

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO
NARRO**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

**PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



Evaluación de Técnicas de Extracción de ARN para la
Determinación de la Expresión del Gen ACC oxidasa en
Dasyilirion cedrosanum Trel.

TESIS

Presentado por:

JUAN LÓPEZ TRUJILLO

Como Requisito Parcial para Obtener el Título de:
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila, México. Junio de 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Evaluación de técnicas de extracción de ARN para la determinación de la
expresión del gen ACC oxidasa en *Dasyliirion cedrosanum* Trel.**

Presentado por:

JUAN LÓPEZ TRUJILLO

T E S I S

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

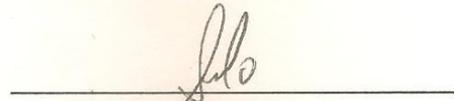
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

COMITÉ ASESOR

Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Asesor principal



M.C. Erika Nohemí Rivas Martínez
Asesor



Dra. Susana Gonzales Morales
Asesor



Dr. Ramiro López Trujillo

Coordinador de la división de Ciencia Animal.



Saltillo, Coahuila, México, Junio 2014.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Evaluación de técnicas de extracción de ARN para la determinación de la
expresión del gen ACC oxidasa en *Dasyliirion cedrosanum* Trel.**

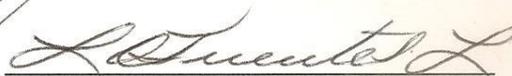
Presentado por:
JUAN LÓPEZ TRUJILLO

T E S I S

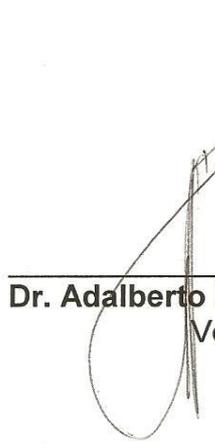
Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

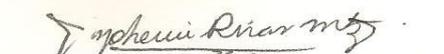
JURADO EXAMINADOR



Lic. Laura Olivia Fuentes Lara
Presidente



Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Vocal



M.C. Erika Nohemí Rivas Martínez
Vocal



Dra. Susana González Morales
Vocal

Saltillo, Coahuila, México, Junio 2014

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por darme las fuerzas necesarias para lograr mi meta y que sin Él nada hubiera sido posible.

A mi Alma Terra Mater:

Muchas gracias a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por cobijarme bajo su amplia experiencia en la preparación de personas de excelente valor académico, y por rodearme de profesores y amigos de alto valor humanístico.

A mis padres y hermanos:

Mis más sinceros agradecimientos por brindarme el apoyo incondicional en todo momento ya que sin sus palabras motivacionales nada hubiera sido tan fácil.

Al departamento de Horticultura:

Gracias por sus profesores que me brindaron los conocimientos necesarios y por las instalaciones y material facilitados para llevar a cabo este trabajo. A mis asesores Dr. Adalberto, Dra. Susy, y a la M.C Erika por brindarme la oportunidad para llevar a cabo esta tesis. Gracias!

A mis amigos:

Adalilia, Isela, Dulce Maleni, Idalia, Rosa María, Sandy, Analí, Lulú, Yadira, Ángeles Carrera, Fredy, Erika, Lucky, Chayo, Rosaura, Eddy Alberto, Soraida, entre otros. Que más que amigos, son la familia que hicieron ameno cada momento de mi vida y de mi estancia en la universidad. A todos ustedes. ¡Muchas Gracias!

DEDICATORIA

A mis padres:

Dedico orgullosamente y con mucho afecto este trabajo de Tesis a mis padres: Antonio López López y María Trujillo Cruz, que gracias al entusiasmo y esfuerzo que me brindaron desde mis primeros días de estudiante hasta alcanzar el nivel profesional, hicieron posible un sueño que hoy comparto gustosamente con ellos. Porque nunca me dejaron naufragar sólo en los momentos difíciles de ésta etapa de mi vida. Cada obstáculo superado y cada meta alcanzada fue gracias a ustedes.

A mis hermanos:

A Marisol y Teresa, que siempre estuvieron en la mejor disposición de apoyarme en todo momento y que han sido una plataforma importante en el desarrollo de mis estudios profesionales. Gracias por los momentos alegres y especiales, así como las motivaciones personales que me impulsaron a terminar la carrera. Gracias a Dios por tenerlas como hermanitas. A Domi, Rey, Oti, María del Carmen, Lupe, Graciela por los consejos sabios que han hecho de mí una mejor persona, y que han compartido conmigo buena parte de su vida, y esos momentos se llevan para siempre en los recuerdos. Gracias por el cariño de todos.

A mi abuelita:

A mi abuelita Graciela por sus oraciones y bendiciones en todo momento. Por sus consejos que siempre van encaminadas a formar personas de bien y porque siempre me enseñó a ver las cosas por mí mismo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS-----	i
DEDICATORIA-----	ii
ÍNDICE DE CONTENIDOS-----	iii
ÍNDICE DE CUADROS-----	v
ÍNDICE DE FIGURAS-----	vi
RESUMEN-----	1
Capítulo 1.- INTRODUCCIÓN-----	2
1.1 INTRODUCCIÓN-----	3
Capítulo 2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS-----	6
2.1 JUSTIFICACIÓN-----	7
2.2 OBJETIVO GENERAL-----	7
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	7
Capítulo 3.- ANTECEDENTES-----	8
3. ANTECEDENTES-----	9
3.1 Taxonomía y distribución-----	9
3.2 Filogenia-----	10
3.2.1 Árbol Filogenético-----	11
3.3 Plantas hermafroditas-----	13
3.4 Dioecia-----	14
3.5 La importancia de las fitohormonas en la diferenciación sexual de las planas-----	15
3.6 Tipos de factores determinantes para el sexo en las plantas-----	16
3.6.1 Cromosomas o genes ligados al sexo-----	16
3.6.2 Marcadores moleculares para estambres y pistilos-----	17
3.6.3 Fitohormonas-----	17
3.7 Etileno-----	18

3.7.1 Funciones del etileno en las plantas-----	19
3.7.2 Efectos fisiológicos del etileno-----	19
3.7.3 La senescencia-----	20
3.7.4 Síntesis de Etileno. El papel de la ACC Oxidasa y ACC Sintasa-----	20
3.8 Técnicas para determinar fitohormonas-----	21
3.8.1 Cromatografía de gases-----	21
3.8.2 Cromatografía de gases acoplada a masas-----	22
3.8.3 Cromatografía de Líquidos (HPLC)-----	23
3.8.4 Determinación enzimática de la enzima ACC oxidasa y ACC sintasa---	24
3.8.5 Técnica de PCR-TR-----	25
3.8.6 Cuantificación de la expresión del gen de la ACC oxidasa por PCR-TR	26
Capítulo 4.- MATERIALES Y MÉTODOS-----	28
4. METODOLOGÍA-----	29
4.1 Obtención y Almacenamiento de la Muestra-----	29
4.2 Extracción de ARN-----	29
4.2.1 Método de Trizol-----	29
4.2.2 Método de Trizol Modificado (con citrato)-----	30
4.2.3 Técnica de CTAB-LiCl-----	31
4.3 Cuantificación de ARN-----	31
4.3.1 Calidad de ARN-----	32
4.4 Síntesis de c-ADN-----	33
4.5 Diseño de Primers o Iniciadores-----	34
4.5.1 Parámetros para el diseño de primers para la expresión de genes-----	35
4.5.2 Preparación del primer-----	36
4.6 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)-----	37
4.6.1 Master mix-----	37
6.2 Condiciones para la PCR-----	38
4.7 Electroforesis horizontal de agarosa al 3%-----	39
Capítulo 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	40

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	41
5.1 Métodos de Extracción de ARN -----	41
5.1.1 Método de Trizol Modificado-----	41
5.1.2 Técnica de CTAB-LiCl y Trizol Modificado-----	44
5.2 Evaluación del acoplamiento de primers con el cADN -----	46
5.3 Evaluación del barrido de temperaturas para el acoplamiento de primers con el cADN -----	47
Capítulo 6.- CONCLUSIONES -----	50
6. CONCLUSIONES -----	51
Capítulo 7.- PERSPECTIVAS -----	52
7. PERSPECTIVAS -----	53
Capítulo 8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	54
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	55
ANEXOS -----	61
ANEXO 1-----	62
ANEXO 2-----	66
ANEXO 3-----	68

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
CUADRO 1. Descripción botánica de <i>D. cedrosanum</i> -----	10
CUADRO 2. Cuantificación de ARN y Proteínas-----	32
CUADRO 3. Calidad de ARN-----	32
CUADRO 4. Reactivos para una segunda reacción de c-DNA-----	33
CUADRO 5. Condiciones de la mezcla de reactivos para segunda reacción de c-DNA en el termociclador-----	34
CUADRO 6. Primers con temperaturas óptimas-----	37
CUADRO 7. Reactivos para la Preparación del Master Mix-----	37
CUADRO 8. Condiciones de PCR para síntesis de ARN-----	38
CUADRO 9. Condiciones de PCR para síntesis de ARN con temperaturas reales empleadas-----	38
CUADRO 10. Tipo de muestra y temperaturas usadas para pruebas de primers de barrido de temperaturas-----	39
CUADRO 11. Extracción de RNA con técnica de Trizol modificado (con citrato)-----	43

CUADRO 12. Extracción de ARN con dos técnicas (Técnica de CTAB-LiCl y Trizol Modificado)-----	45
CUADRO 13. Evaluación del acoplamiento de primers al cDNA con las temperaturas óptimas reportadas para cada primer-----	47
CUADRO 14. Evaluación de barrido de temperaturas en primers-----	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Fragmento amplificado del árbol filogenético del <i>D. cedrosanum</i>	11
FIGURA 2. Análisis de distancia por el método de neighbor-joining, empleando las distancias obtenidas con el modelo de dos parámetros de Kimura (1981) para 118 monocotiledóneas y 16 especies de paleohierbas como grupo externo-----	12
FIGURA 3. Planta monoica (<i>Zea mays</i>). Posee inflorescencias masculinas y femeninas en la misma planta-----	14
FIGURA 4. Dioecia en la planta de papaya (<i>Carica papaya</i>). Pie masculino (A), Pie femenino (B)-----	15
FIGURA 5. Estructura del etileno con su doble enlace-----	19
FIGURA 6. Transformación de la S-adenosil-metionina en ACC mediante la actividad enzimática de la ACC sintasa debido a varios tipos de estrés-----	21
FIGURA 7. Portal de la página web de Base de datos de genes-----	34
FIGURA 8. Gel de agarosa de extracción de ARN por Método del Trizol modificado. Pozos 1 y 3 (piña), 2 y 4 (hoja)-----	41
FIGURA 9. Gel de agarosa de extracción de ARN por 2 métodos (Método de Trizol y Trizol Modificado). Pozos del 1 al 12 (muestras liofilizadas), de éstos, del 1 al 6 (hojas), del 7 al 12 (piñas). Pozos del 13 al 20 (muestras frescas), de éstos del 13 al 16 (hojas), y del 17 al 20 (piñas)-----	42
FIGURA 10. Corridas de electroforesis con gel de agarosa para extracción de ARN (<i>D. cedrosanum</i>) por dos Técnicas. Pozo 1 y 2 (Técnica de CTAB-LiCl) con hoja y piña respectivamente. Pozos del 3 al 15 (Técnica de Trizol Modificado). Pozos del 3 al 8 (hojas), del 9 al 15 (piñas)-----	45
FIGURA 11. Gel de electroforesis para evaluación de acoplamiento de primers con el cADN-----	46
FIGURA 12. Barrido de temperaturas para evaluar el acoplamiento de primers con el cADN-----	48

RESUMEN

Dasyilirion cedrosanum es una planta dioica de importancia comercial debido que a partir de ella se obtiene una bebida alcohólica con denominación “Sotol”, actividad por la cual se han utilizado de manera desmedida las plantas encontradas en regiones naturales provocando un desequilibrio poblacional entre machos y hembras de esta especie. Con el objetivo de dar una solución a este problema, se planteó determinar los niveles de etileno en plantas machos y hembras, cuantificación de etileno una de las fitohormonas menos estudiadas relacionadas con la diferenciación sexual en plantas. Sin embargo, uno de los problemas para la cuantificación del etileno es la toma de muestra para el posterior análisis por técnicas cromatográficas. Debido a lo anterior, este trabajo se enfoca en la cuantificación indirecta de etileno por medio de la expresión de la enzima ACC oxidasa. Se evaluaron dos técnicas de extracción de ARN (técnica de TRIZOL con y sin modificaciones y la técnica CTAB-LiCl) a partir de tejido de hoja y piña de *Dasyilirion cedrosanum* y fueron diseñados 5 primers con base a las secuencias de ARNm de diferentes plantas (*Asparagus officinalis*, *Arabidopsis thaliana*, *Dasyilirion* spp., y *Saccharum officinarum*). Los resultados muestran que la mejor técnica para la extracción de ARN a partir de tejidos de *D. cedrosanum* fue la de Trizol, siendo añadido este a la muestra fresca antes de llevar a cabo la maceración de la misma con nitrógeno líquido. En el caso de los primers, solo el que fue diseñado a partir de la secuencia de *Dasyilirion* (gen endógeno 18 S ribosomal) logró amplificar con el ADNc de *D. cedrosanum*, por lo que fue imposible evaluar la expresión del gen de ACC oxidasa. Sin embargo, con el establecimiento de la técnica para la extracción de ARN a partir de tejidos de *D. cedrosanum* se puede llevar a cabo un posterior análisis del transcriptoma de esta planta y con ello conseguir la síntesis adecuada de un primer específico para el gen de ACC oxidasa.

Palabras clave: Dioica, Etileno, ARN, ACC oxidasa, *Dasyilirion*.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

Se cree que las plantas con flores evolucionaron de un antepasado común hermafrodita, y que a partir de este antepasado se llevó a cabo la evolución hasta la aparición del carácter dioico y monoico. A pesar de que la mayoría de las plantas con flores son hermafroditas (75%), en éstas se ha favorecido una amplia gama de atributos sexuales, particularmente relacionados con el movimiento de gametos entre individuos (fecundación cruzada) (Abarca *et al.*, 2010).

Dasyllirion cedrosanum es una planta que pertenece a la familia *Asparagaceae* (Zárate, 2003) cuya distribución en México comprende la región norte del altiplano en altitudes que oscilan entre los 1000-2000 msnm (Robles *et al.*, 2008). Su característica reproductiva es del tipo dioico, con presencia de flores pistiladas y estaminadas, lo cual hace que la reproducción cruzada sea obligada (Sató, 1935). Reyes *et al.*, 2012 señalan que desde la germinación hasta la primera floración, transcurren de 12 a 15 años, lo cual hace difícil la determinación temprana del sexo en estas plantas. Por otra parte, Bogler, 1994 reporta que una vez que la planta tiene la madurez suficiente ya es más perceptible esta característica, es decir, que ambos sexos cuentan con un escape donde se encuentran los estambres en los machos o los pistilos en las hembras. Uno de los usos que se le da a especie es el uso de la piña para la producción de una bebida alcohólica con denominación "Sotol", siendo utilizadas de manera indistinta plantas tanto machos como hembras de áreas naturales, las cuales son extraídas por los productores de esta bebida artesanal. Por esta actividad es que en algunas áreas naturales con sotol se ha perdido las proporciones adecuadas entre machos y hembras para obtener una reproducción efectiva, y con ello, la posibilidad de reforestar el área.

Una de las formas en que se puede ayudar a reforestar es mediante la implementación de viveros, sin embargo, es necesario conocer el sexo de la planta y las proporciones entre macho y hembras adecuadas para una fertilización efectiva. La literatura menciona que existen 3 factores involucrados en la diferenciación sexual en plantas: Cromosomas o genes ligados al sexo, marcadores macromoleculares para estambres y pistilos, y compuestos señalizadores (fitohormonas) (Cubero, 2003; Azofeifa, 2006; Harvey *et al.*,

1997). Sin embargo, a la fecha se ignora cuál de estos es el mecanismo que interviene en la determinación del sexo en el género *Dasyllirion* (Tanurdzic *et al.*, 2004); no obstante, conforme a lo indicado por algunos autores se ha observado que ciertas fitohormonas juegan un papel importante en la diferenciación sexual en las plantas dioicas (Louis *et al.*, 1990). Dentro de las fitohormonas relacionadas con la diferenciación sexual en plantas se encuentran las giberelinas y citocininas que juegan un papel importante en la inducción de la masculinización y feminización de las flores, respectivamente (Menéndez, 2012). Aunque es importante mencionar, que éste no es un comportamiento generalizado en las plantas, ya que existen algunas otras fitohormonas que también participan en la diferenciación sexual, como lo son: las auxinas, el ácido abscísico y el etileno (García, 2012). De estas hormonas, el etileno es la molécula con mayor complejidad de cuantificar debido a que su rápida volatilidad dificulta la toma de muestra y posterior cuantificación por técnicas cromatográficas.

