

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA



Cambios Transcripcionales Asociados a la Producción de Ácidos Grasos
Poliinsaturados de Cadena Larga y Antioxidantes en Fresa (*Fragaria vesca*)
Cultivar “Albión”

Por:

JAIME ANDRÉS VARGAS OCHOA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:
INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

Saltillo, Coahuila, México
Diciembre 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

Cambios Transcripcionales Asociados a la Producción de Ácidos Grasos
Poliinsaturados de Cadena Larga y Antioxidantes en Fresa (*Fragaria vesca*)
Cultivar "Albión"

Por:

JAIME ANDRÉS VARGAS OCHOA

TESIS

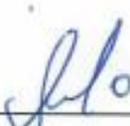
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. José Antonio González Fuentes
Asesor Principal



Dra. Susana González Morales
Co-Asesor



Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Co-Asesor



M.C. Gabriel Gallegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre 2018



AGRADECIMIENTOS

A mis Padres

Jaime Armando Vargas Gutiérrez y Lourdes Ochoa Ramírez estoy infinitamente agradecido por su incondicional apoyo y cariño a lo largo de cada etapa de mi vida. Por una educación ejemplar que me ha permitido desenvolverme como persona, y su constante disposición para escuchar, y alentarme cada vez que lo he necesitado. Les agradezco sinceramente por todo, puesto que todo es lo que me han dado.

A mis Abuelos

En especial agradecimiento a mis abuelos maternos Jaime Ochoa García † y Gloria Ramírez Sánchez y paternos Andrés Vargas Hernández † y Esther Gutiérrez Ortega†. Gracias a ellos estoy donde me encuentro, indudablemente me dieron los mejores padres que se puedan tener, soy una extensión de sus enseñanzas, me enseñaron a creer en mí mismo y los llevo con mucho orgullo en la sangre, en mi nombre y en mi corazón. Me dieron la libertad y la confianza de buscarme a mí mismo. Me enseñaron algo tan importante como es el valor y amor que tiene la familia.

A mi Hermana

Carolina Vargas Ochoa, te quiero agradecer por tantos momentos increíbles que hemos vividos juntos, por ser cómplice de mis metas y de mis aventuras. Eres una de las personas más importantes en mi vida y en muchas formas me has ayudado a comprender la vida y la humildad con la que hay que verla teniendo siempre la frente en alto y con una sonrisa.

A mi Familia

A todos mis familiares les agradezco sus consejos, su motivación y aprecio. En especial a mis padrinos: Gloria Vargas, Irasema Ochoa, Eduardo Ochoa, y Jaime Ochoa quienes sean comportado de una manera excepcional y me han ayudado en múltiples ocasiones a buscar mis propios sueños y alentado a alcanzarlos.

A Alondra Alanís Hurtado

En especial agradecimiento, quiero darte las gracias de todo corazón por ser una persona clave en mi vida, me has ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles, hemos disfrutado nuestros logros y siempre me has impulsado a ser mi mejor versión. No hay duda alguna que gracias ti muchas de las cosas que he logrado son posibles. Tu cariño y amor me dieron fuerza y seguridad para mantenerme firme y darlo todo por conseguir mi ingeniería. No tengo palabras para agradecerte todo lo que me has dado.

A mi Alma Mater, la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Por la oportunidad de estudiar en tan admirable y destacada institución. Me siento agradecido por la nobleza que le caracteriza, la humildad de sus integrantes y la determinación que nos inculca para llevar en alto el nombre de la universidad y la gloria de nuestra profesión. De igual forma agradezco a los profesores que me impartieron clase, gracias a ellos hoy tengo las herramientas y el conocimiento para crecer en el ámbito agrario.

A José Antonio González Fuentes

Estoy muy agradecido por ser usted quien desde un inicio fungió como mi tutor en la universidad. Me guío y fue testigo de mi proceso de formación académica, la cual alentó de manera constante, motivo por el cual fui partícipe del consejo universitario, siendo una de las más gratas experiencias de mi carrera. Muchas gracias por sus consejos, su amistad, pero principalmente por creer en mí.

A mis Asesores

A Susana Gonzales Morales le agradezco por su disponibilidad y atenciones, así como el conocimiento compartido que fue de vital importancia para hacer posible .la elaboración de este proyecto de investigación.

A Adalberto Benavides Mendoza le agradezco por su tiempo, enseñanzas vistas en clase y el conocimiento que sus investigaciones proporcionaron para hacer posible este proyecto de investigación.

