador de metales NRAMP2 en hojas y raíces de plantas de *P. nigra* expuestas a Ge. En el eje X se presentan los tejidos evaluados (hojas y raíces), y en el eje Y se indica la expresión relativa (respecto gen de normalización). Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios de expresión. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos/tejidos.

La figura 6 muestra la expresión relativa del gen transportador de membrana NRAMP2, indicando una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) en la tasa de transcripción de este gen por efecto del Ge, particularmente a nivel de las hojas. Este patrón de expresión órgano-específico sugiere que la respuesta adaptativa, a nivel de este transportador en particular, por efecto de del estrés por Ge, se concentraría principalmente en las hojas.

Respecto a los genes candidatos a qPCR restantes, como en el caso de TIP2, HMA2 y PCS1, se observó amplificación inespecífica, la cual se evidenció en la qPCR debido a la muy baja diferencia de peso molecular entre los fragmentos de interés y fragmentos de amplificación no deseados. Ello produjo un gel sin líneas adicionales aparentes y una qPCR con picos de amplificación que no permitieron validar las señales (APÉNDICE 3).

IV. DISCUSIÓN

Muerte inicial de plantas.

Durante el proceso de enraizamiento de las estacas de álamo, debido a la falta de agua destilada, se utiliza agua potable, esta situación no permite tener una cantidad considerable de plantas y tejidos para canalizar un análisis más exhaustivo, pudiendo dar más luz a las dinámicas que rigen el efecto de Ge sobre otras variables de interés tales como la concentración de clorofila, radio polar, cantidad de hojas y pesos secos (Pandey et al., 2010). Además de contener una cantidad desconocida de cloro en ella, el agua contiene posiblemente otros minerales, como sugieren algunos estudios previos (González León & Tapia Sanhuesa, 2014). Esta situación tiene consecuencias imprevistas que no se pueden corregir durante el experimento, como el pardeamiento de las raíces, provocado por el estrés oxidativo en esta parte de las plantas.

Evaluación del contenido de elementos

El análisis elemental no detecta una señal cuantificable para el Ge en los niveles de energía esperados, lo cual podría explicarse por la baja concentración del elemento en las muestras o, alternativamente, por la posibilidad de que *P. nigra* no acumule Ge de manera significativa, dada su condición de elemento no

esencial en las plantas. La literatura sugiere que el Ge tiene una baja afinidad para ser acumulado en tejidos vegetales (Fan et al., 2021; Li et al., 2021; Zheng et al., 2020). Además, el equipo de fluorescencia de rayos X, con una sensibilidad que alcanza las ultra trazas (sub-partes por billón), podría no ser adecuado para detectar cantidades mínimas de este elemento. Adicionalmente, se observa un pico inesperado para cromo (Cr), que podría deberse a una concentración no prevista en el agua utilizada. Este hallazgo podría afectar los tejidos vegetales y los niveles de expresión génica evaluados en el estudio.

Evaluación fisiológica

Los resultados revelan que no hay diferencias significativas para *gs* entre los tratamientos con Ge y los controles ($p \geq 0,05$). Este hallazgo sugiere que, al menos en las condiciones y el período de tiempo evaluados, la exposición a Ge no tiene un impacto directo en la capacidad de las plantas para regular el intercambio gaseoso a través de sus estomas. Aunque se ha demostrado que algunos metales pesados afectan la *gs* al alterar la homeostasis del agua y el transporte de iones (Seregin & Kozhevnikova, 2006), en este caso el Ge no parece haber desencadenado una respuesta similar en el periodo o a las concentraciones aplicadas en este estudio.

Es posible que las fluctuaciones diarias en el intercambio gaseoso, como las descritas por otros autores (Ferreyra E et al., 2007), enmascaren algún efecto potencial del Ge sobre la *gs*, lo que justificaría la realización de mediciones más frecuentes durante el día para evaluar variaciones diurnas más detalladamente. Un diseño experimental con más puntos de medición diurnos permitiría obtener una imagen más precisa de cómo el Ge podría afectar el comportamiento estomático a lo largo del día.

Por otro lado, la ETR sí muestra una diferencia significativa ($p < 0,05$), producto del Ge, lo que sugiere que la exposición a este elemento afectó el rendimiento fotosintético de las plantas, específicamente en el fotosistema II. La alteración en la ETR es consistente con lo observado en estudios donde metales pesados provocan estrés oxidativo, forzando a las plantas a ajustar su aparato fotosintético (Broadley et al., 2012). Esto sugiere que, aunque no hubo un impacto claro sobre la conductancia estomática, el Ge indujo un estrés suficientemente fuerte como para afectar el proceso de transporte de electrones, lo que podría ser una señal de un mayor gasto energético en mecanismos de defensa o reparación del daño celular.

La falta de acumulación aparente de Ge en los tejidos, unida a la alteración observada en la ETR, podría apuntar a una respuesta fisiológica mediada por señales provenientes de las raíces o a una redistribución rápida del Ge hacia

otros órganos no evaluados. Este fenómeno ha sido observado en otras especies bajo estrés por metales, donde las raíces actúan como el primer punto de detección y respuesta, enviando señales sistémicas que alteran la fisiología de las hojas sin una acumulación significativa de los metales en ellas (Hall, 2002).

Si bien el Ge no afecta la conductancia estomática de forma significativa, sí indujo una alteración en la eficiencia fotosintética. La conexión entre estos efectos y los mecanismos de transporte y señalización de Ge en las plantas requiere de más investigación, particularmente para comprender si este elemento se comporta de manera similar a otros metales pesados que activan respuestas sistémicas en las plantas.