Con base en lo anterior, el presente trabajo se enfocó en la evaluación de 2 técnicas de extracción de ARN con y sin modificaciones con la finalidad de obtener material genético para determinar la expresión del gen de la enzima ACC oxidasa (enzima responsable de la conversión del ácido 1-aminociclopropano carboxílico en Etileno) como un indicador indirecto de los niveles de etileno en la planta. Dentro de la metodología realizada se llevó a cabo la evaluación de la técnica de TRIZOL con y sin modificaciones, así como, la Técnica de CTAB-LiCl a partir de tejido de hoja y piña de *Dasyllirion cedrosanum*. El material genético obtenido se destinó a la determinación de la expresión del gen de ACC oxidasa, para lo cual se diseñaron 5 primers a partir de la secuencia de ARNm de diferentes plantas (*Asparagus officinalis*, *Arabidopsis thaliana*, *Dasyllirion* spp., y *Saccharum officinarum*). Los resultados obtenidos mostraron que la técnica con la que se logró obtener una buena extracción de ARN fue la de Trizol, siendo añadido este a la muestra fresca antes de llevar a cabo la maceración de la misma con nitrógeno líquido para la extracción del material genético. En el caso de los primers, solo el que fue diseñado a partir de la secuencia de *Dasyllirion* (gen endógeno 18 S ribosomal) logró amplificar con el ADNc de *D. cedrosanum*, es por ello que fue imposible evaluar la expresión del gen de ACC oxidasa en los tejidos de la planta de

sotol. Sin embargo, con el establecimiento de la técnica para la extracción de ARN a partir de tejidos de *D. cedrosanum* se puede llevar a cabo la obtención de material genético para un posterior análisis del transcriptoma de esta planta y con ello conseguir la síntesis adecuada de un primer específico que lleve a cabo la evaluación de la expresión del gen de ACC oxidasa, obteniendo así una herramienta fiable para la medición indirecta de los niveles de etileno.

Capítulo 2

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

El papel del etileno en la diferenciación sexual de las plantas ha sido poco estudiado, habiendo escasas técnicas totalmente estandarizadas para su determinación sobre ensayos *in vivo*, lo cual conduce a que esta hormona se deje de lado a comparación de otras.

Por lo anterior, el actual trabajo de tesis se enfocará en estandarizar una técnica de extracción de ARN para el posterior desarrollo de un primer empleado para la cuantificación de la expresión del gen de la ACC oxidasa (enzima responsable del último paso en el proceso de la formación del etileno) como técnica alternativa para la cuantificación de etileno.

2.2 OBJETIVO GENERAL

- Establecer una técnica de extracción de ARN a partir de hoja y piña de *Dasyllirion cedrosanum*, y evaluar la expresión genética de la enzima ACC oxidasa en estos tejidos mediante el uso de diferentes primers diseñados a partir de la secuencia RNAm de diferentes plantas.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar una técnica para la extracción del ARN a partir de tejidos de hojas y piña de *D. cedrosanum*.
- Diseñar uno o más iniciadores específicos (primers) para analizar la expresión de la enzima ACC oxidasa mediante la(s) secuencia(s) del gen de ACC oxidasa de *Dasyllirion cedrosanum* u otras especies vegetales relacionadas.
- Cuantificar la expresión del gen de ACC oxidasa en tejido de hoja y piña de *D. cedrosanum* por PCR-TR.

Capítulo 3

ANTECEDENTES

3. ANTECEDENTES

El sotol (*Dasyllirion cedrosanum*) que significa, lirio grueso y succulento, es una planta nativa del Desierto Chihuahuense, la cual se desarrolla en diversos tipos de terreno, preferentemente en lomeríos de suelos someros y bien drenados, en donde convive con una gran variedad de formas de vida; es una planta muy rústica y componente del matorral desértico rosetófilo, aunque ocasionalmente forma parte del matorral desértico micrófilo (Reyes *et al.*, 2012; Coutiño, 2003). Se han hecho investigaciones sobre su distribución geográfica, taxonómica, y algunos aspectos generales como tipo de planta (perenne), policárpica, semicilíndrica y dioica (existen plantas hembras y plantas machos) y en cierta medida sobre su fermentación alcohólica y contenido de azúcares (Requena *et al.*, 2007; Reyes *et al.*, 2012).

3.1 Taxonomía y Distribución

El sotol pertenece al género *Dasyllirion*, de la familia *Agavaceae* (Henrickson *et al.*, 1977). Este género comprende alrededor de 14 a 18 especies y se distribuye en el suroeste de los Estados Unidos y México (Henrickson *et al.*, 1977; Bogler, 1994).

De acuerdo a Bogler, 1994, en México existen 14 especies de este género las cuales son: *Dasyllirion ecotrichum*; *D. glaucophyllum* (estado de México.); *D. graminifolium*; *D. inermis* (San Luis Potosí); *D. leiophyllum* (Chihuahua y oeste de Coahuila); *D. longissimum*, (México); *D. miquihuanense* (Tamaulipas); *D. parrianum* (San Luis Potosí); *D. serratifolium* (sureste de México); *D. simplex* (Durango, México); *D. texanum* (norte de Coahuila); *D. texanum* var. *Avernas* (México); *D. wheeleri* (Sonora, Chihuahua y Durango); *D. cedrosanum* (centro y sur de Coahuila); *D. heteroteca* (norte de Coahuila). Las especies reportadas para Coahuila son cinco: *Dasyllirion texanum*, *D. cedrosanum*, *D. leiophyllum*, *D. stewartii* con las variedades *D. stewartii* var. *stewartii*; *D. stewartii* var. *glaucum* y *D. heterocanthum* (Henrickson *et al.*, 1977; Bogler, 1994). El sotol *Dasyllirion cedrosanum* es una planta de tamaño medio a robusto con un tallo principal y en ocasiones dos a tres tallos secundarios,

hojas regulares y extendidas, glaucas de color gris pálido a verde pálido, de 80 a 100 cm de largo, y de 2 a 3.5 cm de ancho, ascendiendo rectamente y deflexionando con la edad, plano encima, rotundamente quillado abajo, márgenes finamente denticulados, los dientes regularmente curvados hacia la punta, de 3 a 4 mm de largo, amarillo pálido a rojizo (Reyes *et al.*, 2012; Robles *et al.*, 2008) Su apariencia puede ser la de palmeras altas, o de hierbas con grandes inflorescencias de sólidas y finas flores (Coutiño, 2003) y al contrario de lo que ocurre con un grupo de especies del género *Agave*, las plantas de sotol continúan vivas después de la floración, la cual ocurre un número indeterminado de veces durante el ciclo de vida (Reyes *et al.*, 2012). Esta especie se desarrolla en pastizales y matorrales desérticos rosetófilos del centro y sur del estado de Coahuila, y matorral crasirosulifolio espinoso, tipo de vegetación característicos del área biogeográfica conocida como Desierto Chihuahuense, en altitudes de 1000 a 2000 msnm (Henrickson *et al.*, 1977; Zárate, 2003), aunque también se encuentra en regiones semiáridas de las zonas de transición (Vázquez, 2001).

El sotol es una planta nativa del desierto Chihuahuense conocido por los productores por su importancia para la alimentación del ganado y para la producción de una bebida típica de la región. El género de ésta planta fue descrito por primera vez por Joseph Gerhard Zuccarini (Cuadro 1).

CUADRO 1 Descripción botánica de *D. cedrosanum*

Phila	Spermatophyta
División	Anthophyta
Clase	Angiosperma
Subclase	Monocotiledónea
Familia	Nolináceae
Género	Dasyilirion
Nombre común	Sotol

Fuente: www.sotol.com

3.2 Filogenia

El primer árbol usado para representar las relaciones entre organismos vivos fue, probablemente, el árbol botánico o árbol genealógico de las plantas (Spivak, 2006). En los términos más generales, un árbol filogenético es una representación esquemática de entidades biológicas que están conectadas por

descendencia común, pueden ser especies o grupos taxonómicos mayores (Gregory, 2008).

Hoy en día, la mayoría de árboles filogenéticos se crean a partir de datos moleculares ya sea ADN, ARN o proteínas. Se tiende a usar ADN cuando se analizan especies cercanamente emparentadas, porque proveen mayor información (las cadenas de ADN son más largas que las cadenas de aminoácidos); mientras que las secuencias de aminoácidos son usados para análisis filogenéticos de especies más lejanamente emparentadas (Simmons, 2002).

Se han realizados estudios monográficos del género *Dasyllirion*, donde se reconocen 16 especies, incluyendo cuatro nuevas. El análisis del ADN de los cloroplastos (cpADN) indica que las especies de *Dasyllirion* del sur de México son basales dentro del género (Reyes, 2002). Se estudiaron las filogenias tanto del *Dasyllirion* como el de las *Agaváceas*, mediante comparaciones del cpADN y secuencias de la región ITS del rADN; los resultados indican que *Dasyllirion*, *Nolina*, *Beaucarnea* y *Calibanus* se encuentran en un grupo que está más cercano a *Maianthemum*, *Polygonatum*, *Liriope*, *Dracaena* y *Sansevieria*, que a *Yucca* y *Agave* (Bogler, 1994).

3.2.1 Árbol Filogenético

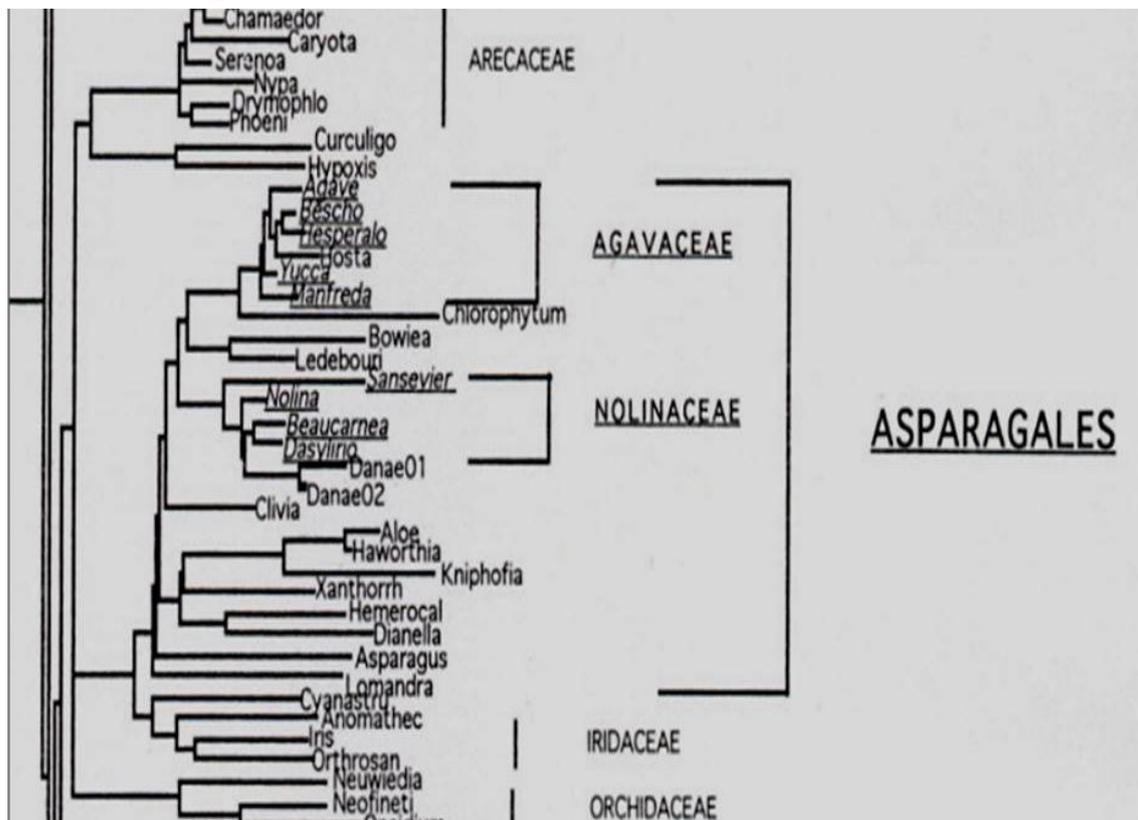


FIGURA 1 Fragmento amplificado del árbol filogenético del *D. cedrosanum* 11

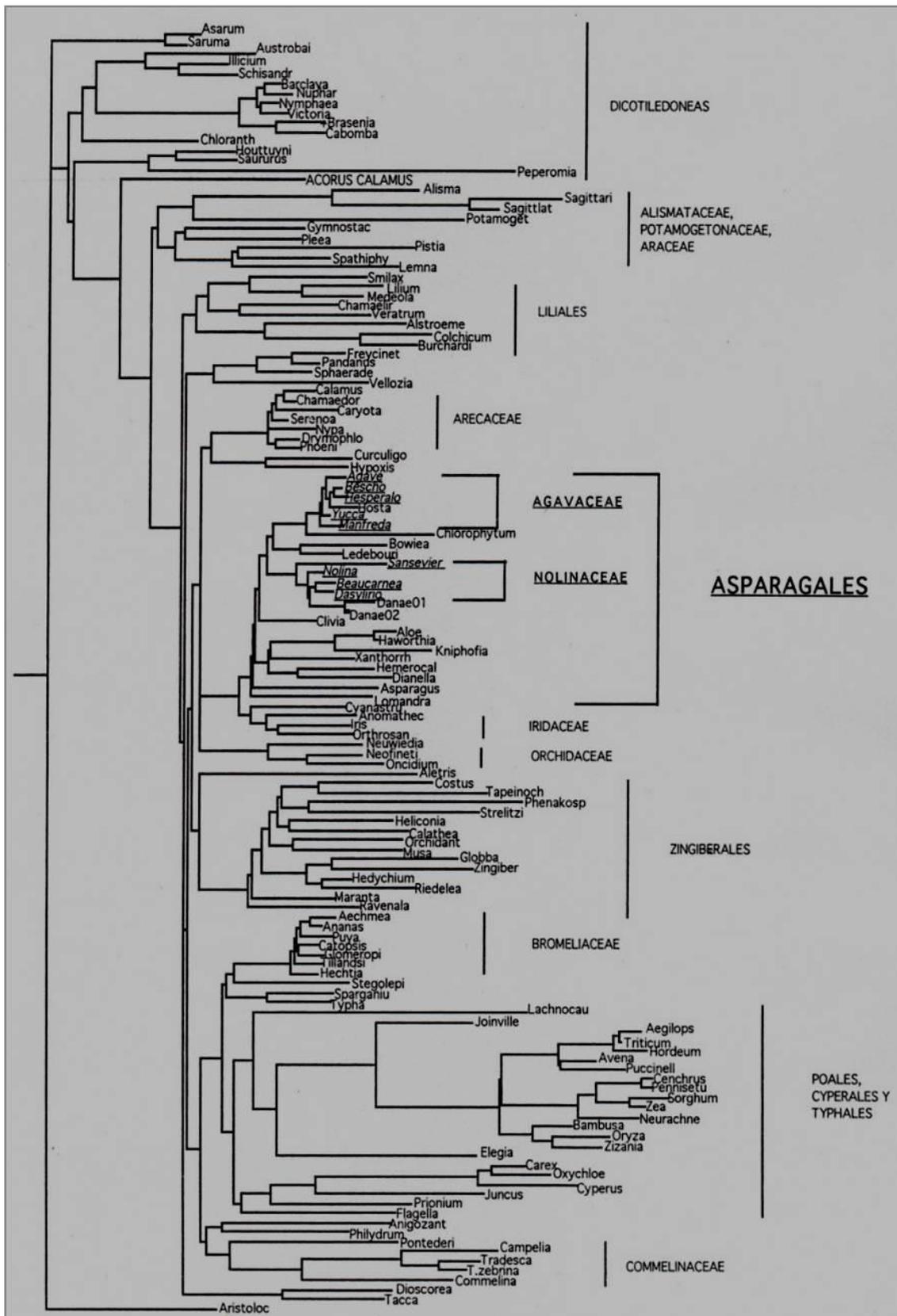


FIGURA 2 Análisis de distancia por el método de neighbor-joining, empleando las distancias obtenidas con el modelo de dos parámetros de Kimura (1981) para 118 monocotiledóneas y 16 especies de paleohierbas como grupo externo.

Fuente: Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren (Asparagales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae *sensu* Hutchinson dentro de las

3.3. Plantas hermafroditas

Las flores en las Angiospermas presentan una gran diversidad de tamaño, formas y colores y cumplen la función de promover la reproducción sexual. La mayoría de las plantas presentan flores hermafroditas, es decir, que portan órganos femeninos y masculinos (Richards, 1997). Si bien la presencia del gineceo y estambres en una misma flor predomina, existen presiones selectivas que tienden a modificar la distribución de los órganos sexuales de tal patrón hermafrodita (Richards, 1997). Esta divergencia se explicaría principalmente como una estrategia para evitar la depresión por endogamia, al fomentar la fecundación de los óvulos con polen proveniente de otros individuos. De este modo, incluso en plantas con flores hermafroditas, la presentación del polen y del estigma puede presentar separación espacial (hercogamia) o temporal (dicogamia), disminuyendo la probabilidad de autofecundación y promoviendo la polinización cruzada (Pacheco *et al.*, 2006).