DEDICATORIA

Jaime Armando Vargas Gutiérrez y Lourdes Ochoa Ramírez

Quiero dedicarles principalmente a ustedes esta pequeña pero tan importante parte de mi vida en la cual podemos ver los frutos de su trabajo y esfuerzo para darme la mejor de las oportunidades. Gracias ustedes esto es posible. Han sido un el mejor ejemplo que he tenido, y sé que aún nos faltan muchos logros y muchas alegrías por delante. Estoy muy orgulloso de ser su hijo y formar parte de esta familia.

A mis Abuelos

Quiero dedicarles este proyecto a mis abuelos Jaime Ochoa García †, Gloria Ramírez Sánchez, Andrés Vargas Hernández † y Esther Gutiérrez Ortega †. Han sido ejemplos importantísimos a lo largo de mi vida, pasamos grandes momentos que me marcaron para siempre, cada uno a su manera me dio una parte de si de la cual hoy soy. Hago una especial dedicación a mi querido abuelo Jaime Ochoa García quien inculcó en mí una insaciable sed de conocimiento, me enseñó infinidad de cosas de las cuales destaca la filosofía. De igual forma a mi abuelo Andrés Vargas Hernández, quien sembró en mí el respeto y amor al campo. Hoy soy su legado. Y me siento infinitamente orgulloso de ser su nieto

“La agricultura es la profesión propia del sabio, la más adecuada al sencillo y la ocupación más digna para todo hombre libre”

Cicerón

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	II
-----------------------------	-----------

DEDICATORIA	V
INDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
OBEJTIVO	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos	5
Hipótesis.....	5
REVISIÓN DE LITERATURA	6
Nutrición e Importancia de los Ácidos Grasos Omega 3	6
Biosíntesis de Ácidos Grasos	7
Estrés	12
Estrés oxidativo	14
Metabolitos	15
Ácidos orgánicos	16
Ácido Glutámico	16
El hierro en las plantas	19
El Cobre en las Plantas	20
Ácido salicílico	21
Melaza.....	22
Sustancias Húmicas	24
Algas marinas.....	27

Expresión génica	30
Regulación de la Expresión Génica.....	32
Análisis de expresión de genes	32
MATERIALES Y METODOS	35
Localización.....	35
Mediciones ambientales	38
Análisis de expresión de genes	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
Cuantificación	42
Calidad de ARN por Electroforesis	46
PCR en Tiempo Real (qPCR).....	49
Muestreo 1.....	52
Muestreo 2.....	54
CONCLUSIONES	67
REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de la melaza de la caña de azúcar (Téllez, 2004) _____	23
Cuadro 2. Distribución de los tratamientos, adicionados a fresa, cv. "Albión". ___	36
Cuadro 3. Composición de la solución nutritiva utilizada comercialmente para el cultivo de fresa cultivar "Albión". _____	37
Cuadro 4. Cocktail PCR _____	41
Cuadro 5. Secuencia de los Primers _____	41
Cuadro 6. Cuantificación del primer muestreo _____	42
Cuadro 7. Cuantificación del segundo muestreo _____	43
Cuadro 8. Cuantificación en qPCR de la expresión del Gen ACO2 para los tratamientos del primer muestreo _____	49
Cuadro 9. Cuantificación en qPCR de la expresión del Gen ACO2 para los tratamientos del primer muestreo _____	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transferencia de Acil-SCoA desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial (Velázquez et al., 2009)	8
Figura 2. Formación del malonil-CoA (Velázquez et. al., 2009).	8
Figura 3. Activación del acetil-CoA con la proteína acarreadora del acilo (ACP) (Velázquez et. al., 2009).	9
Figura 4. Activación del acetil-CoA con la proteína acarreadora del acilo (Velázquez et. al., 2009).	9
Figura 5. Formación del ácido palmítico (Velázquez et. al., 2009).	10
Figura 6. Sistema de elongación microsomal (Velázquez et. al., 2009).	11
Figura 7. Biosíntesis de las familias ω 9, ω 3, ω 6 de ácidos grasos poliinsaturados (De & Leñero, 2009).	12
Figura 8. Principales especies reactivas de oxígeno.	14
Figura 9. Estructura química del ácido glutámico	17
Figura 10. Participación del ácido glutámico en la síntesis de metabolitos o fitoquímicos.	18
Figura 11. Localización del experimento	35
Figura 12. Aplicación de tratamientos.	37
Figura 13. Grafica de medias de los resultados de la cuantificación del ARN del primer muestreo.	43
Figura 14. Grafica de medias de los resultados de la cuantificación del ARN del primer muestreo	45
Figura 15. Calidad del ARNm por medio electroforesis de los tratamientos T1, y T4 del primer muestreo.	46
Figura 16. Calidad del ARNm por medio electroforesis de los tratamientos T5, y T6 del primer muestreo.	46
Figura 17. Calidad del ARNm por medio electroforesis del tratamiento T9	47
Figura 18. Calidad del ARNm por medio electroforesis de los tratamientos T1, T2 y T3 del segundo muestreo.	47
Figura 19. Calidad del ARNm por medio electroforesis de los tratamientos T4, T5 y T6 del segundo muestreo.	47