Expresión génica

En cuanto a la expresión relativa de genes bajo condiciones de estrés por GeO_2 , las Figuras 5 y 6 muestran patrones diferenciados por órgano. En específico, la expresión del gen MT2-L en hojas no presenta diferencias significativas, mientras que en raíces se observa un aumento significativo en la cantidad de transcritos al exponer las plantas a Ge. Esto es coherente con la literatura sobre la respuesta de las plantas a metales divalentes, donde las metalotioneínas juegan un papel crucial en la detoxificación y relocalización de estos metales, reduciendo así su impacto negativo procesos como la respiración celular (Panda & Choudhury,

2005; Rodríguez-Serrano et al., 2008; Ureña Robles, 2007). Por su parte la transcripción de NRAMP2 es significativamente mayor en las hojas de las expuestas a estrés por Ge, en comparación con el control, mientras que en las raíces no se observó un cambio significativo. NRAMP2 es una proteína de membrana involucrada en la resistencia a especies reactivas de oxígeno y en el transporte de metales fitotóxicos, como se ha descrito en la literatura (Gao et al., 2018; Saed-Moucheshi et al., 2014; Tan et al., 2023). Dado que aparentemente no hay un aumento en la cantidad de Ge en las hojas, es posible que el aumento en la expresión de NRAMP2 se deba a señales derivadas de la raíz en respuesta al estrés, más que a una actividad de transporte directa de Ge.

En relación algunos aspectos metodológicos, en la PCR de punto final a 62°C con menor tiempo de alineamiento (Fig. 4), las bandas son escasas y poco notorias debido a la variación en la energía requerida para denaturar ciertos fragmentos. Estos resultados sugieren la posibilidad de realizar qPCR para definir la expresión relativa, pero no descartan la posibilidad de señales inespecíficas. Por otro lado, la amplificación de secuencias de genes de acuaporinas se haya dificultada debido a la composición resistente a la temperatura de los partidores, y a su inespecificidad, debido a la alta conservación de los motivos que permiten formar las proteínas, lo que podría resultar en una baja eficiencia de alineamiento(Salman et al., 2022). Adicionalmente, el diseño y selección de

partidores basados en exones altamente conservados no habría permitido una selección de candidatos para un análisis más exhaustivo de expresión.

Aspectos prácticos asociados a la determinación de la expresión génica

Para efecto de la estandarización de la expresión relativa de los genes de interés se emplea como gen constitutivo al gen “EF1”, codificante de un factor de elongación, el cual es imprescindible para la traducción en las células. Las curvas de amplificación demostraron la utilidad de este gen como normalizador de las curvas de los genes de interés.

Aspectos por considerar en futuras investigaciones

Para proporcionar un entendimiento más completo sobre la interacción entre *Populus nigra*, el Ge, y otros metales presentes en el medio, es necesario abordar este fenómeno de manera más amplia, incorporando más datos y una mayor capacidad experimental en diferentes contextos. Un aspecto clave que debe tenerse en cuenta es la variabilidad genética dentro de la especie *P. nigra*, que podría influir significativamente en la respuesta fisiológica y molecular de los individuos. Dado que diferentes genotipos pueden responder de manera diversa a las condiciones de estrés por metales pesados, sería valioso realizar estudios

en múltiples genotipos de *P. nigra* para evaluar la diversidad de respuestas adaptativas y los mecanismos moleculares subyacentes.

Estudios de expresión génica en diferentes condiciones ambientales o en variaciones estacionales y geográficas también podrían ampliar el conocimiento sobre cómo estas interacciones afectan la fisiología y la expresión génica en *P. nigra* y otras especies de interés. La inclusión de factores como la variabilidad genética interindividual entre clones o poblaciones locales permitiría evaluar si algunas variantes genéticas tienen mayor capacidad para acumular o tolerar metales pesados. Este enfoque contribuiría a un modelo más robusto de acumulación de metales pesados en especies vegetales.

El estudio de estrés combinado, como el exceso de Ge junto con la sequía u otros factores abióticos, también merece atención. Evaluar la expresión génica y la respuesta fisiológica bajo condiciones de estrés múltiple permitiría identificar mecanismos de resistencia y adaptación que no se manifiestan bajo condiciones de estrés único. Esto podría ser relevante no solo para entender cómo las plantas lidian con ambientes contaminados, sino también para aplicarlo en sistemas de fitorremediación. En este sentido, las futuras investigaciones deberían considerar no solo el ambiente físico, sino también el biológico, donde la microbiota del suelo podría jugar un papel esencial en la modulación de la disponibilidad de metales y la salud general del suelo.

Además, sería crucial en el futuro realizar investigaciones que integren la interacción entre la genética de la planta y la microbiota, dado que algunas cepas microbianas pueden influir en la absorción y movilización de metales pesados, facilitando o inhibiendo la acumulación en los tejidos vegetales. Este enfoque multidimensional que involucra la genética, el ambiente y la biología del suelo será clave para desarrollar estrategias más efectivas en la fitorremediación y en la rehabilitación ecológica en áreas contaminadas.

Finalmente, el desarrollo de modelos basados en herramientas de *deep learning* para la identificación y predicción de la composición mineral y biológica del suelo sería un avance interesante por considerar en futuras investigaciones (Chang et al., 2017; Cheng et al., 2023). Estos modelos podrían aprovechar datos transcriptómicos disponibles en bibliotecas genómicas, integrando la inteligencia artificial para identificar patrones complejos entre la genética de las plantas, la composición del suelo y la microbiota asociada (Zhang et al., 2022). Esta noción podría mejorar nuestra comprensión de cómo las plantas interactúan con su entorno y facilitar la creación de estrategias más eficaces para la fitorremediación y la rehabilitación de áreas contaminadas (Mohan et al., 2024).

V. CONCLUSIONES

El presente estudio analizó los efectos del estrés inducido por Ge en *Populus nigra* var. italica, revelando respuestas fisiológicas y moleculares específicas que sugieren la capacidad de esta especie para manejar dicho estrés en condiciones ambientales adversas. A pesar de que no se observaron diferencias significativas en la conductancia estomática, sí se evidenció una variación notable en la tasa de transporte de electrones, lo que sugiere un impacto a nivel de los procesos fotosintéticos que merece mayor atención en estudios futuros.

Los resultados obtenidos a través de espectrometría de fluorescencia de rayos X no permitieron confirmar de manera concluyente la acumulación de Ge en los tejidos vegetales, lo que indica que *P. nigra* no poseería una alta afinidad por la absorción o retención de Ge en las condiciones experimentales utilizadas. Esta observación concuerda con el hecho de que el Ge es un elemento no esencial para las plantas, lo cual podría explicar la baja o nula acumulación observada. No obstante, estos resultados también señalan la necesidad de aplicar técnicas de detección más sensibles o realizar ajustes en los protocolos experimentales para mejorar la precisión en la evaluación de la presencia de Ge en tejidos vegetales.