Para la mayoría de las plantas, los organismos responsables del proceso de polinización son los insectos (Proctor *et al.*, 1996). El grado de dependencia de los polinizadores para la reproducción dependerá en parte de la distribución de sexos de la especie, siendo de mayor importancia en especies que presenten separación espacial o temporal en los órganos femeninos y masculinos (Pacheco *et al.*, 2006).

Sin embargo existen otras plantas en el que la separación de órganos sexuales no se da como tal en diferentes individuos (Figura 3) como es el caso del maíz (*Zea mays*), sino que dentro de una misma planta están los dos sexos (Weberling *et al.*, 1987).

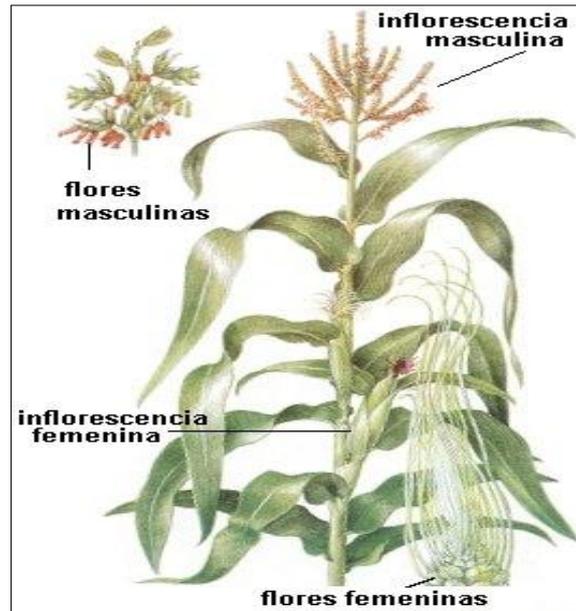


FIGURA 3 Planta monoica (*Zea mays*). Posee inflorescencias masculinas y femeninas en la misma planta.

Fuente: www.biologia.edu.ar/botanica

3.4. Dioecia

Dentro del reino vegetal, la separación de sexos ha surgido a lo largo de la evolución en más de 100 ocasiones diferentes (Charlesworth, 2002). Con cada nuevo evento, filogenéticamente independiente, surge un nuevo sistema de reproducción que puede ser similar o completamente distinto a los anteriores, por ello en las plantas no hay un mecanismo general que explique el dioicismo (Iglesias *et al.*, 2012).

A menudo está asociada con plantas de gran tamaño y polinización abiótica, pero, es rara en plantas con flores grandes, especializadas, con morfología compleja (Iglesias *et al.*, 2012).

Existen muchas plantas que presentan esta característica de dioecia, como por ejemplo: el mamón, sauce, palma datilera, maíz, papaya, entre otras, solo por mencionar algunas (Figura 4).



FIGURA 4 Dioecia en la planta de papaya (*Carica papaya*). Pie masculino (A), Pie femenino (B)

Fuente: <http://www.biologia.edu.ar>

3.5. La importancia de las fitohormonas en la diferenciación sexual de las plantas

Las fitohormonas del crecimiento con frecuencia tienen funciones decisivas en muchos procesos del crecimiento. El estudio de estas sustancias ha sido un impulso importante para entender los procesos de desarrollo vegetal (Pimienta *et al.*, 2006).

En estudios desarrollados anteriormente se han establecido los parámetros que indican que las hormonas presentes en las plantas tienen un cierto grado de influencia en la determinación sexual de éstas. Algunos ejemplos de estas hormonas son: *giberelinas*, *citocininas*, *ácido abscísico*, *auxinas* y *etileno*.

En el caso de las giberelinas se sabe que a pesar de conocerse un número bastante amplio en plantas, solo unas pocas demuestran actividad biológica. Según lo reportado por Yu *et al.*, en 2004, esta fitohormona induce la formación de elementos florales y adicionalmente pueden afectar la determinación sexual al actuar sobre genes del tipo AGL20, LEAFY, AP1, AP3 y AG, los cuales conducen a que sea posible modificar la estructura floral y conducir a la producción de flores masculinas o femeninas.

En cuanto a las auxinas promueven el alargamiento celular pero inhiben la diferenciación, mientras que las citocininas estimulan la división mediante la cual se producen nuevas células y pueden también evitar el envejecimiento celular (Calva *et al.*, 2005).

Otro compuesto fitorregulador, presente en las plantas es el ácido abscísico, Xiong *et al*, 2003 mencionaron que esta fitohormona regula muchos aspectos del crecimiento y el desarrollo de las plantas, incluyendo la maduración de los embriones, la dormancia de las semillas, la senescencia, las respuestas celulares a estrés abiótico y el cierre estomático.

El etileno estimula la maduración principalmente de frutos, el ácido abscísico inhibe la acción de las auxinas, giberelinas y citocininas operando como sistema de defensa natural contra efectos de estrés fisiológicos (Aitchison *et al.*, 1977; Street, 1977; Calva *et al.*, 2005).

Todos los compuestos mencionados anteriormente aplican para plantas monoicas y dioicas. La diferenciación sexual para el grupo de plantas conocidas como dioicas, es un proceso que favorece la alogamia, mediante la separación física de los gametos masculinos y femeninos (Simpson *et al.*, 1999; Rangel *et al.*, 2010).

De acuerdo a las diferentes especies, las plantas pueden tener tres posibles opciones: una es que la especie tenga los dos sexos en individuos separados (dioicas), que mantenga los dos sexos en flores del mismo individuo (monoicas), o que tengan una combinación de ambos (Tanurdzic *et al.*, 2004).

Pero los responsables de que esto sea posible se deben a varios factores que van desde los niveles de nutrimentos disponibles en el medio, hasta las condiciones climatológicas del medio ambiente imperante, que están involucrados durante el proceso de desarrollo de la planta. Sin embargo existe otro grupo de factores que son considerados los responsables directos de estas diferenciaciones.

3.6 Tipos de factores determinantes para el sexo en las plantas

3.6.1 Cromosomas o genes ligados al sexo

Existen varios factores que involucran las determinaciones sexuales tanto en plantas como en animales: criptica, génica, cromosómica (haploidiploidia) y cromosomas especiales (sexuales). Este último constituye la forma más común en organismos con distintos fenotipos sexuales como mamíferos, aves e insectos. También existen en plantas aunque son muy poco frecuentes y se

restringen a las plantas dioicas (*Bryonia dioica*, *Cannabis sativa*, *Humus lupulus*). Las especies dioicas generalmente tienen cromosomas sexuales. Las bases genéticas de la determinación del sexo no son las mismas en todos los organismos. El sistema de determinación cromosómica del sexo, más simple y difundido tanto en plantas como en seres humanos es XX-XY, donde (XX-hembra y XY-macho) (Ferreira *et al.*, 2005).

3.6.2 Marcadores moleculares para estambres y pistilos

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético (Gómez, 2012). Para Valadez *et al.*, en 2000 un marcador se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía. Se distinguen dos tipos: las proteínas (*Isoenzimas*) y los marcadores de ADN (Azofeifa, 2006; Cubero, 2003) y se mencionan a continuación:

- a) Isoenzimas
- b) Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)
- c) Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD)
- d) Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP)
- e) Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR)
- f) Amplificación Aleatoria del Polimorfismo de Microsatélites (RAMPO)

3.6.3 Fitohormonas

Las hormonas juegan un papel de gran importancia en la regulación del sexo de las plantas. En general, el etileno, la citocininas y las auxinas promueven feminización, mientras que las giberelinas producen masculinización. Se ha demostrado que el etileno controla el aborto del desarrollo de estambres en melón y pepino por medio de *CmACS7* y *CsACS2*, dos genes que se expresan específicamente en los carpelos de las flores femeninas (Martínez, 2013). Por otra parte se ha comprobado experimentalmente que el etileno promueve feminización en plantas de

calabazas (*Cucurbita pepo*), en contraste con el efecto de masculinización que promueve en otras plantas, por ejemplo, en la sandía (*Citrullus lanatus*) (Rudich, 1990).

Para el caso de las auxinas, Trebitsh *et al.*, 1997 trabajó con el gen CS-ACS1 del pepino, en el que la secuencia genómica se amplificó del DNA genómico por PCR para cuantificar la influencia de esta fitohormona y el etileno en la determinación sexual de esta planta. La muestra fue inducida por auxinas y por ACC, sin embargo observaron que la presencia de altas concentraciones de estos compuestos generaba una floración tardía en la planta, pero mejoraban considerablemente la producción de flores pistiladas, reduciendo la de producción de flores masculinos.

Otra hormona relacionada con la diferenciación sexual es el ácido abscísico (ABA), el cual se ha observado que es un mediador entre la percepción del estrés y la promoción de la respuesta a través de la inducción de otras fitohormonas, por lo que juega un papel crucial en la regulación de las respuestas de las plantas frente a los factores ambientales (Montoliu, 2010). Existen reportes que indican que la acumulación ABA en cítricos bajo condiciones de estrés hídrico está asociado al incremento en el contenido de ACC. La inhibición de la síntesis de ABA reduce la acumulación de ACC, la producción de etileno y la abscisión foliar en cítricos sometidos a estrés hídrico y posterior rehidratación (Gómez *et al.*, 1996).

Haciendo hincapié en la funcionalidad del etileno en la planta, es una hormona difícil de cuantificar aún por diferentes metodologías. Esto es debido a que es una molécula altamente volátil, simple y pequeña presente en angiospermas y gimnospermas aunque también en bacterias y hongos, que es capaz de moverse rápidamente por los tejidos por difusión. (Jordán *et al.*, 2006).

3.7 Etileno

Es el hidrocarburo insaturado más simple que existe dentro del grupo de los alquenos (Figura 5). Regula diversas rutas metabólicas y los procesos de desarrollo en las plantas. La historia de su descubrimiento como una molécula de señal u hormona de la planta fue descrito por Abeles *et al.*, en 1992.

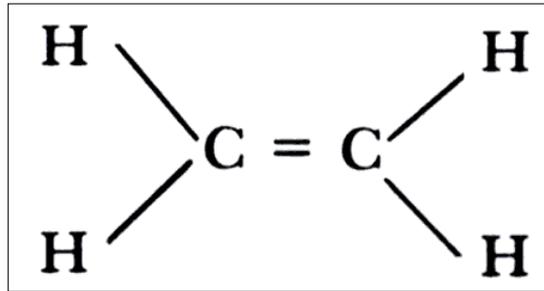


FIGURA 5 Estructura del etileno con su doble enlace.

Fuente: <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx>

3.7.1 Funciones del etileno en las plantas

La participación del etileno como regulador del envejecimiento, la maduración de los frutos y la respuesta a patógenos es bien conocida (Barrera *et al.*, 2012). El etileno fue una de las fitohormonas descubiertas a finales del siglo XX, periodo en el que se documentó que el gas producido de emanaciones durante la extracción de la hulla causaba envejecimiento prematuro y abscisión de las hojas de las plantas (Abeles *et al.*, 1992). Posteriormente se demostró que las plantas lo producen de manera natural, estableciéndose de esta manera que el etileno es un regulador endógeno del crecimiento y desarrollo vegetal, incluso como posible factor en la diferenciación sexual de las plantas (Schaller *et al.*, 2002).

El hecho de ser un gas a temperatura y presión ambientes le confiere unas características peculiares, como la capacidad de difundir libremente entre los espacios intercelulares, la de coordinar una respuesta rápida y uniforme en los tejidos, y además, la posibilidad de alterar su concentración interna simplemente modulando la velocidad de síntesis del gas, sin la participación de un sistema metabólico adicional para reducir la concentración de la hormona libre (Azcón *et al.*, 2000).

3.7.2 Efectos fisiológicos del etileno

En resumen se puede mencionar que sus principales efectos en las plantas radican en los siguientes puntos:

- La maduración de los frutos.

- La abscisión.
- Estimula la senescencia floral y foliar.
- Epinastía en hojas.
- La expresión sexual. Induce feminidad floral en plantas dioicas.
- Rompe la latencia.
- Estimula el crecimiento y la diferenciación en tallos y raíces (triple respuesta).
- Induce formación de raíces adventicias (Giovannoni, 2001; Jordán *et al.*, 2006)

3.7.3 La senescencia

Es el conjunto de procesos metabólicos que preceden a la muerte de una célula. Es un periodo que abarca desde la madurez de una parte u órgano de la planta hasta su muerte (Santamarina *et al.*, 2004).

- Está caracterizado por procesos degradativos, fundamentalmente de: la clorofila, proteínas celulares, ARN, etc.
- Se ha demostrado que la producción de etileno se incrementa durante la senescencia y que la aplicación exógena del mismo también la induce.

3.7.4. Síntesis de Etileno. El papel de la ACC Oxidasa y ACC Sintasa

El C_2H_4 se genera en los órganos de las plantas superiores, la tasa de producción depende del tipo de tejido y de su estadio de desarrollo. En general las regiones meristemáticas, nodales y las frutas durante su maduración, son las regiones más activas en la biosíntesis (Bradford, 2008; Márquez, 2009).

El etileno C_2H_4 se biosintetiza a partir del aminoácido metionina (Liebermann, 1979), exactamente a partir de los carbonos 3 y 4 (Abeles *et al.*, 1992), por acción de la enzima Adenosil Metionina Sintasa (Ado-Met sintasa) generando S-Adenosil Metionina (S-Ado-Met), con requerimiento de ATP, el S-Ado-Met es el precursor de ácido amino ciclo propano carboxílico (ACC), la etapa limitante en la ruta es la conversión de S-Ado-Met a ACC, catalizado por la ACC-Sintasa (Bradford *et al.*, 1980) . El grupo tiometilo (CH_3-S) de la

metionina, es reciclado a través del “Ciclo de Yang” por medio de la vía de 5-metiltoadenosina, llegando nuevamente hasta metionina; esta vía cíclica involucra el consumo de energía (ATP) y de (O_2). La última etapa de la vía formadora de C_2H_4 , la cataliza la enzima oxidasa (ACC-oxidasa) que requiere de O_2 como sustrato y oxida el ACC para reducir C_2H_4 , CO_2 y ácido cianhídrico (HCN) (Wang *et al.*, 2002), el cual es detoxificado a cianoalanina por la cianoalanina sintasa para prevenir su acumulación tóxica. Cuando se tiene una concentración alta de ACC como control natural de la producción de C_2H_4 , se produce una malonilación del ACC generando el N-Malonil-ACC, el cual es precursor de otros metabolitos secundarios (Cervantes, 2002; Kevin *et al.*, 2002).

Como ya se mencionó anteriormente que la transformación de SAM (S-adenosil-metionina) en ACC la cataliza la ACC sintasa, esta enzima es inducida por varios tipos de estrés, incluyendo inundación, lesiones o por herbicidas auxínicos (Figura 6). La ACC sintasa se vuelve más activa o más enzima es producida en respuesta a esos estreses (Bradford *et al.*, 1980).

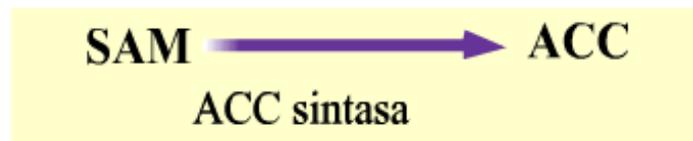


FIGURA 6 Transformación de la S-adenosil-metionina en ACC mediante la actividad enzimática de la ACC sintasa debido a varios tipos de estrés.

Dado que el etileno es una hormona gaseosa, su cuantificación se torna un poco difícil con métodos analíticos. Por lo que se han desarrollado nuevas técnicas para poder determinarlos. A continuación se mencionan algunas de las más importantes:

3.8 Técnicas para determinar fitohormonas

3.8.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gas es una técnica muy útil para la separación y determinación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles que sean térmicamente estables.

Se han hecho trabajos al respecto en donde se ha utilizado cromatografía de gases para la cuantificación de la producción de etileno. Bautista *et al.*, 2005 evaluaron por medio de cromatografía la intensidad respiratoria y la producción de etileno en la maduración de chicozapote (*Manilkara sapota*).

Existe otro trabajo enfocado en este mismo aspecto, pero esta vez se evaluaron los daños por frío en zapote mamey (*Pouteria sapota* Jacq.) cambios en volátiles, firmeza y azúcares totales (Alia *et al.*, 2005).

Por medio de esta técnica se ha cuantificado este mismo gas (etileno) en *Annona muricata* L. cv. Elita, y su relación con la tasa respiratoria durante la etapa de poscosecha (Márquez, 2009).

Greef *et al.*, 1976 utilizando materiales vegetales emplearon cromatografía gaseosa para encontrar el límite mínimo de detección de etileno, encontrando para las condiciones de experimentación aplicadas, límites de detección entre 0,1 y 0,01 ppb de manera reproducible, siendo este el método comúnmente usado para determinar C₂ H₄ en productos biológicos por ser seguro y sensible.

Otros estudios con respecto al empleo de cromatografía gaseosa en la determinación de etileno lo llevó a cabo Murayama en 1998, quién estudió la influencia de la producción de etileno sobre algunos cambios en la pared celular y la firmeza de dos cultivares de pera *Pyrus communis* L. (cv. Marguerite marillet y cv. La france), encontrando que la máxima producción de etileno para el cv. Margarita marillet fue de 4 µl•kg⁻¹•h⁻¹ y para el cv. La france fue de 12 µl•kg⁻¹•h⁻¹, para ambos cv., la firmeza presentó disminución continua durante toda la etapa de poscosecha, siendo los frutos del cv., La france fueron los que mostraron mayor ablandamiento.

3.8.2. Cromatografía de gases acoplada a masas

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) es la herramienta más empleada y poderosa para el análisis de una amplia variedad de moléculas, por exactitud, sensibilidad y reproducibilidad, así como por la posibilidad de convertir moléculas no volátiles en volátiles por medio de la aplicación de reactivos que permiten la metilación o silación de las moléculas de interés.

Se han publicado muchas técnicas para la determinación del ACC. El Método más antiguo se basa en la conversión oxidativa del ACC extraída del etileno después seguido de un análisis por cromatografía de gases. Actualmente ya existen métodos directos para la cuantificación de este precursor del etileno. Smets *et al.*, 2002 utilizando 100 g de muestras de tejido vegetal fresco de *Brassica napus* y *Arabidopsis thaliana* extrajeron y analizaron el ACC utilizando Bromuro de Pentafluorobenzyl (PFBB_r), el cual permite la detección sensible de éste ácido a través de cromatografía de gases acoplada a masas en modo de ionización química negativa. La combinación de ésta técnica más un método de purificación de alta eficiencia se pudo determinar con éxito las relaciones entre el desarrollo de la planta y sus niveles de ACC o etileno de las mismas durante sus etapas específicas fenotípicas.

En otro artículo de investigación se reporta el efecto de la baja regulación de la biosíntesis de etileno en el complejo sabor de la manzana (Dandekar *et al.*, 2004). Este autor estudió la capacidad de las manzanas transgénicas para sintetizar el etileno endógeno y su papel en la regulación del azúcar, ácidos orgánicos, textura y componentes volátiles. Trabajando con frutos de plantas de manzana silenciadas para cualquiera de las enzimas de ACC sintasa o ACC oxidasa, demostró que existe una reducción de la producción de etileno autolítico. De modo que llegó a la conclusión que tanto los azúcares o los ácidos orgánicos no están controlados directamente por la cantidad de etileno presente en la fruta, es más los resultados indican que el etileno regula diferencialmente componentes de calidad de la misma y la disponibilidad de estos manzanos transgénicos proporciona un recurso único para definir el papel del etileno y de otros factores que regulan el desarrollo de los frutos.

3.8.3. Cromatografía de líquidos (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada (Valls *et al.*, 1998; Azaña *et al.*, 2007). Como resultado, la técnica es ampliamente utilizada en el análisis de medicamentos, proteínas,

carbohidratos, compuestos fenólicos, antibióticos y metabolitos secundarios de plantas entre otros (Gutiérrez, 2012).

En trabajos reportados recientemente se han llevado a cabo la medición de la actividad del precursor del etileno, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) empleando este método (HPLC) y en cromatografía de gases vinculado a espectrometría de masas. En dicho método se empleó de 100-200 mg de peso fresco de material fresco para determinar la actividad de ACC en las raíces del maíz (*Zea mays* L.), las hojas jóvenes de pepino (*Cucumis sativus* L.) y las plántulas aeróbicas y anaeróbicas de la planta del arroz (*Pisum sativum* L.). En ello se observa que el procedimiento por HPLC es más rápido y más seguro que un método GC-MS existente y más específicas y confiables que los ensayos indirectos ampliamente en uso (Hall *et al.*, 1989).

En 2000 Petritis *et al.*, analizaron simultáneamente por cromatografía líquida acoplada espectrometría de masas por pulverización iónica la actividad de la ACC no derivado y su análogo estructural ácido ciclopropano-1,1 dicarboxílico (ACD) en el tejido de la manzana Golden Delicious (*Malus domestica*). Emplearon un total de 100 g de muestra fresca para su trabajo de investigación. Observaron a través del método empleado (LC-MS) que ciertas proteínas como el ácido glutámico y la Treonina mostraban ciertas interferencias durante el análisis con la señal de la ACC, por lo que se tuvieron que separar por el método cromatográfico adecuado. Finalmente consiguieron detectar con éxito la actividad de este precursor del etileno en el jugo de la manzana después de un tratamiento previo antes de su análisis (Petritis *et al.*, 2000).

3.8.4. Determinación enzimática de la enzima ACC oxidasa y ACC sintasa

Otras de las metodologías utilizadas para la cuantificación de etileno de una manera indirecta es la medición de la actividad de la enzima ACC sintasa que es la encargada de conversión del S-adenosil-L-metionina (SAM) en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) que es el precursor del etileno, el cual se convierte en el etileno mediante una reacción de oxidación catalizada por la ACC oxidasa (Bhowmik *et al.*, 2004; Mathooko *et al.*, 2004). La literatura reporta que esta técnica ha sido empleada para la medición de las actividades

in vitro de ACC oxidasa en extractos de proteínas obtenidos de hojas de tomate que se prepararon de acuerdo a metodología propuesta por Madhaiyan *et al.*, 2007 y Petruzzelli *et al.*, 2000.

Esta metodología ha sido empleada para cuantificar la actividad de la ACO en extractos de tejidos de plantas como lo son: *Asparagus officinalis* L. (Bhowmik *et al.*, 2004), *Prunus persica* L. (Mathooko *et al.*, 2004), *Mangifera indica* (Tovar *et al.*, 2001), *Cucurbita máxima* (Hyodo *et al.*, 1993), *Diospyros kaki* (Caqui) (Zheng *et al.*, 2005).

3.8.5. Técnica de PCR – TR

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR (polymerase chain reaction), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son la existencia de nucleótidos en el medio (adenina, timina, citosina y guanina) debido a que son la materia base para fabricar el ADN, y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer").

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos. Por otra parte para solventar el problema de la cuantificación se han generado unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa o PCR en tiempo real.

3.8.6. Cuantificación de la expresión del gen de la ACC oxidasa por PCR-TR

Se han hecho varios trabajos que indican que la actividad de la ACC oxidasa está involucrado con la producción de etileno en las plantas con frutos. Por ejemplo; Rodríguez *et al.*, en 2011 midieron la producción de etileno y CO₂ en la Pitaya (*Stenocereus stellatus (Pfeiff.) Riccob.*); así como, el aislamiento parcial del gen de la ACC oxidasa de esta especie, y finalmente, lograron cuantificar la expresión del gen durante la maduración del fruto mediante la técnica de PCR-TR. La evaluación por PCR se llevó a cabo utilizando los cebadores de ACC oxidasa y 100 ng de ADN total extraído de plántulas de pitaya. La secuencia fue comparada en el sitio del NCBI (Blast) mostrando una alta identidad con genes de ACC oxidasas de otras plantas reportadas previamente. Al término de la investigación se detectó que la expresión del gen de la ACC oxidasa ocurre durante la maduración del fruto (Rodríguez *et al.*, 2011).

En 2004, Bhowmik *et al.*, midieron el cambio en la actividad y expresión de la ACC oxidasa en espárrago en respuesta a la síntesis de etileno inducido en esta planta. Para el ensayo de la ACO, se realizó de acuerdo con el método descrito por Fernández-Maculet & Yang, 1992. Emplearon 2 g de material congelado y para la extracción del ARN empleando el método de borato caliente reportado por Wan & Wilkins, 1994. En el experimento observaron que la síntesis de etileno es variable a lo largo de la planta, dentro de los resultados más destacables se observó que la parte donde se había practicado una escisión la tasa de producción de etileno fue de 2 a 6 veces más elevado que en la parte inferior de la planta, para ello llevaron a cabo un análisis de secuencia de homologías utilizaron la información disponible en GenBank y el software de la base de datos EMBL.

Otro autor, Yim *et al.*, en 2013 cuantificó mediante PCR la emisión de etileno producido por la bacteria *Methylobacterium sp.* en plantas de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. Para llevar a cabo su investigación inocularon la cepa de la bacteria antes mencionada y fueron evaluando el efecto de dicha inoculación en el comportamiento del crecimiento y desarrollo de la planta después del trasplante de la misma. Para medir la actividad de la ACO in vitro por medio de la metodología reportada por Madhaiyan *et al.*, 2007 y

Petruzzelli *et al.*, 2000 se empleó una pequeña cantidad de muestra congelada. Una vez llevado a cabo el análisis por PCR, los resultados indicaron que la acumulación de ACC y ACO (precursores del etileno) en las hojas del tomate que fueron inoculadas con *Methylobacterium sp.* presentaron una reducción significativa. Con lo anterior se confirmó que la actividad de esta bacteria aumenta la actividad de las enzimas de defensa en la planta de tomate mediante la modulación de la ruta de biosíntesis del etileno.

Capítulo 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4 METODOLOGÍA

4.1 Obtención y Almacenamiento de la Muestra

Las muestras empleadas para esta tesis, se obtuvieron dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Dichas muestras consistieron en obtener tejidos de hoja y piña de *Dasyllirion cedrosanum*. Estas se extrajeron de plantas jóvenes.

Se cortaron trozos pequeños de la hoja del sotol, así como de la piña y se introdujeron en nitrógeno líquido con el fin de evitar que el ARN se degrade. Ya en el laboratorio se metieron en frascos perfectamente cerrados y se almacenaron en el ultracongelador (-80 °C).

4.2 Extracción de ARN

4.2.1. Método de Trizol

El tejido congelado o liofilizado fue macerado con nitrógeno líquido, posteriormente se pesaron 100 mg (tejido congelado) ó 20 mg (tejido liofilizado) en un tubo de 2 ml, e inmediatamente se agregó 1 ml de TRI reagent (Sigma-Aldrich). Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente hasta que se obtuvo un aspecto lechoso, luego se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo de 2 ml nuevo. Se agregaron 500 µl de isopropanol frío y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla de ARN con 1 ml de etanol al 70% frío agitándolo haciendo inversiones del tubo. Se centrifugó a 7,500 g por 5 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla aprox. 15 min a temperatura ambiente. Después de los 15 minutos se habían formado gotitas de etanol, por lo que se removieron con papel. Entonces la pastilla de ARN se re-suspendió con 50 µl de agua DEPC. (*Metodología reportada por Sigma Aldrich*). **Nota.** Si no se disuelve la pastilla calentar el tubo a 60°C por 10-15 min. Finalmente se

alícuotó la solución de ARN en 3 tubos de 0.6 ml (15 µl, 15 µl, 20 µl). El ARN se almacenó a -80°C (si es a temperatura menor se DEGRADA) (*Metodología reportada por Sigma Aldrich*).

4.2.2. Método de Trizol Modificado (con citrato)

Siguiendo el método tradicional del Trizol, también se hicieron pruebas con Citrato de Sodio agregándose éste después de agregar el Trizol a la muestra y después de recuperar el sobrenadante una vez llevado a cabo el centrifugado tal como se describe en el método. El tejido congelado o liofilizado se maceró con nitrógeno líquido, posteriormente se pesaron 100 mg (tejido fresco) ó 20 mg (tejido liofilizado) en un tubo de 2 ml, e inmediatamente se agregaron 1 ml de TRI reagent. Posteriormente a las muestras se les agregó 250 µl de Citrato de Sodio 0.8 M. Se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitaron vigorosamente hasta tener un aspecto lechoso, la mezcla se incubaron 15 min a temperatura ambiente. Después la mezcla se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C. Luego se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo de 2 ml nuevo. Posteriormente se agregó 250 µl de Citrato de Sodio y se agitó. Se agregaron después 500 µl de isopropanol frío y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugaron a 12,000 g por 10 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla de ARN con 1 ml de etanol al 70% frío agitando haciendo inversiones del tubo. Se centrifugó a 7,500 g por 5 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla aprox. 15 min a temperatura ambiente. Después de los 15 minutos se habían formado gotitas de etanol, por lo que se removieron con papel. Entonces la pastilla de ARN se re-suspendió con 50 µl de agua DEPC. **Nota.** Si no se disuelve la pastilla calentar el tubo a 60°C por 10-15 min. Finalmente se alícuotó la solución de ARN en 3 tubos de 0.6 ml (15 µl, 15 µl, 20 µl). El ARN se almacenó a -80°C (si es a temperatura menor se DEGRADA) (*Metodología reportada por Sigma Aldrich*).

4.2.3. Técnica de CTAB-LiCl

Se tomaron 100 mg de muestra (peso fresco) se maceró en un mortero con nitrógeno líquido y se transfirió en microtubos de 2 ml con 600 µl de buffer de extracción 1 (ver anexo 2). La muestra se agitó brevemente y se incubó durante 15 min a 65 °C. Después de esta incubación se agregó 600 µl de buffer de extracción 2 y 600 µl de cloroformo-alcohol isoamilo 24:1 v/v (CIA) y se agitó vigorosamente con la mano (incubar 5 min a temperatura ambiente). La mezcla se centrifugó a 12000g durante 10 min a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo de 2 ml y se añadió un volumen CIA y las fases se separaron por centrifugación a 12000 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante acuoso fue transferido a un microtubo de 2 ml y se le agregó 1 volumen de CIA y las fases fueron separadas por centrifugación a a 12,000g por 10 min a 4°C, El sobrenadante acuoso fue transferido a un tubo de 2mL y se añadió un ¼ de volumen de una solución de 10M de LiCl

El RNA se dejó precipitar toda la noche a 4 °C. Al día siguiente la mezcla se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4 °C y el sedimento se lavó dos veces con etanol frío al 70%, se dejó secar durante 10 minutos y luego el ARN fue disuelto en 50 µl con agua DEPC.

4.3. Cuantificación de ARN

Para cuantificar el ARN se utilizó el espectrofotómetro en el método de ARN, se midió un blanco (agua milli Q) y posteriormente las muestras. Para medir la muestra se agregaron 2 µl de muestra y 198 µl de agua milli Q, se tomaron los datos de Absorbancia a una longitud de onda de 260 y 280, y el valor R.

El ARN es un material susceptible a la degradación debido a la acción de las ribonucleasas. En general, se obtiene muy poca cantidad, por lo que cuantificarlo implica perder una parte apreciable del mismo si no se trabaja de forma adecuada la muestra. En la toma de datos (Cuadro 2), los espectrofotómetros convencionales utilizan grandes volúmenes de muestra y aunque es posible realizar una dilución, se compromete la concentración que

en ocasiones puede llegar a no ser detectable. Para ello se hace un cuadro como el siguiente:

CUADRO 2 Cuantificación de ARN y Proteínas

Muestra	A 260	A 280	R	Ug/ml	Ug totales (50 μ l)
Código de la muestra			$=A260/A280$	$=(A260)(100)(50)$)	$=(Ug/ml)(0.05)$

4.3.1. Calidad del ARN

Para verificar la calidad de los resultados de extracción de ARN por los métodos mencionados anteriormente se llevaron a cabo una secuencia de tres pasos, las cuales consisten en los siguientes:

Preparación del gel. Se preparó un gel de agarosa al 1.3% de la siguiente manera: Se pesaron 0.52 g de agarosa y se le agregó a un vaso de precipitado con 25 ml de agua DEPC, una vez que se disolvió la agarosa (mezcla transparente), se agregaron 8 ml de MOPS y 7 ml de formaldehído, e inmediatamente se agregó la mezcla en el portagel junto con el peine (cuidando que no quedaran burbujas). Se dejó solidificar (30 minutos).

Preparación del ARN para correr el gel. En tubos de 0.6 ml se prepararon las muestras, como se muestran en el Cuadro 3:

Para medir la calidad del ARN se hizo mediante una electroforesis desnaturalizante. Para llevara a cabo esta electroforesis se necesitaron los valores de cuantificación del ARN para realizar los cálculos de las muestras. Para ello se elaboró un cuadro como el que se presenta a continuación:

CUADRO 3 Calidad de ARN

Muestra	UI de muestra (2 ug)	UI de agua DEPC	UI de buffer loading (buffer de carga)
	No debe de pasar de 5 ul	Utilizar en caso que se requiera aforar la muestra a 5 ul	Siempre son 5 ul
	En total 5 ul		

Ya que se tuvo en cada tubo la muestra, el agua o el buffer loading se incubaron a 60°C por 10 min, inmediatamente después se pasaron a 4°C para enfriarse. Una vez que el gel se solidificó, se sumergió en la cámara de electroforesis para ARN y se agregó solución MOPS 1X a la cámara hasta la marca, posteriormente se quitó con cuidado el peine hacia arriba.

Corrida del gel, voltaje y tiempo para ARN. Se cargaron cada una de las muestras en los pozos (todo el contenido del tubo), cuidando que no se derramaran, al final se anotó el orden de cómo se acomodaron las muestras en el gel. La cámara se conectó a la fuente de poder, y se dejó correr a 70 volts por 1 hora 20 minutos después se sacó el gel de la cámara con cuidado y se colocó en el Transiluminador para ver las bandas. Se tomaron las fotos correspondientes y se guardaron en la computadora del Transiluminador y en una memoria USB.