En el ámbito molecular, se detectaron diferencias significativas en la expresión de los genes MT2-L y NRAMP2, a nivel transcripcional, bajo condiciones de estrés por Ge. El aumento en la expresión de MT2-L en las raíces sugiere una mayor producción de metalotioneínas, las cuales desempeñan un papel crucial en la detoxificación y quelación de metales divalentes, protegiendo así a las células de posibles efectos tóxicos. Por su parte, el incremento en la expresión de NRAMP2 en las hojas sugiere una respuesta adaptativa a través de la regulación de mecanismos antioxidantes, probablemente inducida por señales de estrés desde las raíces, más que por la acumulación directa de Ge.

En conclusión, la capacidad de *Populus nigra* var. *italica* para modificar su expresión génica en respuesta a condiciones adversas, sugiere su potencial en estrategias de fitorremediación, lo que la posiciona como una alternativa para la mitigación de contaminantes metálicos en suelos afectados. Sin embargo, será necesario realizar investigaciones adicionales que profundicen en los mecanismos moleculares y fisiológicos implicados para maximizar su eficiencia en escenarios de remediación ambiental.

VI. GLOSARIO

Ácido nucleico: Macromolécula esencial para la vida, como el ADN y ARN.

Biomarcadores: Indicadores biológicos que pueden medir y evaluar procesos fisiológicos o patológicos.

Biotecnología: Uso de organismos vivos, sistemas o procesos biológicos en la producción de bienes y servicios.

cDNA (ADN complementario): ADN sintetizado a partir de una plantilla de ARN mediante la enzima transcriptasa inversa.

Citoplasma: Parte de la célula que rodea al núcleo y contiene orgánulos y diversas moléculas.

Citosol: Parte líquida del citoplasma donde se encuentran disueltas diversas moléculas.

Conductancia estomática(*gs*): Medida de la facilidad con la que el vapor de agua puede pasar a través de los estomas de las plantas.

Detoxificación: Proceso mediante el cual las células eliminan o neutralizan sustancias tóxicas.

Tasa de transporte de electrones (ETR): es un parámetro utilizado en la fotosíntesis para medir la eficiencia con la que los electrones son transportados a través del fotosistema II (PSII)

Fitotoxicidad: Efecto tóxico de una sustancia química sobre las plantas.

Fitoquelatinas: Péptidos que se unen a metales pesados y los neutralizan. Son producidos enzimáticamente a partir de glutatión

Fitoextracción: Técnica de fitorremediación en la que las plantas absorben contaminantes del suelo y los acumulan en sus tejidos.

Gel de agarosa: Medio utilizado en la electroforesis para separar moléculas de ADN.

GelRed: Intercalante de ADN utilizado en la electroforesis para visualizar ácidos nucleicos.

Genes *HMA2/HMA5*: Genes que codifican proteínas transportadoras de metales en plantas.

Marcadores *ladder*: Fragmentos de ADN de tamaño molecular conocido utilizados como referencia en electroforesis.

Metales pesados: Elementos metálicos de alta densidad que pueden ser tóxicos en concentraciones elevadas.

Metaloide: Elemento con propiedades intermedias entre metales y no metales.

Metalotioneínas (*MT2-L*): Proteínas que se unen a metales pesados y ayudan en la detoxificación.

***NRAMP2/NRAMP3*:** Genes que codifican proteínas transportadoras de metales en membranas celulares.

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa): Técnica de biología molecular utilizada para amplificar fragmentos específicos de ADN.

Quelación: Proceso mediante el cual se forman complejos entre metales y moléculas orgánicas, facilitando su transporte y almacenamiento.

Secuencias de exones: Regiones del ADN que codifican para proteínas y son cruciales en la regulación de la expresión génica.

Transcriptasa inversa: Enzima que sintetiza ADN a partir de una plantilla de ARN.

XRF (Espectrometría de fluorescencia de rayos X): Técnica utilizada para determinar la composición elemental de una muestra.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, J., Ali, A. A., Baig, M. A., Iqbal, M., Haq, I., & Irfan Qureshi, M. (2019). Chapter 8 - Role of Phytochelatins in Cadmium Stress Tolerance in Plants. In M. Hasanuzzaman, M. N. V. Prasad, & M. Fujita (Eds.), *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants* (pp. 185-212). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00008-5>
- Ahmed, J., & Chaumont, F. (2023). CHAPTER Ten - Plant aquaporins: crossroads of hydrogen peroxide signaling. In R. O. N. Mittler & F. V. Breusegem (Eds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 105, pp. 311-342). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.abr.2022.11.003>
- Ahmed, M., & Kim, D. R. (2018). pcr: an R package for quality assessment, analysis and testing of qPCR data. *PeerJ*, 6, e4473.
- Alcaíno Concha, G. I. (2012). Análisis y comparación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales.
- Alizadeh, S. M., & Mirarab-Razi, J. (2016). Growth and accumulation responses of *Populus nigra* L. exposed to hexavalent chromium excess. *Caspian journal of environmental sciences*, 14, 253-261.
- Asgari Lajayer, B., Khadem Moghadam, N., Maghsoodi, M. R., Ghorbanpour, M., & Kariman, K. (2019). Phytoextraction of heavy metals from contaminated soil, water and atmosphere using ornamental plants: mechanisms and efficiency improvement strategies. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(9), 8468-8484. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04241-y>
- Ashraf, A., Stosnach, H., Parkes, H. G., Hye, A., Powell, J., So, P.-W., Soinine, H., Tsolaki, M., Vellas, B., Lovestone, S., Aarsland, D., Kloszeweska, I., Mecocci, P., Wahland, L.-O., & for the AddNeuroMed, c. (2019). Pattern of Altered Plasma Elemental Phosphorus, Calcium, Zinc, and Iron in Alzheimer's Disease. *Scientific Reports*, 9(1), 3147. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37431-8>
- Ayaz, T., Khan, S., Khan, A. Z., Lei, M., & Alam, M. (2020). Remediation of industrial wastewater using four hydrophyte species: A comparison of individual (pot experiments) and mix plants (constructed wetland). *Journal of Environmental Management*, 255, 109833. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109833>
- Baker, A., & Brooks, R. (1989). Terrestrial Higher Plants Which Hyperaccumulate Metallic Elements, A Review of Their Distribution, *Ecol. Phytochem. Biorecovery*, 1.
- Beamer, Z. (2022). Nodulin 26 like Intrinsic Proteins: Structurally Similar Membrane Channels with Diverse Functions in Plant Hypoxia Stress, Metalloid Nutrition & Toxicity.
- Bernal Ibáñez, M. (2006). Mecanismos de tolerancia al exceso de cobre en suspensiones celulares de soja. Caracterización del transportador de cobre HMA8.
- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., & Zhao, F. (2012). Chapter 7 - Function of Nutrients: Micronutrients. In P. Marschner (Ed.), *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition)* (pp. 191-248). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00007-8>