4.4. Síntesis de c-ADN

Primera reacción. Se requirieron 2 µg de ARN para la reacción, se aforó a 5 µl con agua DEPC, luego se agregó un control negativo solamente con 4 µl de agua DEPC y 1 µl de Random primer. Los tubos se calentaron a 70°C por 5 minutos en una termoplaca, inmediatamente se pasó a 4°C por 5 minutos. Se centrifugó por 10 segundos en microfuga.

Segunda reacción. Se hizo la siguiente mezcla en un tubo de 2 ml (cantidades para 1 muestra, si son 20 muestras se multiplica las cantidades por 21, es decir se agrega 1 muestra más para que no falten reactivos. En el Cuadro 4 se muestran los reactivos y las cantidades a empleadas para llevar a cabo esta reacción.

CUADRO 4 Reactivos para una segunda reacción de c-DNA

Reactivo	Cantidad
Agua libre de nucleasas	5.5 µl
Buffer de reacción 5X	4 µl
MgCl ₂	3 µl
DNTP mix	1 µl
Inhibidor de ribonucleasa	0.5 µl
Transcriptasa reversa	1 µl
TOTAL	15 µl

Una vez preparado el cóctel de reactivos, fueron tomados 15 µl del cóctel y fueron agregados al tubo de la primera reacción, manejando cuidadosamente ciertas condiciones tanto de temperatura como de tiempo (Cuadro 5). Finalmente, los tubos fueron colocados en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

CUADRO 5 Condiciones de la mezcla de reactivos para segunda reacción de c-DNA en el termociclador

Temperatura (° C)	Tiempo (min)
25	5
42	60
70	15
4	HOLD (tiempo en espera)

NOTA: Una vez terminado el tiempo en el termociclador, los tubos fueron guardados se a -20 °C.

4.5. Diseño de Primers o iniciadores

Para llevar a cabo la secuenciación se buscó información en la base de datos de **NCBI** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para *Dasyliirion cedrosanum*, pero no se encontró ninguna información al respecto.

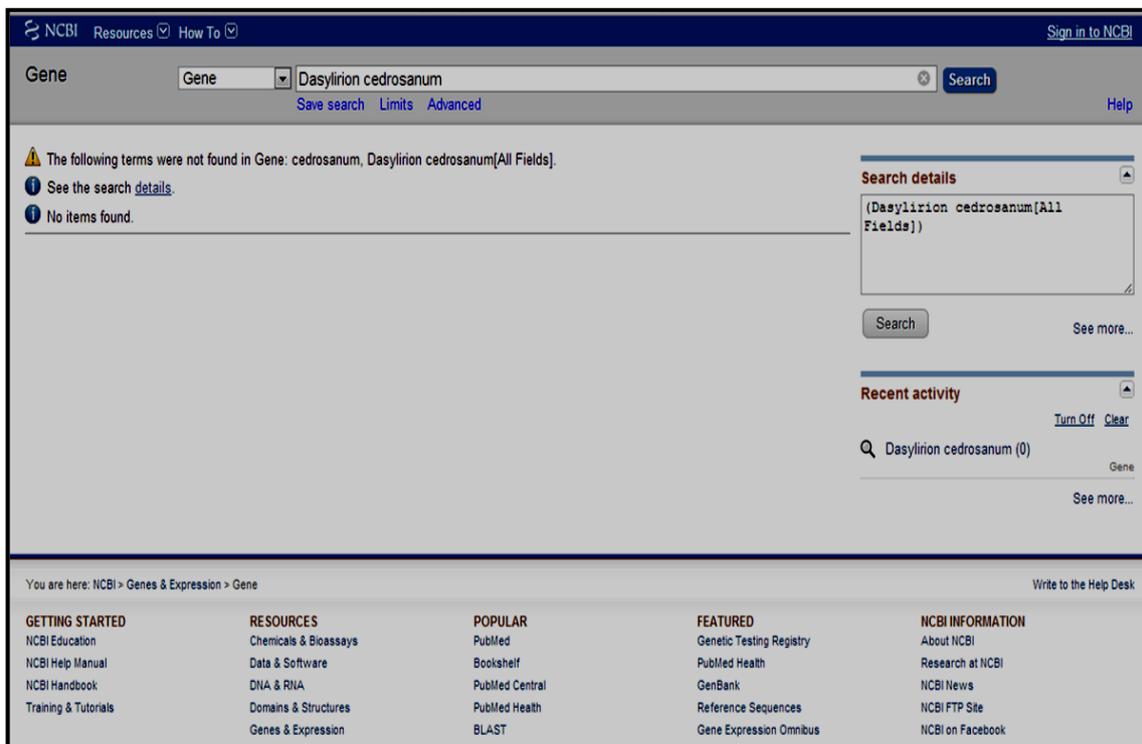


FIGURA 7 Portal de la página web de Base de datos de genes

Por lo anterior, se procedió a trabajar con plantas filogenéticamente cercanas a *D. cedrosanum* de las cuales existiera información sobre el gen de ACC oxidasa. Dentro de las plantas que cuentan con información sobre el gen de ACC oxidasa en la base de datos del NCBI encontramos a: *Saccharum officinarum*, *Asparagus officinalis*, *Arabidopsis thaliana* y *Dasyilirion* para el gen 18S citoplasmático (que será usado como gen endógeno o gen control). Cabe mencionar que de estas plantas solo *Asparagus officinalis* se encuentra relacionada filogenéticamente con *D. cedrosanum*, sin embargo, se consideró a *Arabidopsis thaliana* debido a que esta planta es usada como modelo en biología molecular. Por otro lado, se consideró el gen de ACC oxidasa de *Saccharum officinarum* debido a que es una de las pocas plantas con más información de dicho gen y se tomó el gen 18s de *Dasyilirion* como gen endógeno debido a que es el único gen de este género del que existe información.

A partir de la información del ARNm encontrada en la página del NCBI (programa especializado en el diseño cebadores o primers para PCR) para el gen de ACC oxidasa de cada una de las plantas mencionadas anteriormente, y para el gen 18s de *Dasyilirion* se procedió a diseñar los primer que fueron utilizados para la evaluación de la expresión génica de ACC oxidasa. Para el diseño de los primers se utilizó el software **PRIMER-BLAST** encontrado en la página del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y se siguieron los siguientes parámetros para llevar a cabo el diseño y selección de cada primer.

4.5.1. Parámetros para el diseño de Primers para la expresión de genes

Dentro de los parámetros a considerar para el diseño y selección de primers encontramos los siguientes:

1. Disponibilidad en una base de datos de la secuencia de ARNm del gen de interés y del organismo que se vaya a evaluar. En caso de que no exista, partir de la secuencia de una especie lo más relacionado al de interés.
2. El tamaño del producto de amplificación debe encontrarse entre 100 a 200 pares de bases (pb).

3. La temperatura de anillamiento de cada primer (forward y reverse) debe encontrarse entre 57° C a 61 ° C, con un óptimo de 60 °C (Nota: Entre primers (forward y reverse) no debe haber una diferencia mayor a 1 °C en la temperatura de anillamiento).
4. El número de G y C (Guanina y Citocina) en las últimas 5 bases del primer no debe exceder de 3.
5. No deben haber formación de dímeros u horquillas entre los primers.

Posterior al diseño, las secuencias generadas para cada primer fueron verificadas y validadas por medio del Software ***Oligo Analyzer-Integrated DNA Technologies*** (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>), el cual es una herramienta sencilla que determina las propiedades del primer como Tm (temperatura de anillamiento), % GC (guaninas y/o citocininas), formación de bucles, formación de dímeros y compatibilidad de primer a primer.

La secuencia de los primers que cumple con todos estos parámetros es seleccionada y enviada a la empresa MacroGen (Seoul, Korea) para llevar a cabo la síntesis del primer. Las secuencias de cada primer se detallan en el apartado del Anexo 1.

4.5.2. Preparación del primer

Los primers se hidrataron con agua DEPC a una concentración de 100 pmol, a partir de esa concentración (solución madre) se preparó una solución de trabajo de 15 pmol. A continuación se presentan las temperaturas de anillamiento para cada primer (calculada por el fabricante).

Primers: ACO-Ef (54.3 °C), ACO-Er (50.2 °C), ACC -Ef (64 °C), ACC-Er (60.3 °C), ACC-Sf (60.5 °C), ACC-Sr (60.5 °C), 18 Sr RNA Df (60.5 °C), 18 Sr RNA Dr (60.5 °C), ACC-Af (60.5 °C), ACC-Ar (60.5 °C).

Muestras: Hoja y Piña de *Dasyllirion cedrosanum*.

Uno de los criterios importantes a considerar al trabajar con primers para PCR es la temperatura de anillamiento del primer (Tm). La literatura sugiere

que para un análisis de expresión de genes se debe manejar un rango de temperatura de anillamiento entre 50° C y 65° C, ya que no se especifican valores exactos para cada tipo de primer a emplear. Se manejaron dos temperaturas para cada par de primer, una para el *forward* y otra para el *reverse*. Para seleccionar las temperaturas a usar (Cuadro 6), se tomaron los valores más bajos de cada par de primer.

CUADRO 6 Primers con temperaturas óptimas

PRIMER	TEMPERATURAS DE ANILLAMIENTO (°C)
ACO-E	50.2
ACC -E	60.3
ACC-S	60.5
18 Sr RNA D	60.5
ACC-A	60.5

NOTA: los valores de temperatura de anillamiento se redondearon a 50 °C y 60 °C

4.6. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

4.6.1 Master mix

Es una mezcla de componentes que se añaden de forma común a todas las muestras y deben estar calculadas proporcionalmente a la cantidad de muestra a trabajar para preparar solamente lo necesario.

Estos componentes se prepararon en el siguiente orden: buffer de reacción 10 X, MgCl₂, iniciadores *forward* y *reverse* del gen que se quiere detectar, la solución de nucleótidos (DNTP's) y finalmente la *Taq* polimerasa (Cuadro 7), el volumen final habitual de la reacción por muestra normalmente suele ser de 25 µl.

CUADRO 7 Reactivos para la Preparación del Master Mix

Reactivos	Concentración	1 muestra
Buffer de reacción 10x A	1x	2.5 uL
MgCl ₂ 25 Mm	1.5 Mm	1.5 uL
Primer F 15 pmol/uL	0.5pmol/uL-0.5 mM.	0.83 uL
Primer R 15 pmol/UL	0.5pmol/uL-0.5 mM.	0.83 uL
dNTP 'S 25 mM	0.2 Mm	0.2 uL
Taq polimerasa 500 U-5 U/uL	1u	0.2 uL
Agua BM	----	18 UI
TOTAL	----	24 uL
Muestra DNA	----	1 UI

4.6.2. Condiciones para la PCR

Dentro del termociclador, las muestras estuvieron bajo tres temperaturas diferentes que se repitieron una y otra vez (llamadas también ciclos de reacción). Durante estos ciclos el fragmento del gen a estudiar experimentó tres etapas (Cuadro 8 y 9) en el cual hubo un proceso de desnaturalización, anillamiento y extensión de acuerdo al tiempo y a las temperaturas programadas dentro del termociclador.

CUADRO 8 Condiciones de PCR para síntesis de RNA

Número de ciclos:	30 ciclos		
Tiempo	Temperatura	Ciclo	Etapas PCR
10 minutos	95 ° C		Desnaturalización
30 segundos	95 ° C	✓	Desnaturalización
30 segundos	50°C y 60 °C	✓	Anillamiento
1 minuto	72 °C	✓	Extensión
10 minutos	72 °C		Extensión

CUADRO 9 Condiciones de PCR para síntesis de ARN con temperaturas reales empleadas

Numero de ciclos:	30 ciclos		
Tiempo	Temperatura	Ciclo	Etapas PCR
10'	95 ° C		Desnaturalización
30'	95 ° C	✓	Desnaturalización
30'	56°C, 57°C, 58°C, 59°C	✓	Anillamiento
1'	72 °C	✓	Extensión
10'	72 °C		Extensión

Debido a que no se logró amplificar los genes ACO-E, ACC-E, ACC-S y ACC-A, se procedió a realizar un barrido de temperaturas de anillamiento, donde se probaron 2 temperaturas arriba y 2 temperaturas por debajo de la temperatura óptima de anillamiento para el primer ACO-E (*Asparagus officinalis*) y 4 temperaturas por debajo de la temperatura óptima para los primers ACC-E (*Asparagus officinalis*), ACC-S (*Saccharum officianarum*), ACC-A (*Arabidopsis thaliana*) (Cuadro 10).

CUADRO 10 Tipo de muestra y temperaturas usadas para pruebas de primers de barrido de temperaturas.

ACO-E (50°C Optima)		ACC-E (60°C Optima)	
Hoja	Piña	Hoja	Piña
52	52	59	59
51	51	58	58
49	49	57	57
48	48	56	56
ACC-S (60°C Optima)		ACC-A (60°C Optima)	
Hoja	Piña	Hoja	Piña
59	59	59	59
58	58	58	58
57	57	57	57
56	56	56	56

4.7. Electroforesis horizontal de agarosa al 3%

En un vaso de precipitado se disolvió 4.5 g de agarosa en 150 ml de buffer TAE 1x (Trizma base, ácido bórico, EDTA 0.5M), mediante una parrilla de calentamiento (300°C) hasta que la mezcla se tornó transparente. Se dejó enfriar la agarosa hasta una temperatura de 45°C. La solución se vertió en un portagel al cual se le agregó un peine, se evitó dejar burbujas en el gel. Se dejó solidificar el gel de 15 a 20 minutos y se removió el peine. Sobre una tira de parafilm se colocó una gota (1 ul) de buffer de carga (50% de glicerol, 1 mM EDTA, 0.2% azul de bromofenol y 60 ug/mL de red gel), se colocó 5 ul del ADN de una muestra (4 ul de marcador molecular 100 pb marca Axygen) y se mezcló succionando y expulsando de 5 a 10 veces. La mezcla se colocó en un pozo del gel, se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó un volumen de buffer TAE 1x hasta cubrir completamente el gel. Las muestras se fraccionaron a 90 volts por 45 minutos. En el Transiluminador de luz UV, se visualizó la banda correspondiente a cada gen.

Capítulo 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Métodos de Extracción de RNA

5.1.1. Método del Trizol Modificado

En la **Figura 8** se observan 4 muestras de PCR de dos órganos de sotol, hoja y piña (muestras frescas). En la cual se observan dos bandas nítidas para cada muestra, sin embargo, se observa que la muestra 3 presenta un barrido debido a la degradación del ARN lo que indica un mal manejo de la muestra durante la conservación o un método de extracción del ARN no adecuado. En el caso del pozo 2 se observan bandas más definidas sin presencia de degradación del material, para este caso el método utilizado fue el de Trizol Modificado con adición del citrato después de adicionar el Trizol a la muestra. Este mismo paso se aplicó para la muestra 1, sin embargo se observan bandas menos definidas e intensas, los cuales pudieron haber sido por varios factores como el manejo inadecuado de las condiciones de temperatura durante el proceso de maceración, la toma de los pesos de las muestras y el tipo de órgano empleado (1 piña, 2 hoja). En la muestra 4 se le agregó el citrato después de tomar el sobrenadante después del centrifugado, sin embargo no se observan con mucha intensidad las bandas de ARN, por lo que no se obtuvo un buen resultado al respecto.

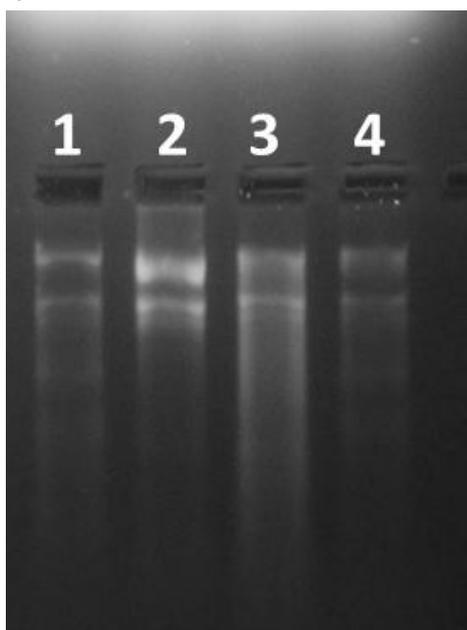


FIGURA 8 Gel de agarosa de extracción de ARN por Método del Trizol modificado. Pozos 1 y 3 (piña), 2 y 4 (hoja).

En la **Figura 9** se muestra el gel de 20 muestras de ARN (hoja y piña de *D. cedrosanum*), en el que se manejan dos tipos de muestras (frescas y liofilizadas). También se modificaron las cantidades en cuanto a los μg empleados en cada muestra. Para las muestras liofilizadas se tomaron valores de 40, 60 y 100 μg de muestra. Para el caso de muestras frescas los valores tomados fueron de 120 y 140 μg de muestra (ver Cuadro 11).

En la **Figura 9** se observa que tanto para el caso de las muestras frescas como para las muestras liofilizadas no hay una buena definición de bandas empleando el método de Trizol Modificado. Está claro que las muestras menos favorecidas para la obtención de bandas de ARN son las muestras liofilizadas como se puede observar en la **Figura 9** donde las muestras 2, 4, 8 y 9 se encuentra por completo degradado el material genético, mientras en el resto de las muestras liofilizadas no se obtuvo una buena extracción. En las muestras frescas 14, 16 y 17 también se observa un alto grado de degradación aunque se observan más intensas que las muestras liofilizadas, probablemente debido a la cantidad de muestra empleada.

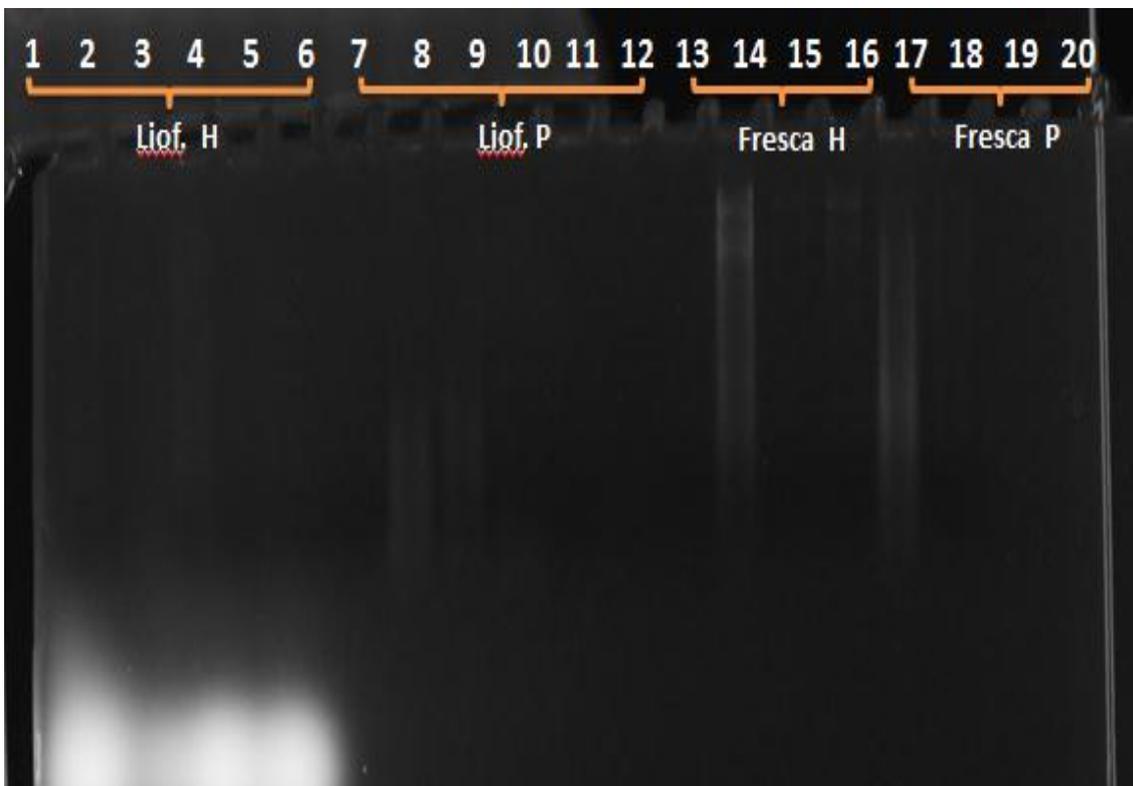


FIGURA 9 Gel de agarosa de extracción de ARN por 2 métodos (Método de Trizol y Trizol Modificado). Pozos del 1 al 12 (muestras liofilizadas), de éstos, del 1 al 6 (hojas), del 7 al 12 (piñas). Pozos del 13 al 20 (muestras frescas), de éstos del 13 al 16 (hojas), y del 17 al 20 (piñas).

CUADRO 11 Extracción de RNA con técnica de Trizol modificado (con citrato)

NÚMERO DE MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ÓRGANO	CLAVE	TÉCNICA	MODIFICACIÓN 1	MODIFICACIÓN 2
1	Liofilizada	Hoja	LF28 HEMBRA	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al inicio)	40 mg
2	Liofilizada	Hoja	LF28 HEMBRA	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al inicio)	60 mg
3	Liofilizada	Hoja	LF28 HEMBRA	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al inicio)	100 mg
4	Liofilizada	Hoja	LF28 HEMBRA	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)	40 mg
5	Liofilizada	Hoja	LF28 HEMBRA	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)	60 mg
6	Liofilizada	Hoja	LF28 HEMBRA	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)	100 mg
7	Liofilizada	Piña	LF28 HEMBRA	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al inicio)	40 mg
8	Liofilizada	Piña	LF28 HEMBRA	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al inicio)	60 mg
9	Liofilizada	Piña	LF28 HEMBRA	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al inicio)	100 mg
10	Liofilizada	Piña	LF28 HEMBRA	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)	40 mg
11	Liofilizada	Piña	LF28 HEMBRA	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)	60 mg
12	Liofilizada	Piña	LF28 HEMBRA	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)	100 mg
13	Fresca	Hoja	C15 H	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al inicio)	120 mg
14	Fresca	Hoja	C15 H	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al inicio)	140 mg
15	Fresca	Hoja	C15 H	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)	120 mg
16	Fresca	Hoja	C15 H	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)	140 mg
17	Fresca	Piña	C15 P	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al inicio)	120 mg
18	Fresca	Piña	C15 P	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al inicio)	140 mg
19	Fresca	Piña	C15 P	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)	120 mg
20	Fresca	Piña	C15 P	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)	140 mg

En la **Figura 10** presenta el gel de electroforesis de 15 muestras de ARN (frescas), empleando dos técnicas de extracción de ARN. Dado que se veía pocos resultados confiables con la técnica que hasta entonces se había empleado, se decidió trabajar con una nueva técnica (Técnica de CTAB-LiCl). Para la nueva técnica se probó uno en hoja y otra en piña y el resto se trabajó con el método de Trizol modificado (ver Cuadro 12).

5.1.2. Técnica de CTAB-LiCl y Trizol Modificado

A la modificación que ya presentaba la técnica de Trizol se añadió una modificación adicional que consiste adicionar el Trizol al mismo tiempo que se añade el nitrógeno líquido en el mortero que contiene la muestra vegetal para posteriormente proceder a la maceración de la muestra. A la par se emplearon dos métodos más, el método de CTAB-LiCl y el método tradicional de Trizol (sin adición de citrato), en este último tuvo como única modificación la adición del Trizol al mismo tiempo que se añade el nitrógeno líquido en el mortero que contiene la muestra vegetal. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 10**, donde se puede apreciar que las muestras que proyectan las bandas más nítidas corresponden a las muestras 3, 9 y 10, en las cuales no se empleó el citrato en ellas, sin embargo el hecho de que se les haya agregado el Trizol antes de la extracción influye en la buena extracción de ARN, debido a que este reactivo tiene la capacidad de proteger al ARN de la degradación lo cual puede ocurrir al momento de la pérdida de nitrógeno durante la maceración.

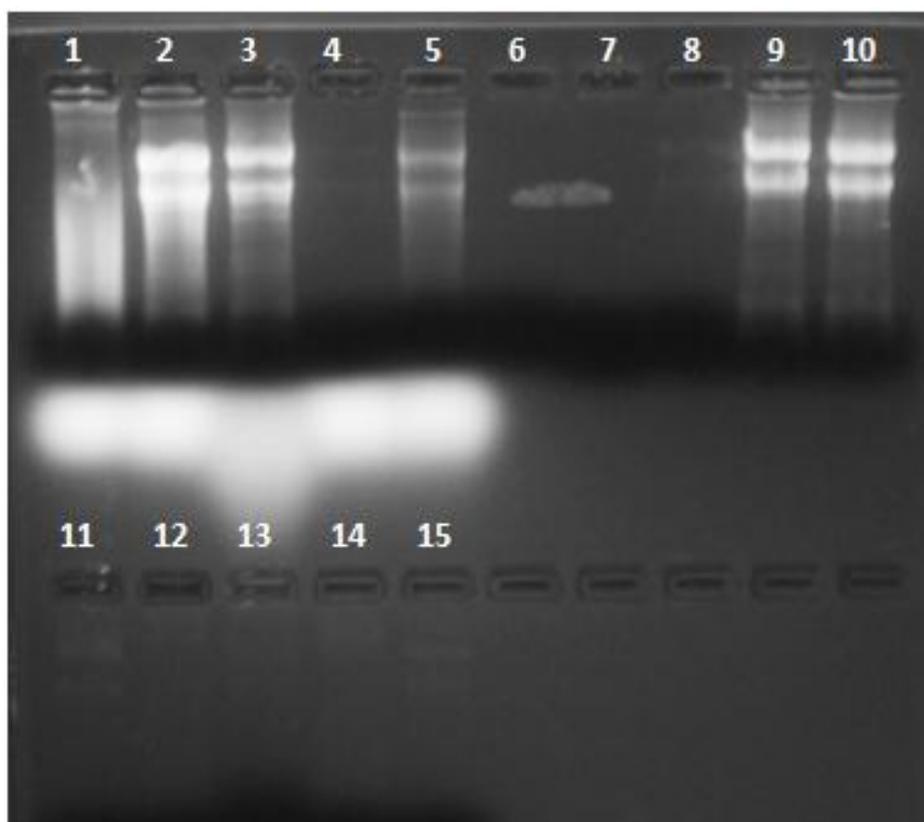


FIGURA 10 Corridas de electroforesis con gel de agarosa para extracción de ARN (*D. cedrosanum*) por dos Técnicas. Pozo 1 y 2 (Técnica de CTAB-LiCl) con hoja y piña respectivamente. Pozos del 3 al 15 (Técnica de Trizol Modificado). Pozos del 3 al 8 (hojas), del 9 al 15 (piñas).

CUADRO 12 Extracción de ARN con dos técnicas (Técnica de CTAB-LiCl y Trizol Modificado)

NÚMERO DE MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ÓRGANO	CLAVE	TÉCNICA	MODIFICACIÓN
1	FRESCA	HOJA	SIN SEXO	Técnica de CTAB-LiCl	
2	FRESCA	PIÑA	SIN SEXO	Técnica de CTAB-LiCl	
3	FRESCA	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL	SIN CITRATO Na/NaCl
4	FRESCA	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al inicio)
5	FRESCA	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al inicio)
6	FRESCA	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)
7	FRESCA	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)
8	FRESCA	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)
9	FRESCA	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL	SIN CITRATO

					Na/NaCl
10	FRESCA	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL	SIN CITRATO Na/NaCl
11	FRESCA	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al inicio)
12	FRESCA	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al inicio)
13	FRESCA	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)
14	FRESCA	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)
15	FRESCA	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL	CITRATO Na/NaCl (Al final)

5.2. Evaluación del acoplamiento de primers con el cDNA

Se evaluaron 5 primers diferentes (ACO-E, ACC-E, 18 S ribosomal, ACC-A, ACC-S) sintetizados a partir de secuencias de ARNm de plantas diferentes, de los cuales solo el gen 18 S se acopló al cADN de *D. cedrosanum*, ya que es el único primer sintetizado a partir del gen 18 S de *Dasyilirion*, (pozos 9 y 10) (Figura 11).

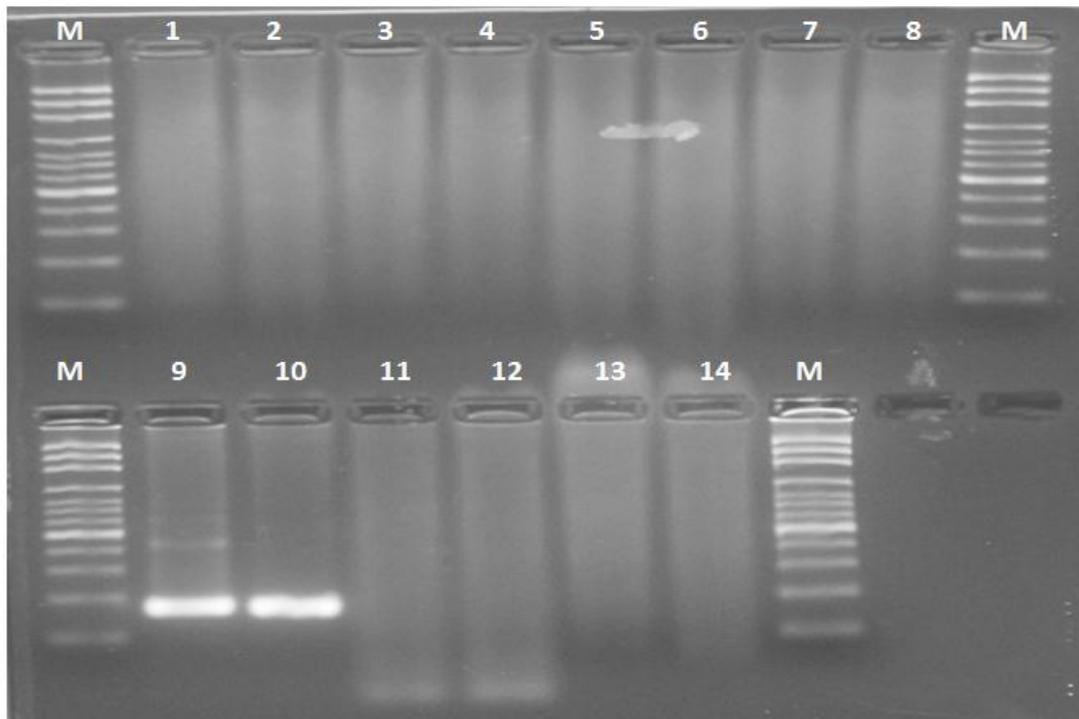


FIGURA 11 Gel de electroforesis para evaluación de acoplamiento de primers con el cADN.

CUADRO 13 Evaluación del acoplamiento de primers al cDNA con las temperaturas óptimas reportadas para cada primer.

# MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	PRIMER	TEMPERATURA DE PRIMER	ÓRGANO	CLAVE	TÉCNICA
M	Marcador molecular	-----	-----	-----	-----	-----
1	Fresca	ACO-E	50	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
2	Fresca	ACO-E	50	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
3	Fresca	ACC-E	60	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
4	Fresca	ACC-E	60	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
5	Fresca	ACO-E	50	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
6	Fresca	ACO-E	50	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
7	Fresca	ACC-E	60	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
8	Fresca	ACC-E	60	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
M	Marcador molecular	-----	-----	-----	-----	-----
M	Marcador molecular	-----	-----	-----	-----	-----
9	Fresca	18sr	60	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
10	Fresca	18sr	60	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
11	Fresca	ACC-A	60	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
12	Fresca	ACC-A	60	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
13	Fresca	ACC-S	60	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
14	Fresca	ACC-S	60	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
M	Marcador molecular	-----	-----	-----	-----	-----

5.3 Evaluación del barrido de temperaturas para el acoplamiento de Primers con el cADN

En la **Figura 12** podemos observar que aunque se llevó a cabo un barrido de diferentes temperaturas (ver Cuadro 14) no se logró el acoplamiento del cADN obtenido a partir de tejidos de hoja y piña de *D. cedrosanum* con ninguno de los primer sintetizados a partir de las secuencias de ARNm del gen de ACC oxidasa de diversas plantas, ni siquiera con el gen obtenido a partir de *A. officinalis* que es un género emparentado con *Dasyilirion*. Lo cual indica que la diferencia genética que existe entre estas plantas no permite utilizarlas como modelo heterólogo para la síntesis del gen de ACC oxidasa capaz de acoplarse con el cADN de *Dasyilirion cedrosanum*, por lo cual sería conveniente el análisis del transcrito de la planta de sotol para la adecuada síntesis de un primer del gen ACC oxidasa que pueda ser utilizado para la correcta evaluación de la

producción de etileno realizada por esta planta en diversas condiciones fisiológicas normales o producidas por factores adversos bióticos y abióticos.