- Buyolo, T., Fernández, L., Fanlo, R., Venegas, F., Cabezas, J., & Paton, D. (2006). A parallel genetic algorithm for the prediction of metabolizable energy of grasslands. *Grassland Productivity*.
- Campos del Pozo, V. M. (2011). *Fitorremediación de contaminantes persistentes: una aproximación biotecnológica utilizando chopo (Populus Spp.) como sistema modelo Montes*].
- Chang, H.-X., Haudenschild, J. S., Bowen, C. R., & Hartman, G. L. (2017). Metagenome-Wide Association Study and Machine Learning Prediction of Bulk Soil Microbiome and Crop Productivity [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00519>
- Chen, Y., Ye, W., Zhang, Y., & Xu, Y. (2015). High speed BLASTN: an accelerated MegaBLAST search tool. *Nucleic acids research*, 43(16), 7762-7768. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv784>
- Cheng, Z., Zheng, Q., Shi, J., He, Y., Yang, X., Huang, X., Wu, L., & Xu, J. (2023). Metagenomic and machine learning-aided identification of biomarkers driving distinctive Cd accumulation features in the root-associated microbiome of two rice cultivars. *ISME Communications*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s43705-023-00213-z>
- Choi, I. W., Seo, D. C., Han, M. J., DeLaune, R. D., Ok, Y. S., Jeon, W. T., Lim, B. J., Cheong, Y. H., Kang, H. W., & Cho, J. S. (2013). Accumulation and Toxicity of Germanium in Cucumber under Different Types of Germaniums [Article]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 44(20), 3006-3019. <https://doi.org/10.1080/00103624.2013.829083>
- Choi, S.-w., Hoshikawa, K., Fujita, S., Thi, D. P., Mizoguchi, T., Ezura, H., & Ito, E. (2018). Evaluation of internal control genes for quantitative realtime PCR analyses for studying fruit development of dwarf tomato cultivar 'Micro-Tom'. *Plant Biotechnology*, 35(3), 225-235.
- Consortium, U. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research*, 47(D1), D506-D515.
- De Mendiburu, F., & Simon, R. (2015). *Agricolae-Ten years of an open source statistical tool for experiments in breeding, agriculture and biology* (2167-9843).
- Del Buono, A., D'ORTA, A., DE MONACO, A., TORRISI, A., TREPANI, S., DI PAOLO, M., & BLASIO, G. (2020). FITOCHELATINE RESEARCH IN ENVIRONMENTAL STRESS CONDITIONS BY HEAVY METALS: A REPORT FOR CANCER PREVENTION.
- Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., & Acevedo-Sandoval, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14(2), 597-612.
- Du, K., Wu, W., Liao, T., Yang, J., & Kang, X. (2022). Transcriptome analysis uncovering regulatory networks and hub genes of Populus photosynthesis and chlorophyll content [Article]. *Genomics*, 114(4), Article 110385. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110385>
- El-Amier, Y. A., Bonanomi, G., Al-Rowaily, S. L., & Abd-ElGawad, A. M. (2020). Ecological Risk Assessment of Heavy Metals along Three Main Drains in Nile Delta and Potential Phytoremediation by Macrophyte Plants. *Plants*, 9(7), 910. <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/7/910>
- Escobar, M. R. (2019). Functional study of potential sHSPs in Arabidopsis and tomato under environmental stress.
- Fan, B., Tang, M., Yao, L., Zhang, A., Yin, H., Yang, W., Ma, Z., Xiang, W., & Bao, Z. (2021). Germanium fractions in typical paddy soil and its interaction with humic substances.