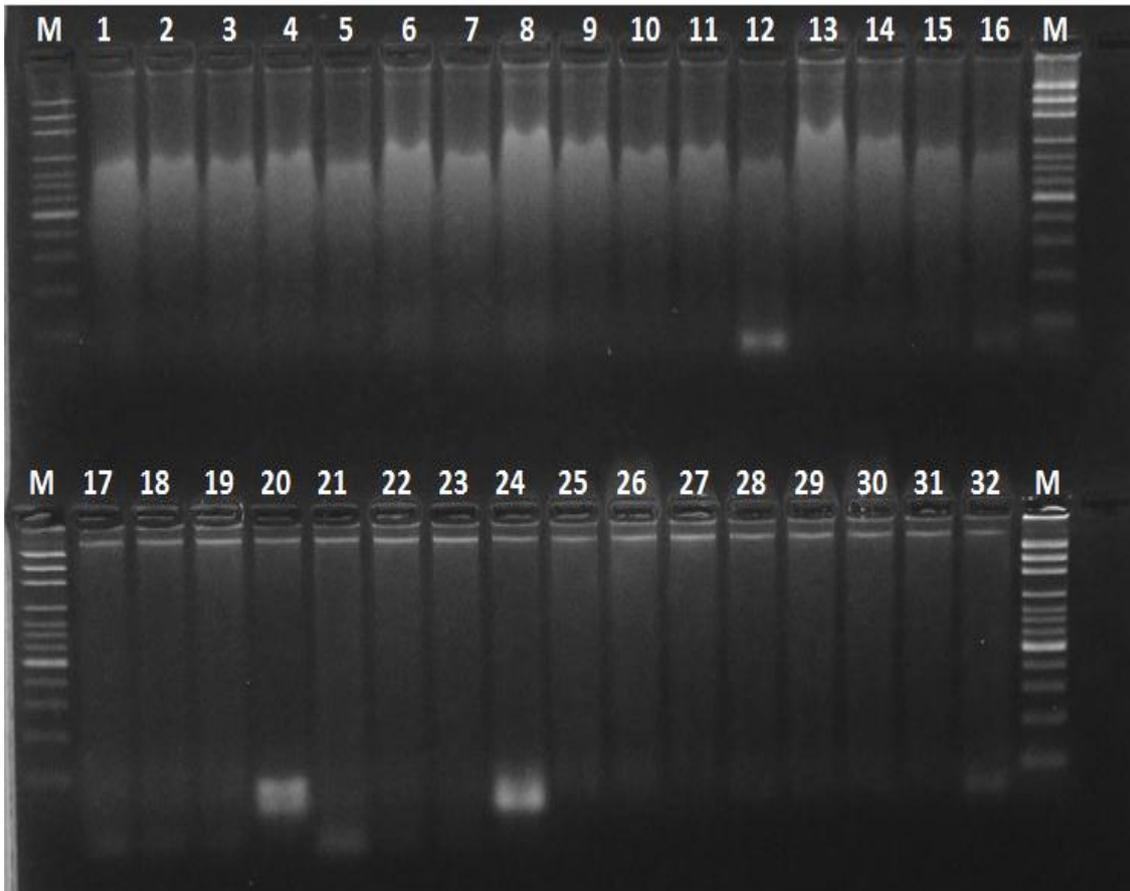


FIGURA 12 Barrido de temperaturas para evaluar el acoplamiento de primers con el cADN.

CUADRO 14 Evaluación de barrido de temperaturas en primers

NÚMERO DE MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	PRIMER	TEMPERATURA DE PRIMER	ÓRGANO	CLAVE	TÉCNICA
M	MARCADOR MOLECULAR	-----	-----	-----	-----	-----
1	FRESCA	ACO-E	48°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
2	FRESCA	ACO-E	49°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
3	FRESCA	ACO-E	51°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
4	FRESCA	ACO-E	52°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
5	FRESCA	ACO-E	48°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
6	FRESCA	ACO-E	49°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
7	FRESCA	ACO-E	51°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
8	FRESCA	ACO-E	52°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
9	FRESCA	ACC-E	56°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
10	FRESCA	ACC-E	57°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
11	FRESCA	ACC-E	58°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL

12	FRESCA	ACC-E	59°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
13	FRESCA	ACC-E	56°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
14	FRESCA	ACC-E	57°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
15	FRESCA	ACC-E	58°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
16	FRESCA	ACC-E	59°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
M	MARCADOR MOLECULAR	-----	-----	-----	-----	-----
17	FRESCA	ACC-S	56°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
18	FRESCA	ACC-S	57°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
19	FRESCA	ACC-S	58°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
20	FRESCA	ACC-S	59°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
21	FRESCA	ACC-S	56°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
22	FRESCA	ACC-S	57°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
23	FRESCA	ACC-S	58°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
24	FRESCA	ACC-S	59°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
25	FRESCA	ACC-A	56°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
26	FRESCA	ACC-A	57°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
27	FRESCA	ACC-A	58°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
28	FRESCA	ACC-A	59°C	HOJA	SIN SEXO	TRIZOL
29	FRESCA	ACC-A	56°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
30	FRESCA	ACC-A	57°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
31	FRESCA	ACC-A	58°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
32	FRESCA	ACC-A	59°C	PIÑA	SIN SEXO	TRIZOL
M	MARCADOR MOLECULAR	-----	-----	-----	-----	-----

Capítulo 6

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

La técnica de extracción con la que se obtuvo bandas de buena calidad de ARN a partir de tejidos de hoja y piña de *D. cedrosanum* fue la técnica de Trizol con una modificación que consta en la adición de Trizol a la muestra antes de ser macerada con nitrógeno líquido en el mortero.

De los primers diseñados a partir de la secuencia de ARNm específica para el gen de ACC oxidasa obtenidas de una base de datos para cuatro plantas (*A. officinalis*, *A. thaliana*, *S. officinarum*), así como del primer sintetizado para el gen endógeno 18 S a partir de una secuencia de ARNm de *Dasyllirion wheeleri*, solo el gen endógeno fue capaz de acoplarse al cADN sintetizado a partir del material genético obtenido de *D. cedrosanum*.

Por lo anterior, no fue posible cuantificar la expresión del gen de ACC oxidasa en la tejidos de *D. cedrosanum* debido a que no se llevó a cabo el acople de los primers diseñados con el cADN sintetizado a partir del ARN de *D. cedrosanum*.

Capítulo 7

PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos, se propone que en un futuro se lleve a cabo los siguientes puntos:

- Realizar una extracción del ARN a partir de tejidos de la hoja, piña y/o escapo de *D. cedrosanum* para llevar a cabo el análisis del transcriptoma de esta especie mediante secuenciación masiva, y con ello obtener la información necesaria para el diseño de un primer específico para el gen de ACC oxidasa; así como para diseñar primers específicos para genes relacionados con otras fitohormonas o metabolitos de importancia agronómica o industrial.
- Medir los niveles de expresión de los genes relacionados con la síntesis de etileno en *D. cedrosanum* por medio de la cuantificación de la expresión de ACC oxidasa mediante la técnica de PCR en tiempo real con el uso de un primer específico para este gen.

Capítulo 8

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeles F.B., Morgan P.W., Saltveit Jr.M.E. (1992). Ethylene in Plant Biology. 2^a Edition. Ed. Academic Press. U.S.A. pp. 4-6.
- Aitchison P.A., Macleod A.J., Yeoman M.M. (1977). Growth patterns in tissue (callus) cultures. Street H.E. (Ed.) Plant tissue and cell culture. 2^a Edition. Ed. Blackwell Sci. Publ. Oxford., UK. pp. 267-306.
- Alia T.I., Colinas L.Ma.T., Martínez D.Ma.T., Soto H.R.M. (2005). Daños por frío en zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.)). H.E. Moore and Stearn. I. Cambios en volátiles, firmeza y azúcares totales. **Revista Fitotecnia Mexicana** 28(1):17-24.
- Azaña Y.P., Cornelio J.R. (2007). Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar clonixinato de lisina 125 mg y pargeverina clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. pp. 20-21.
- Azcón B.J., Talón M. (2000). Fundamentos de Fisiología vegetal. Ed. McGraw-Hill Interamericana. España. pp. 113-129.
- Azofeifa A. (2006). Uso de Marcadores Moleculares en Plantas; Aplicaciones en Frutales del Trópico. **Agronomía Mesoamericana** 17(2):221-242.
- Barrera O.S., Ortiz C.R., López B.J., Beltrán P.E. (2012). Bases moleculares de la señalización del ácido abscísico y el etileno en plantas. **Ciencia Nicolaita** 56:21-22
- Bautista R.B., Arévalo G.Ma.L., Saucedo V.C., Martínez D.Ma.T. (2005). Proceso de Maduración de Frutos de Chicozapote (*Manilkara sapota* (L.) P. Royen) Tipo Fino. **Revista Chapingo. Serie Horticultura**, 11(2):387-391
- Bhownik P.K., Matsui T. (2004). Changes in the Activity and Expression of 1 Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Synthase, ACC Oxidase, and Phenylalanine Ammonialyase in *Asparagus spears* in Response to Wound-induced Ethylene Synthesis. **HortScience**, 39(5):1074-1078.
- Bogler D.J. (1994). Taxonomy and phylogeny of *Dasyilirion* (*Nolinaceae*). Ph. D. Dissertation. University of Texas at Austin. Ed. Springer Berlin Heidelberg. pp 392-397. U.S.A.
- Bradford K.J., Yang S.F. (2008). Pioneer in plant ethylene biochemistry. **Plant Science**, 175(2):2-7.
- Calva C.G., Pérez V.J. (2005). Cultivo de Células y Tejidos Vegetales. Fuente de Alimentos para el Futuro. **Revista Digital Universitaria**, 6(11):2-16.
- Cervantes E. (2002). Ethylene: new interactions, still ripening. **Plant Science**, 7(8):334-335.
- Charlesworth D. (2002). Plant sex determination and sex chromosomes. **Heredity**, 88:94-101.

- Chen Y.T., Lee Y.R., Yang C.Y., Wang Y.T., Yang S.F., Shaw J.F. (2003). A novel papaya ACC oxidase gene (CP-ACO2) associated with late stage fruit ripening and leaf senescence. ***Plant Science***, 164:531-540.
- Coutiño J.C. (2003). Oportunidades Comerciales del Sotol (*Dasyliirion* spp.) como Alternativa a la Producción Campesina del Estado de Coahuila. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. Pág. 33.
- Cubero J.I. (2003). Introducción a la mejora genética vegetal. 2ª Edición. Ed. Mundi-Prensa. México. pp 68.
- Abarca G.C.A., Cuevas G.E., Domínguez C.A. (2010). ¿Es la evolución de la dioecia un callejón sin salida? ***Ciencia***, 99:10-13.
- Dandekar A.M., Teo G., Defilippi B.G., Uratsu S.L., Passey A.J., Kader A.A., Stow J.R., Colgan R.J., James D.J. (2004). Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. ***Transgenic Research***, 13:373–384.
- Ferreira V., Szpiniak B., Grassi E., (2005). Genética. 2ª Edición. Ed. Universidad Nacional de Rio Cuarto. Argentina. pp. 167-168.
- García I. (2012). Efecto de los Tratamientos Hormonales con Etileno sobre la Incidencia de Flor Pegada y otros Parámetros de Calidad en Calabacín. Tesis de Licenciatura. Universidad de Almería. España. pp. 44.
- Giovannoni J. (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. ***Plant Molecular Biology***, 52:725-749.
- Gómez C.A., Tadeo F.R., Talón M., Primo M.E. (1996). Leaf abscission induced by ethylene in water stressed intact seedlings of *Cleopatra mandarin* requires previous abscisic acid accumulation in roots. ***Plant Physiology***, 112:01-408.
- Gómez Z.A. (2012). Caracterización con Marcadores Moleculares Ram'S (Random Amplified Microsatellites) de Algunas Especies del Género *Erythrina* Presentes en Colombia. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. pp. 32.
- Gutiérrez C.A. (2012). Caracterización de Ciclotidos de *Leonia triandra* (Violaceae) con Actividad Antifúngica contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Sigatoka Negra) en el Plátano. Tesis de Licenciatura. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. pp. 26.
- Greef J., Proft M., Winter F. (1976). Gas chromatographic determination of ethylene in large air volumes at the fractional parts-per-billion level. ***Analytical Chemistry***, 48(1):38-41.
- Gregory T.R. (2008). Understanding evolutionary trees. ***Evo Education & Outreach***, 1:121-137.
- Hall K.C., Pearce D.M.E., Jackson M.B. (1989). A simplified method for determining 1-aminocyclopropane-l-carboxylic acid (ACC) in plant tissues using a mass selective detector. ***Plant Growth Regulation***, 8:297-307.

- Harvey C.F., Gill G.P., Fraser L.G., Mcneilage M.A. (1997). Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*. ***Sexual Plant Reproduction***. 10(3):149-154.
- Henrickson J., Johnston M.C. (1997). A flora of the Chihuahuan Desert Region. Published by J. Henrickson. L.A. U.S.A. pp. 1687.
- Hyodo H., Hashimoto C., Morozumi S., Hu W., Tanaca K. (1993). Characterization and Induction of the Activity of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase in the Wounded Mesocarp Tissue of *Cucurbita maxima*. ***Plant & Cell Physiology***, 34:667-671.
- Iglesias A.L., Luna R.M., Durán V.M., Rivera F.A., Sánchez C.N. (2010). Marcadores RAPDs asociados a la expresión del sexo en *Ceratozamia mexicana Brongniart (Zamiaceae)*. ***Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del ambiente***. 16(2):139-145.
- Jordán M., Casaretto J. (2006). Fisiología Vegetal (F.A. Squeo & L. Cardemil eds.). Ed. Ediciones Universidad de La Serena. Chile.
- Kevin L., Wang C., Ecker J.R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. ***The Plant Cell***, 14:131-151.
- Kneissl M.L., Deikman J. (1996). The tomato E8 gene influences ethylene biosynthesis in fruit but not in flowers. ***Plant Physiology*** 112:537-547.
- Lieberman M. (1979). Biosynthesis and action of ethylene. ***Plant Physiology***, 30:533-591.
- Louis J.P., Augur C., Teller G. (1990). Cytokinins and differentiation process in *Mercurialis annua*. ***Plant Physiology***, 94:1535-1541.
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., Sa T.M. (2007). Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase containing *Methylobacteriumoryzae* and interactions with auxins and ACC regulation of ethylene in canola (*Brassica campestris*), ***Planta*** 226(4):867-876.
- Márquez C.J. (2009). Caracterización Fisiológica, Físico-Química, Reológica, Nutraceútica, Estructural y Sensorial de la Guanábana (*Annona muricata* L. cv. Elita). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. pp. 46.
- Martínez M.C. (2013). Implicación de los genes de biosíntesis y señalización de etileno en la determinación sexual, y el cuajado y desarrollo partenocárpico del fruto de calabacín (*Cucurbita pepo* L.). Tesis Doctoral. Universidad de Almería. España. pp. 7-10.
- Mathooko F.M., Tsunashima Y., Kubo Y., Inaba A. (2004). Expression of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene in peach (*Prunus persica* L.) fruit in response to treatment with carbon dioxide and 1-methylcyclopropene: possible role of ethylene. ***African Journal of Biotechnology***, 3(10):497-502.
- Menéndez V. (2012). Bases fisiológicas y moleculares de la reproducción sexual y asexual en el gametofito de helechos. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. España. pp. 3.

- Montoliu V.A. (2010). Respuestas Fisiológicas de los Cítricos Sometidos a Condiciones de Estrés Biótico y Abiótico. Aspectos Comunes y Específicos. Tesis Doctoral. Universidad Jaime I. España. pp. 35.
- Murayama H. (1998). Cell wall changes in pear fruit softening on and off the tree. **Postharvest Biology & Technology**, 14(2):143-149.
- Pacheco S., Brown A. (2006). Biología reproductiva e importancia de la polinización en *Cedrela lilo*. Ed. Lley-ProYungas. Argentina. pp. 41-50.
- Petritis K., Dourtoglou V., Elfakir C., Dreux M. (2000). Determination of 1 - aminocyclopropane-1-carboxylic acid and its structural analogue by liquid chromatography and ion spray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 896:335–341.
- Petruzzelli L., Coraggio I., Leubner M.G. (2000) Ethylene promotes ethylene biosynthesis during pea seed germination by positive feedback regulation of 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid oxidase, **Planta** 211(1):144-149.
- Pimienta B.E.; Muñoz U.A., Ramírez H.B.C., Méndez M.L. (2006). Desarrollo Vegetal. Universidad de Guadalajara. 1ª Edición. Universidad de Guadalajara. México. pp. 22.
- Proctor M., Yeo P., Lack A. (1996). La historia natural de la polinización. Ed. Timber Press. USA. pp. 479.
- Rangel S., Castro T. (2010). Estudio de la secuencia OT-7 en la determinación del sexo en Lechosa (*Carica papaya* L.). **Revista Producción Agropecuaria**, 3(1):3-6.
- Requena M.C., Herrera R.R., Aguilar G.C.N., De la Garza T.H., Carbó A.A. (2007). Caracterización Físicoquímica de las Plantas de Diferente Sexo de Sotol. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.
- Reyes B.Z. (2002). Ecología de la semilla de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. (Nolinaceae). Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp 4.
- Reyes V.M.H., Benavides M.A., Ramírez R.H., Villarreal Q.J.Á. (2012). Biología e Importancia del Sotol (*Dasyllirion Spp*). Parte I: Sistemática, Genética y Reproducción. **Planta**, 7(14):11-13.
- Richards A.J. (1997). Sistemas de fitomejoramiento. 2ª Edición. Ed. Chapman & Hall. U.S.A. pp.529.
- Robles E.A., España M.J. (2008). Biomasa y forraje, distribución espacial y abundancia de la planta de sotol (*Dasyllirion spp.*) En el ejido el jazmín, Mazapil, zacatecas, México. **Revista Investigación Científica**, 4(2):1-9.
- Rodríguez I.Y., Suárez G.F.J., Mercado S.E., Suárez R.L.M., Martínez P.M.M., Salgado G.R., López G.R. (2011). Expresión del gen de la ACC oxidasa en la maduración del fruto de Pitaya (*Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Riccob.) Cactaceae. **Biológicas**, 13(1):54–58
- Rudich J. (1990). Biochemical aspects of hormonal regulation of sex expression in cucurbits. In *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*. Bates, D.M.,