- Environmental Science and Pollution Research*, 28(8), 9670-9681.
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-11482-9>
- Ferreira E, R., Selles V, G., Maldonado B, P., Celedón de A, J., & Gil M, P. (2007). Efecto del Clima, de las Características de la Hoja y de la Metodología de Medición en el Potencial Hídrico Xilemático en Palto (Persea americana Mill.). *Agricultura Técnica*, 67, 182-188.
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072007000200008&nrm=iso
- Fox, J., Weisberg, S., Adler, D., Bates, D., Baud-Bovy, G., Ellison, S., Firth, D., Friendly, M., Gorjanc, G., & Graves, S. (2012). Package 'car'. *Vienna: R Foundation for Statistical Computing*, 16(332), 333.
- Gao, H., Xie, W., Yang, C., Xu, J., Li, J., Wang, H., Chen, X., & Huang, C.-F. (2018). NRAMP2, a trans-Golgi network-localized manganese transporter, is required for Arabidopsis root growth under manganese deficiency. *New Phytologist*, 217(1), 179-193.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.14783>
- Gbogbo, F., & Otoo, S. D. (2015). The concentrations of five heavy metals in components of an economically important urban coastal wetland in Ghana: public health and phytoremediation implications. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(10), 655. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4880-0>
- Giudicianni, P., Pindozi, S., Grottola, C. M., Stanzione, F., Fagnano, S., Fagnano, M., Fiorentino, N., & Ragucci, R. (2017). Pyrolysis for exploitation of biomasses selected for soil phytoremediation: Characterization of gaseous and solid products [Article]. *Waste Management*, 61, 288-299. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.01.031>
- Gómez Gallego, T. M. (2019). *Regulation of copper transporters in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: effect on host plant copper homeostasis and development*. Universidad de Granada.
- González-Domínguez, R., García-Barrera, T., & Gómez-Ariza, J. L. (2014). Homeostasis of metals in the progression of Alzheimer's disease. *BioMetals*, 27(3), 539-549.
<https://doi.org/10.1007/s10534-014-9728-5>
- González León, M. Á., & Tapia Sanhueza, J. (2014). *Contaminación por cromo proveniente de procesos industriales en la parte alta de la comuna de Talca y su efecto en la calidad de aguas para consumo humano* Universidad de Talca (Chile). Escuela de Ingeniería Forestal].
- Grünhofer, P., Stöcker, T., Guo, Y., Li, R., Lin, J., Ranathunge, K., Schoof, H., & Schreiber, L. (2022). Populus × canescens root suberization in reaction to osmotic and salt stress is limited to the developing younger root tip region. *Physiologia Plantarum*, 174(5), e13765.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppl.13765>
- Guillén-Watson, A. V., Chacón-Cerdas, R., & Zúñiga-Vega, C. (2011). Detección del virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) y el virus latente común del ajo (GCLV) en ajo (Allium sativum L) costarricense. *Revista Tecnología en Marcha*, 24(4), ág. 47-ág. 47.
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1-11. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.366.1>
- Harris, A. E., Maharaj, G., Hallett, M., Thomas, R., Roopsind, A., O'Shea, B. J., & Bicknell, J. E. (2024). Variable shifts in bird and bat assemblages as a result of reduced-impact logging revealed after 10 years [Article]. *Journal of Applied Ecology*, 61(1), 145-159.
<https://doi.org/10.1111/1365-2664.14537>

- Heisi, H. D., Awosusi, A. A., Nkuna, R., & Matambo, T. S. (2023). Phytoextraction of anthropogenic heavy metal contamination of the Blesbokspruit wetland: Potential of wetland macrophytes. *Journal of Contaminant Hydrology*, 253, 104101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2022.104101>
- Horton, N. J., & Kleinman, K. (2015). *Using R and RStudio for data management, statistical analysis, and graphics*. CRC Press.
- Hothorn, T., Zeileis, A., Farebrother, R. W., Cummins, C., Millo, G., Mitchell, D., & Zeileis, M. A. (2015). Package 'lmtest'. *Testing linear regression models*. <https://cran.r-project.org/web/packages/lmtest/lmtest.pdf>. Accessed, 6.
- Hu, X., Yu, C., Shi, J., He, B., Wang, X., & Ma, Z. (2024). Biomineralization mechanism and remediation of Cu, Pb and Zn by indigenous ureolytic bacteria *B. intermedia* TSOB1 [Article]. *Journal of Cleaner Production*, 436, Article 140508. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.140508>
- Isayenkov, S. V., & Maathuis, F. J. (2008). The Arabidopsis thaliana aquaglyceroporin AtNIP7; 1 is a pathway for arsenite uptake. *Febs Letters*, 582(11), 1625-1628.
- Jakovljević, T., Radojčić Redovniković, I., Cvjetko, M., Bukovac, I., Sedak, M., Dokić, M., & Bilandžić, N. (2015). The potential of poplar (*Populus nigra* var. *italica*) in the phytoremediation of cadmium [Article]. *Sumarski List*, 139(5-6), 223-232. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84937596926&partnerID=40&md5=6cb249fe7c4c47f073fc8b24b5de0811>
- Javot, H., & Maurel, C. (2002). The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany*, 90(3), 301-313.
- Jiménez-Moleón, M., Jacobo-López, A., Amaya, A., Mota, M., Islas-Espinoza, M., & Contreras, A. (2015). FITORREMIEDIACIÓN DE METALES PESADOS. In (pp. 493-509).
- Jones, K. L., Drane, D., & Gowans, E. J. (2007). Long-term storage of DNA-free RNA for use in vaccine studies. *Biotechniques*, 43(5), 675-681.
- Kassambara, A. (2019). *Comparing groups: Numerical variables* (Vol. 192). Datanovia.
- LI-COR. LI-600 Porometer/Fluorometer for Broad Leaves. In. <https://www.licor.com/env/products/LI-600/LI-600PF>.
- Li, X., Pan, Y., Qi, X., Zhang, S., Zhi, C., Meng, H., & Cheng, Z. (2021). Effects of exogenous germanium and effective microorganisms on germanium accumulation and nutritional qualities of garlic (*Allium sativum* L.). *Scientia Horticulturae*, 283, 110114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110114>
- Lima, T. M., Soares, P. I., do Nascimento, L. A., Franco, D. L., Pereira, A. C., & Ferreira, L. F. (2021). A novel electrochemical sensor for simultaneous determination of cadmium and lead using graphite electrodes modified with poly(p-coumaric acid). *Microchemical Journal*, 168, 106406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106406>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Londoño-Franco, L. F., LONDOÑO-MUÑOZ, P. T., & MUÑOZ-GARCÍA, F. G. (2016). LOS RIESGOS DE LOS METALES PESADOS EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14, 145-153. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612016000200017&nrm=iso

- Lukić, M., Avdalović, J., Gojgić-Cvijović, G., Žerađanin, A., Mrazovac Kurilić, S., Ilić, M., Miletić, S., Vrvic, M. M., & Beškoski, V. (2024). Industrial-scale bioremediation of a hydrocarbon-contaminated aquifer's sediment at the location of a heating plant, Belgrade, Serbia. *Clean Technologies and Environmental Policy*. <https://doi.org/10.1007/s10098-023-02724-8>
- Maillard, A., Diquélou, S., Billard, V., Laîné, P., Garnica, M., Prudent, M., Garcia-Mina, J. M., Yvin, J. C., & Ourry, A. (2015). Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency [Article]. *Frontiers in Plant Science*, 6(MAY), 1-15, Article 317. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00317>
- Majeti, P., & Freitas, H. (2003). Metal hyperaccumulation in plants: Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology (ISSN: 0717-3458) Vol 6 Num 3, 6*. <https://doi.org/10.2225/vol6-issue3-fulltext-6>
- Mendarte-Alquisira, C., Alarcón, A., & Ferrera-Cerrato, R. (2021). Fitorremediación: Alternativa biotecnológica para recuperar suelos contaminados con DDT. Una revisión. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 24.
- Mohan, I., Joshi, B., Pathania, D., Dhar, S., & Bhau, B. S. (2024). Phytobial remediation advances and application of omics and artificial intelligence: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(26), 37988-38021. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33690-3>
- Navarro Aviñó, J. P., Aguilar Alonso, I., & López-Moya, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2), 1-17. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54016203> (IN FILE)
- Panda, S. K., & Choudhury, S. (2005). Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17.
- Pandey, V. C., Singh, J. S., Kumar, A., & Tewari, D. (2010). Accumulation of heavy metals by chickpea grown in fly ash treated soil: effect on antioxidants. *CLEAN—Soil, Air, Water*, 38(12), 1116-1123.
- Paredes Hernández, U. (2022). Comparación de la radiosensibilización inducida por siRNA transportado en nanopartículas orgánicas.
- Patel, M., Kumari, A., & Parida, A. K. (2020). Arsenic tolerance mechanisms in plants and potential role of arsenic hyperaccumulating plants for phytoremediation of arsenic-contaminated soil. *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives II: Mechanisms of Adaptation and Stress Amelioration*, 137-162.
- Pavel, V. L., Sobariu, D.-L., Fertu, I. D. T., Statescu, F., & Gavrilescu, M. (2013). Symbiosis in the environment biomanagement of soils contaminated with heavy metals. *Eur. J. Sci. Theol*, 9(4), 211.
- Paylar, B., Bezabhe, Y. H., Mangu, J. C. K., Thamke, V., Igwaran, A., Modig, C., Jass, J., & Olsson, P. E. (2023). Assessing organism differences in mixed metal sensitivity [Article]. *Science of the Total Environment*, 905, Article 167340. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167340>
- Peralta-Pérez, M. d. R., & Volke-Sepúlveda, T. (2012). La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 75-88.
- Pérez, C., Ronquillo, F., Sierra, G., & Salceda, E. (2014). Creación y uso de una ontología relacionada con genes, síndromes, síntomas y enfermedades para la clasificación de textos biomédicos. *Revista signos*, 47, 91-112.

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-09342014000100005&nrm=iso

- Pérez Palacios, P. (2015). Biotecnología ambiental: desarrollo de estrategias biotecnológicas para la biorremediación de metales pesados.
- Pinton, R., Tomasi, N., & Zanin, L. (2016). Molecular and physiological interactions of urea and nitrate uptake in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 11(1), e1076603. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1076603>
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 28(3), 142-149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>
- Ramanadane, K., Straub, M. S., Dutzler, R., & Manatschal, C. (2021). Structural and functional properties of a magnesium transporter of the SLC11/NRAMP family. *bioRxiv*, 2021.2010.2017.464711. <https://doi.org/10.1101/2021.10.17.464711>
- Ramírez, B. C., Zúñiga, L. A. G., Murrieta, M. S. V., Hernández, M. O. F., & DORANTES, A. R. (2018). ACCIÓN SINÉRGICA DEL ÁCIDO INDOL BUTÍRICO Y UNA RIZOBACTERIA, EN LA FITOEXTRACCIÓN ASISTIDA DE ARSÉNICO Y CADMIO POR *Sedum praealtum* A. DC. *POLIBOTÁNICA*(46), 203-220.
- Rangwala, S. H., Kuznetsov, A., Ananiev, V., Asztalos, A., Borodin, E., Evgeniev, V., Joukov, V., Lotov, V., Pannu, R., & Rudnev, D. (2021). Accessing NCBI data using the NCBI sequence viewer and genome data viewer (GDV). *Genome research*, 31(1), 159-169.
- Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, 180(2), 169-181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>
- Ray, S., Berry, S. P., Wilson, E. A., Zhang, C. H., Shekhar, M., Singharoy, A., & Gaudet, R. (2022). High-resolution structures map the metal import pathway in an Nramp transporter. *bioRxiv*, 2022.2009.2008.507188. <https://doi.org/10.1101/2022.09.08.507188>
- Ray, S., & Gaudet, R. (2023). Structures and coordination chemistry of transporters involved in manganese and iron homeostasis [Review]. *Biochemical Society Transactions*, 51(3), 897-923. <https://doi.org/10.1042/BST20210699>
- Reddy, G. N., & Prasad, M. (1990). Heavy metal-binding proteins/peptides: occurrence, structure, synthesis and functions. A review. *Environmental and Experimental Botany*, 30(3), 251-264.
- Richards, T. J., Karacic, A., Apuli, R.-P., Weih, M., Ingvarsson, P. K., & Rönnberg-Wästljung, A. C. (2020). Quantitative genetic architecture of adaptive phenology traits in the deciduous tree, *Populus trichocarpa* (Torr. and Gray). *Heredity*, 125(6), 449-458. <https://doi.org/10.1038/s41437-020-00363-z>
- Rodríguez-Serrano, M., Martínez-de la Casa, N., Romero-Puertas, M. C., Del Río, L., & Sandalio, L. (2008). Toxicidad del cadmio en plantas. *Ecosistemas*, 17(3).
- Ruttens, A., Boulet, J., Weyens, N., Smeets, K., Adriaensen, K., Meers, E., Van Slycken, S., Tack, F., Meiresonne, L., Thewys, T., Witters, N., Carleer, R., Dupae, J., & Vangronsveld, J. (2011). Short rotation coppice culture of willows and poplars as energy crops on metal contaminated agricultural soils. *Int J Phytoremediation*, 13 Suppl 1, 194-207. <https://doi.org/10.1080/15226514.2011.568543>