- Robinson, R. W., Jeffrey, C. (eds). Cornell University Press. U.S.A. pp. 269-280.
- Santamarina S.M^a.P., García B.F.J., Vilella F.V., Roselló C.J.L. (2004). *Biología y Botánica*. 2^a Edición. Ed. Universidad Politécnica de Valencia. España pp. 298.
- Sató D. (1935). Análisis de cariotipos en yuca, *Agave* y los géneros relacionados con especial referencia a la importancia filogenética. ***The Japanese journal of genetics***, 11(5):272-278.
- Schaller G.E., Ladd A.N., Lanahan M.B., Spanbauer J.M., Bleecker A.B. (1995). The ethylene response mediator ETR1 from *Arabidopsis* forms a disulfide-linked dimer. ***The Journal of Biological Chemistry***, 270(21):12526-12530.
- Simmons M.P., Freudenstein J.V. (2002). Artifacts of coding amino acids and other composite characters for phylogenetic analysis. ***Cladistics***, 18(3):354–365.
- Simpson G., Gendall A., Anthony R., Deam C. (1999). When to Switch to Flowering. ***Annu. Rev. Cell. & Developmental Biology***, 99:519-550.
- Smets R., Claes V., Van Onckelen H.A., Prinsen E. (2002). Extraction and quantitative analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in plant tissue by gas chromatography coupled to mass spectrometry. ***Journal of Chromatography A***, 993:79–87.
- Spivak, E. (2006). El árbol de la vida: una representación de la evolución y la evolución de una representación. ***Ciencia Hoy***, 16(91):12-15.
- Street H. E. (1977). Cell (suspension) cultures techniques. Plant tissue and cell culture. Ed. Blackwell Scientific Publishing. Oxford. U.K. pp. 61-102
- Tanurdzic M., Banks J. (2004). Mecanismos de determinación de sexo en plantas de la tierra. ***La planta celular***, 16 (1):561–571.
- Tovar B., García H., Mata M. (2001). Physiology of pre-cut mango. I. ACC and ACC oxidase activity of slices subjected to osmotic dehydration. ***Food Research International***, 34(2):207–215.
- Trebitsh T., Staub J.E., O’Neil S.D. (1997). Identification of a 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase Gene Linked to the Female (F) Locus That Enhances Female Sex Expression in Cucumber. ***Plant Physiology***, 113: 987-995.
- Valadez E., Kahl G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas. Ed. Mundi-Prensa. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo. México
- Valls O., Del Castillo B. (1998). Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud, 4^a Edición. Ed. Ediciones Piro. España.
- Vázquez Q.S. (2001). Combinación y concentración de reguladores de crecimiento para el enraizamiento de sotol (*Dasyllirion leiophyllum* Engelm. Ex. Trelase) *in vitro*. Tesis de licenciatura Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. México. pp 51.
- Wang K.L.C., Li H., Ecker J.R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. ***Plant Cell***, 14:131-151.

- Weberling F., Schwantes H.O. (1987). Botánica Sistemática. Ed. Omega, Barcelona. España. pp. 370.
- Xiong L., Jian K.Z. (2003). Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. ***Plant Physiology***, 133(1):29-36.
- Yim W., Seshadri S., Kim K., Lee G., Sa T. (2013). Ethylene emission and PR protein synthesis in ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. inoculated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) challenged with *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions. ***Plant Physiology & Biochemistry***, 67:95-104.
- Yu H., Ito Z.T., Peng J., Kumar P., Meyerowitz E.M. (2004). Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. ***Proceedings of the National Academy of Science***, 101(20):7827-7832.
- Zárate L.A. (2003). Inventario de las poblaciones y su condición del sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.) en el sur de Coahuila. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Secretaría de Desarrollo Agropecuario de Coahuila. Coahuila. México. pp. 29.
- Zheng Q., Nakatsuka A., Taira S., Itamura H. (2005). Enzymatic activities and gene expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase in persimmon fruit. ***Elsevier***, 37(3):286-290.

ANEXOS

ANEXO 1

SECUENCIAS DE ARNm y PRIMERS

1. ACC oxidasa (*Arabidopsis thaliana*)

Nombre del primer: AAC A f(forward) r(reverse)

>gi|23297271|gb|AY150384.1| *Arabidopsis thaliana* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (At1g05010) mRNA, complete cds

ATGGAGAGTTTCCCGATCATCAATCTCGAGAAGCTTAATGGAGAAGAGAGAGCAATCACTATGGAGAAGA
TCAAAGACGCTTGTGAAAAGTGGGGCTTCTTTGAGTGTGTGAACCATGGGATTTCACTCGAGCTTTTGG
CAAAGTGGAGAAGATGACCAAGGAACATTACAAGAAGTGCATGGAAGAGAGATTCAAGGAATCGATTAAG
AACAGAGGTCTTGACTCTCTTCGCTCTGAAGTCAACGACGTTGACTGGGAATCCACTTTCTACCTCAAGC
ACCTTCCCCTCTAATATCTCCGATGTCCCTGATCTCGACGACGATTACAGAACGTTAATGAAAGACTT
CGCCGAAAGATAGAGAAGTTGTGCGAGGAGCTACTGGATCTGCTGTGCGAGAATCTCGGTTTAGAGAAG
GGTATTTAAAAAAGGTGTTTTACGGGTCGAAAAGACCGACTTTTGGAAACCAAAGTCAGCAATTATCCAC
CTTGTCTAATCCGGACCTAGTCAAGGGTCTCCGAGCCACACCGACGCCGGCGGCATCATCTCCTCTT
CCAAGACGACAAAGTCAGTGGACTTCAGCTTCTTAAAGACGGCGAGTGGGTGCGATGTTCTCCGGTTAAG
CATTCAATCGTCGTTAATCTCGGCGATCAACTTGAGGTGATAACCAATGGGAAGTACAAGAGTGTGGAAC
ATAGAGTGCTATCTCAGACAGACGGAGAAGGAAGAATGTGCATCGCATATTCTATAATCCGGAAGCGA
CTCTGTTATTTTTCCGGCGCCGGAGCTGATCGGAAAAGAAGCAGAGAAGGAGAAGAAAGAGAAGTATCCG
AGATTTGTGTTGAAGATTACATGAACTCTACTCTGCTGTCAAGTTTCAGGCCAAGGAACCAAGGTTTG
AAGCCATGAAAGCTATGGAGACAAGTGGCCAAACAATGTTGGACCATTGGCCACTGCGTGAATGATATG
TAACTGGTTAATAAATATATATA

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC %	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CGACGTTGACTGG GAATCCA	Plus	20	24 6	26 5	60. 04	55. 00	5.00	3.00
Reverse primer	TTCTCGCACAGCA GATCCAG	Minus	20	40 4	38 5	60. 11	55. 00	4.00	2.00
Product length	159								

2. – 18 S rRNA (*Daysilirion*)

Nombre del primer: 18rRNAD f(forward) r(reverse)

>ENA|HM640705|HM640705.1 *Dasyilirion wheeleri* voucher Chase 3469(K) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.

CAAAGATTAAGCCATGCATGTGTAAGTATGAACAAATTCAGACTGTGAAACTGCGAATGG
CTCATTAAATCAGTTATAGTTTTGTTTGGTACGTGCTACTCGGATAACCGTAGTAATT
CTAGAGCTAATACGTGCAACAAAACCCGACTTCCGGAAGGGATGCATTTATTAGATAAAA
GGCCGACGCGGGCTCTGCCCGGTGCTCTGATGATTCATGATAACTCGACGGATCGCACGG
CCCTCGTGCCGGCGACGCATCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATA
GAGGCCTACCATGGTGGTGACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGC
CTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGAC
ACGGGGAGGTAGTGACAATAATAACAATACCGGGCTCAAACGAGTCTGGTAATTGGAAT
GAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT
GGACCTTGGGCTGGGCGCGCCGGTCCGCGTCCGGTGTGCACCGGCCGTCCCGTCCCTTC
TGCCGGCGATGCGCTCCTGGCCTTAAGTGGCCGGGTGCTGCCTCCGGCGCCGTTACTTTG
AAGAAATTAGAGTGCTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGTATACATTAGCATGGGATAACATC
ACAGGATTTCCGGTCTATTGTGTTGGCCTTCGGGATCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAG
TCGGGGGCATTCGTATTTTCATAGTCAGAGGTGAAATTCTTGATTTATGAAAGACGAACA
ACTGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGA
AGACGATCAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACCAGGGATCGGCGGAT
GTTGCTTTTAGGACTCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGG
AGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAG
CCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTCCAGACATAGTAAGGATT
GACAGACTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGG
TGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAACTAGCTA
CGCGGAGGCATCCTCCGCGGCCAGCTTCTTAGAGGGACTATGGCCGCTTAGGCCAYGGAA
GTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACA
CTGATGTATTCAACGAGTCTATAGCCTTGCCGACAGGCCCGGTAATCTTCGAAAATTT
CATCGTGATGGGGATAGATCATTGCAATTGTTGGTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGC
GCGAGTCATCAGCTCGCGTTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCC
TACCGATTGAATGGTCCGGTGAAGTGTTCGGATCGCGGCGACGGGGGGCGGTTCCGCCGCC
GCGACGTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAA

Primer pair 2

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AACGGCTACCACATCCAAGG	Plus	20	367	386	60.04	55.00	2.00	2.00
Reverse primer	ACCAGACTTGCCCTCCAATG	Minus	20	530	511	59.96	55.00	3.00	3.00
Product length	164								

3.- ACO (ACC oxidasa) *Saccharum officinarum*

Nombre del primer: ACC S f(forward) r(reverse)

>gi|41615358|gb|AY521566.1| *Saccharum officinarum* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (aco) mRNA, complete cds

```
CTCACTTCACTCCAGCGTTTCAGCATTAGACACGCACAAGGAAGAAACAGTAGCTGGATACATCTCCTAGT
AGCCAGTCCAGTGGTCCCGCGAGCTCGTTCGAGAGAAAACAGAGAGAGAGCAACATGGCGCCTGCATTG
TCATTCCCAGATCATCGACATGGGGCTGCTCGGCGGGGAGGAGAGGCCGCGCGGATGGAGCTTCTGCGCG
ATGCGTGCGAGAGCTGGGGCTTCTTCGAGATTCTGAACCACGGCATCTCGACGGAGCTGATGGACGAGGT
AGAGAAGCTGACCAAGGACCACTACAAGCGGGTGCAGGAGGTTCTCGAGTTCGCCAGCAAGACG
CTCAAGGACGCGCAGGACGTCAAGGCGGCGGAGAACCTGGACTGGGAGAGCACCTTCTTCGTCCGCCACC
TCCCGGAGTCCAACATCGCCGAGATACCGGACCTCGACGACGACTACCGGCGCGCGATGAGGCAGTTCGC
CGGCGAGCTGGAGGCGCTGGCGGAGCGGCTGCTGGACCTGCTGTGCGAGAACCTGGGCCTCGACAGGGGC
TACCTGGCGCGGGCGTTCCGCGGGCCCCGCACGGGCGCCCCGACGTTTCGGCACCAAGGTGAGCAGCTACC
CGCCGTGCCCGCGCCCCGACCTCGTGAGCGGCCTGCGCGCGCACACCGACGCCGGCGGCATCATCCTGCT
GTTCCAGGACGACCGCGTGGGCGGGCTCCAGCTGCTCAAGGACGGCGCGTGGGTGGACGTGCCGCCCTTG
CGCCACTCCATCGTTCGTAACCTGGGGGACCAGCTGGAGGTGATCACCAACGGCAGGTACAAGAGCGTGA
TGCACCGGGTGGTGGCGCAGCCCGACGGCAACAGGATGTCCATCGCGTCTTCTACAACCCGGGCAGCGA
CGCCGTATCTTCCCGCGCCGGCGCTGGTGAAGGCCGAGGAGGCCGCGGGGGCGTACCCAGGTTTC
GTGTTTCGAGGACTACATGAAGCTGTACGTGCGGCACAAGTTTCGAGGCCAAGGAGCCACGGTTTCGAGGCGT
TCAAGTCCGTGGAGACGGACGCTCCAAGTGCATAGCCATCGCGTAAAAGTTGGTCCCTGCGCCTAGCTC
TGGTTTACTGTGTTTCGAGATGTATTTGCGGCGTTCTGTTCTGCGGCATGATCGTTTATGCCTGTGTCTTT
AGTCCCTCTCTGCTCTCCTTCGCTCGCTAGTTAGCCTGCTAGCTTGTTATATGTGTGCGCGCACTCTGTTT
TGTAATATGTTTACTATTACAAAGCTATATTATGGGGAAAAAAAAA
```

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACCAAGGACCACTACAAGCG	Plus	20	291	310	59.97	55.00	3.00	2.00
Reverse primer	ATCTCGGCGATGTTGGACTC	Minus	20	445	426	59.90	55.00	5.00	3.00
Product length				155					

4.- Asparagus officinalis

Upstream : (5'-GCNTGYGARAAYTGGGGNTT-3')

Downstream: (5'-GGYTCYTTNGCYTGRAAYTT-3')

ANEXO 2

PREPARACIÓN DE RECTIVOS PARA EXTRACCIÓN DE ARN

PREPARACIÓN DE MOPS 5X

Para 500 ml se emplean las siguientes cantidades de reactivos:

- 40 ml de acetato de sodio 0.5 M
- 360 ml de agua destilada
- 10.3 g de Mops
- Ajustar pH de 7 (NaOH, 1N)
- 5 ml EDTA 0.5 M
- Aforar a 500 ml
- Mezclar perfectamente

PREPARACIÓN DE TAE 10X

Para 500 ml se emplean las siguientes cantidades de reactivos:

- Tris Base 24.23 g
- Acetato de amonio 2.05 g
- EDTA 0.72 g
- Ajustar a pH de 7.5 a 8.0 con ácido acético
- Mezclar perfectamente

PREPARACIÓN DE BUFFER DE EXTRACCIÓN I

Buffer de Extracción I. Modificación de la técnica de borato caliente. (Wan y Wilkins, 1994; Yao *et al.*, 2005).

Todas las soluciones fueron preparadas con Dietil Pirocarbonato (DEPC)

- NaCl (200Mm)
- Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2%
- Polivinilpirrolidona (PVP-40) al 1%
- EDTA 25Mm
- Tris HCl pH 8.0 (100mM)
- Proteinasa K (3U) **Nota:** Se añaden 4µL de Proteinasa K por mL de buffer.
- β-Mercaptoetanol al 1%

PREPARACIÓN DE BUFFER DE EXTRACCIÓN 2

Buffer de Extracción II. Modificación de la técnica de CTAB. (Asif *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2003).

- Bromuro de *cetil*trimetilamonio (CTAB) al 2%
- NaCl (1.4M)
- Polivinilpirrolidona (PVP-40) al 2%
- EDTA (20mM)
- β-Mercaptoetanol al 2%

ANEXO 3

Cuadro 1. Preparación de soluciones de trabajo de Primers

Nombre de primer	Gen a evaluar	Vol. Total de sln madre a 100 pmol/μl	Sol. Trabajo (15 p pmol/μl)	Volumen final	Temperatura media °C
ACO-Ef	ACC oxidasa (A. officinalis) Gen de artículo	355 μl H ₂ O DEPC	7.5 μl sol. Madre 42.5 H ₂ O DEPC	50 μl	54.3
ACO-Er	ACC oxidasa (A. officinalis) Gen artículo	363 μl H ₂ O DEPC	7.5 μl sol. Madre 42.5 H ₂ O DEPC	50 μl	50.2
ACC-Ef	ACC oxidasa (A. officinalis) Diseñado a partir de RNA _m	309 μl H ₂ O DEPC	7.5 μl sol. Madre 42.5 H ₂ O DEPC	50 μl	64.0
ACC-Er	ACC oxidasa (A. officinalis) Diseñado a partir de RNA _m	317 μl H ₂ O DEPC	7.5 μl sol. Madre 42.5 H ₂ O DEPC	50 μl	60.3
18SrRNA Df	Gen endógeno (Dasyilirion)	294 μl H ₂ O DEPC	7.5 μl sol. Madre 42.5 H ₂ O DEPC	50 μl	60.5
18SrRNA Dr	Gen endógeno (Dasyilirion)	269 μl H ₂ O DEPC	7.5 μl sol. Madre 42.5 H ₂ O DEPC	50 μl	60.5
ACC-Af	ACC oxidasa (A. thaliana)	257 μl H ₂ O DEPC	7.5 μl sol. Madre 42.5 H ₂ O DEPC	50 μl	60.5
ACC-Ar	ACC oxidasa (A. thaliana)	306 μl H ₂ O DEPC	7.5 μl sol. Madre 42.5 H ₂ O DEPC	50 μl	60.5
ACC-Sf	ACC oxidasa (S. officinarium)	303 μl H ₂ O DEPC	7.5 μl sol. Madre 42.5 H ₂ O DEPC	50 μl	60.5
ACC-Sr	ACC oxidasa (S. officinarium)	277 μl H ₂ O DEPC	7.5 μl sol. Madre 42.5 H ₂ O DEPC	50 μl	60.5