- Saed-Moucheshi, A., Shekoofa, A., & Pessaraki, M. (2014). Reactive Oxygen Species (ROS) Generation and Detoxifying in Plants. *Journal of Plant Nutrition*, 37(10), 1573-1585. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.868483>
- Salehi, A., Zalesny, R. S., & Calagari, M. (2023). Effects of urban wastewater application on growth, biomass, nutrition, and heavy-metal accumulation of *Populus nigra* L. "62/154," *P. alba* L. "20/45," *P. euramericana* (Dode) Guinier "92/40," and *Salix excelsa* S.G. Gmel grown in heavy-metal contaminated soil [Article]. *International Journal of Phytoremediation*, 25(10), 1371-1383. <https://doi.org/10.1080/15226514.2022.2158783>
- Salman, M. M., Kitchen, P., Yool, A. J., & Bill, R. M. (2022). Recent breakthroughs and future directions in drugging aquaporins. *Trends Pharmacol Sci*, 43(1), 30-42. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.10.009>
- Samara, T., Spanos, I., Platis, P., & Papachristou, T. G. (2020). Heavy metal retention by different forest species used for restoration of post-mining landscapes, N. Greece [Article]. *Sustainability (Switzerland)*, 12(11), Article 4453. <https://doi.org/10.3390/su12114453>
- Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Seregin, I., & Kozhevnikova, A. (2006). Physiological Role of Nickel and Its Toxic Effects on Higher Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53, 257-277. <https://doi.org/10.1134/S1021443706020178>
- Stephens, J. D., Rogers, W. L., Mason, C. M., Donovan, L. A., & Malmberg, R. L. (2015). Species tree estimation of diploid *Helianthus* (Asteraceae) using target enrichment. *American Journal of Botany*, 102(6), 910-920. <https://doi.org/https://doi.org/10.3732/ajb.1500031>
- Sultana, M., Pavlos, N., Ward, L., Walsh, J., & Rea, S. (2019). Targeted sequencing of DCSTAMP in familial Paget's disease of bone. *Bone Reports*, 10, 100198.
- Tan, Z., Li, J., Guan, J., Wang, C., Zhang, Z., & Shi, G. (2023). Genome-Wide Identification and Expression Analysis Reveals Roles of the NRAMP Gene Family in Iron/Cadmium Interactions in Peanut. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1713. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/2/1713>
- Tang, H., Finn, R. D., & Thomas, P. D. (2019). TreeGrafter: phylogenetic tree-based annotation of proteins with Gene Ontology terms and other annotations. *Bioinformatics*, 35(3), 518-520. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty625>
- Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International journal of chemical engineering*, 2011.
- Tuskan, G. A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R. R., Bhalerao, R. P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., . . . Rokhsar, D. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313(5793), 1596-1604. <https://doi.org/10.1126/science.1128691>

- Ureña Robles, R. (2007). *Metalotioneínas en peces y gasterópodos: su aplicación en la evaluación de la contaminación*. Universitat de València.
- Wang, W.-H., Köhler, B., Cao, F.-Q., & Liu, L.-H. (2008). Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science*, 175(4), 467-477.
- Wang, X., Sato, T., Xing, B., & Tao, S. (2005). Health risks of heavy metals to the general public in Tianjin, China via consumption of vegetables and fish. *Sci Total Environ*, 350(1-3), 28-37. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.09.044>
- Wang, Z. B., Wang, Y. F., Zhao, J. J., Ma, L., Wang, Y. J., Zhang, X., Nie, Y. T., Guo, Y. P., Mei, L. X., & Zhao, Z. Y. (2018). Effects of GeO₂ on chlorophyll fluorescence and antioxidant enzymes in apple leaves under strong light [Article]. *Photosynthetica*, 56(4), 1081-1092. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0807-7>
- Wen, J., Zhou, J., Zhang, R., Ren, W., Zhao, J., & Cai, D. (2024). Current advances of the valorization technologies for heavy metal containing hyperaccumulators [Review]. *Industrial Crops and Products*, 209, Article 118051. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118051>
- Wiche, O., Székely, B., Moschner, C., & Heilmeier, H. (2018). Germanium in the soil-plant system—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(32), 31938-31956. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3172-y>
- Wickham, H., Bryan, J., Kalicinski, M., Valery, K., Leitiene, C., Colbert, B., Hoerl, D., Miller, E., & Bryan, M. J. (2019). Package 'readxl'. *Version*, 13, 1.
- Wickham, H., François, R., Henry, L., & Müller, K. (2022). RStudio.(2021). dplyr: A grammar of data manipulation (1.0. 7)[Computer software]. *Website* <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr> (accessed on 21 February 2019).
- Wilson, M. C., Mutka, A. M., Hummel, A. W., Berry, J., Chauhan, R. D., Vijayaraghavan, A., Taylor, N. J., Voytas, D. F., Chitwood, D. H., & Bart, R. S. (2017). Gene expression atlas for the food security crop cassava. *New Phytologist*, 213(4), 1632-1641.
- Wolfsberg, T. G. (2010). Using the NCBI map viewer to browse genomic sequence data. *Current protocols in bioinformatics*, 29(1), 1.5. 1-1.5. 25.
- Yang, J., Guo, Y., Hu, J., Bao, Z., & Wang, M. (2023). A metallothionein gene from hard clam *Meretrix meretrix*: Sequence features, expression patterns, and metal tolerance activities [Article]. *Developmental and Comparative Immunology*, 149, Article 105057. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2023.105057>
- Yang, Y., Zheng, J., Liang, Y., Wang, X., Li, K., Chen, L., Aduragbemi, A., Han, Y., Sun, Z., Li, H., & Hou, S. (2023). Natural Resistance-Associated Macrophage Protein (Nramp) Family in Foxtail Millet (*Setaria italica*): Characterization, Expression Analysis and Relationship with Metal Content under Cd Stress [Article]. *Agronomy*, 13(8), Article 2000. <https://doi.org/10.3390/agronomy13082000>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zhang, Z., Zhang, Q., Cui, H., Li, Y., Xu, N., Lu, T., Chen, J., Penuelas, J., Hu, B., & Qian, H. (2022). Composition identification and functional verification of bacterial community in disease-suppressive soils by machine learning. *Environ Microbiol*, 24(8), 3405-3419. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15902>

Zheng, J., Yang, L., Deng, Y., Zhang, C., Zhang, Y., Xiong, S., Ding, C., Zhao, J., Liao, C., & Gong, D. (2020). A review of public and environmental consequences of organic germanium. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(13), 1384-1409. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1661175>

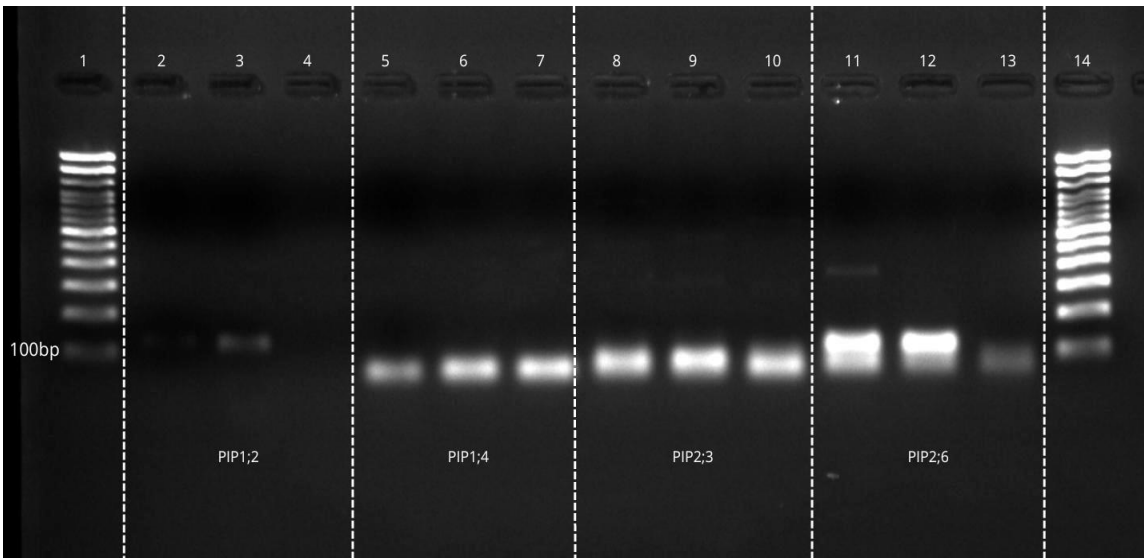
VIII. APÉNDICE

Apéndice 1. Lista de genes de referencia a partir de *P. trichocarpa* para búsqueda y aplicación en *P. nigra*. (GENBANK: GCA_951802175.1). La columna en amarillo destaca el la denominación del gen seleccionado para especificar la copia del gen implicada.

		REFERENCIA LOC P. trichov4	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	LARGO DE PRODUCTO(s) DE PCR	REFERENCIA GENBANK(Ra ngo) en P. trichov4
Acuaporina NIPs	>NIP1;2	LOC7470188	GTTCAAATTC ACGGCCACC G	TGGTAGCTG AGATAGCCG GA	60	GenBank: OX637678.1 (17565101..17 565328)
	>NIP5;1	LOC7455006	AAGCACAGA TGGAAGCCG AT	CTCTACGCC ACTTCCCTT GG	72	NC_037295.2 (17504728..17 509764, complement)
	>NIP7;1	LOC7475954	GGACCATGG AAAATGGCC AAA	GGTGCTCAC GTTAATCCT GC	88	NC_037294.2 (3588364..358 9237)
Acuaporina PIPs	>PIP1;2	LOC7490340	CTGGGAGCT AACAGGTTT	AGTTCGCCT GGCTCAAAC AA	77	NC_037294.2 (18719788..18 721358)
	>PIP1;4	LOC7466057	ACCAAGCAT CTCGTACTG GC	TAGGAGCAA TATGCGGAG CC	65	NC_037300.2 (11697590..11 699293, complement)
	>PIP2;3	LOC7486477	GTGGATGTG GACTTGTGA AAGC	CATTGGCTC CACCACCAT AG	66	NC_037300.2 (7227026..722 8617)
	>PIP2;6	LOC18100192	AGCCAATGA ACTTGCTACT GGA	CAGTAGCAG AGAAGACAG TGTAGA	79	NC_037290.2 (10371936..10 373421, complement)
Acuaporina TIPs	>TIP1;1	LOC18100128	CGTCCGTAA GTTTGGCGA AG	TCAGAAACA TCGCGGTAG GC	75	NC_037290.2 (9658654..965 9939)
	>TIP2;2	LOC7478410	CAGCAAGAT AGGCTTTGA GAGAG	AGAATAGCC TTTGGTCGC TT	64	NC_037287.2 (7439171..744 0842, complement)
Heavy metal associated transporter. HMAs	>HMA2	LOC18096797	GGATGGCTG TTTTCGGGA CT	GGCTCGGCA CTTGCAATA GA	79	NC_037287.2 (4752474..475 3802, complement)
	>HMA5	LOC7465853	TCAGTTCATC ATAGGCCGT GC	GGAGAACCG TTCCTCAA GC	69	NC_037287.2 (14524468..14 530013)
Metalotioneínas MT-Ls	>MT2-L;1	LOC7485706	CCTCCGCAG CAAGACATTT TC	TGAGTTGAG TGCATTCAG TTTC	79	NC_037285.2 (25746637..25 747927)
Natural resistance	>NRAMP2	LOC7472676	GCAGCCAAC AAGCCAATA CC	TCGAGGAGA AGTACGGTG GA	60	NC_037286.2 (9179410..918

associated protein.						2872, complement)
NRAMPs	>NRAMP3;1	LOC18101156	TCGACCACA ATAAGAAAG GCCA	CAAGGGCAG CAGTTGACT CTA	72	NC_037291.2 (4926926..4930438)
Fitoquelatina sintasa PCSs	>PCS1;1	LOC7490385	GACCTTACC CTGCCCGTT AC	TCAACGGAA GAGGCATCA GC	80	NC_037294.2 (19358972..19360917)

Apéndice 2. Gel de agarosa al 2% con amplificación inespecífica para los cebadores moleculares correspondientes a genes de acuaporinas PIP propuestas para análisis.



Apéndice 3. Curvas de *melting* para la qPCR de TIP2;2 en esta imagen podemos observar la diferencia de temperatura para desnaturalizar fragmentos y sus respectivas fluorescencias, las cuales nos permiten deducir que hay más fragmentos siendo amplificados que los que se esperaron para los partidores ya seleccionados luego de la etapa de PCR de punto final.