Figura 20. Calidad del ARNm por medio electroforesis de los tratamientos T7, T8 y T9 del segundo muestreo. _____	48
Figura 21. Calidad del ARNm por medio electroforesis de los tratamientos T10, T11 y T12 del segundo muestreo. _____	48
Figura 22. Calidad del ARNm por medio electroforesis del Testigo absoluto del muestreo 2 _____	48
Figura 23. Respuesta de la expresión del gen ACO2 del primer muestreo en fresa cultivar “Albión”. _____	50
Figura 24. Respuesta de la expresión del gen ACO2 del segundo muestreo en fresa cultivar “Albión”. _____	52

RESUMEN

Los ácidos omega son ácidos grasos poliinsaturados se encuentran en las grasas y los aceites tanto de animales como de vegetales. Los principales ácidos que destacan por su importancia nutricional son el ácido eicosapentaenoico (EPA n-3) omega-3, el ácido decosaheptaenoico (DHA n-3) omega 3 y el araquidónico (ARA n-6) omega-6, que son biosintetizados a partir del ácido α -linoleico 18:3 (ALA). En la estructura de los ácidos grasos, cuando el primer doble enlace se ubica en el tercer carbono del grupo metilo (CH₃) se llama omega-3 y cuando el doble enlace se encuentra en el sexto carbono de la cadena de la misma cadena. El radical se llama omega-6. La fruta de fresa es una de las más populares alrededor del mundo, y es capaz de producir estos ácidos grasos en bajas cantidades. Es un fruto agregado con un alto número de aquenios. Además de su sabor, el alto valor nutritivo y fuente de antioxidantes, la fruta de fresa contiene hasta 780 $\mu\text{g/g}$ de ALA (omega 3) en los aquenios; de 450 a 100 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de antocianinas y 567 $\mu\text{g/g}$ de ácido ascórbico (vitamina C) entre otros antioxidantes. Con el propósito de incrementar los niveles de ALA en el fruto de fresa, en este experimento se aplicaron doce tratamientos de compuestos elicitores o bioestimulantes en forma de aspersion foliar en un diseño completamente al azar dentro de un invernadero ubicado en Huachichil, Coahuila, México.

La evaluación de los resultados se realizó por medio de PCR en tiempo real utilizando el gen ACO2 (encargado de la formación de la acetil-CoA, enzima involucrado en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados). De los resultados obtenidos el tratamiento que obtuvo una mayor sobreexpresión del gen ACO2 fue la aplicación de algas marinas [15 cm³ L⁻¹], donde el gen ACO2 incrementó su expresión 2.862 veces más respecto al testigo. Otros tratamientos que destacaron al superar al testigo fueron: Ácidos húmicos y fúlvicos [20 cm³ L⁻¹] con un incremento de la expresión de 1.805 veces, melaza [20 cm³ L⁻¹] 2.158 veces, ácido salicílico [1x10⁻⁴ M L⁻¹] 0.849 veces, ácido glutámico [1.96 g/L] 2.901 veces, y peróxido de hidrogeno 50% [30.014 x 10⁻⁴M] 0.475 veces.

PALABRAS CLAVE: ácido α -linoleico (ALA), PCR, gen ACO2, acetil-CoA.

ABSTRACT

Polyunsaturated fatty acids are found in fats and oils from both animals and vegetables. The main acids that stand out for their nutritional importance are eicosapentaenoic acid (EPA n-3) omega-3, decosahexaenoic acid (DHA n-3) omega 3 and arachidonic acid (ARA n-6) omega-6, which are biosynthesized from α -linoleic acid 18: 3 (ALA). In the structure of fatty acids, when the first double bond is located at the third carbon from the methyl group (CH₃) it is called omega-3 and when the double bond is at the sixth carbon of the chain from the same radical it is called omega-6. Strawberry fruit is one of the most popular around the world, and is able to produce these fatty acids in low amounts. It is an added fruit with a high number of achenes. In addition to its flavor, high nutritional value and source of antioxidants, strawberry fruit contains up to 780 $\mu\text{g} / \text{g}$ of ALA (omega 3) in the achenes; of 450 to 100 $\mu\text{g} / 100\text{g}$ of anthocyanins and 567 $\mu\text{g} / \text{g}$ of ascorbic acid (vitamin C) among other antioxidants. In order to increase ALA levels in the strawberry fruit, twelve treatments were applied in the form of foliar spray in a completely randomized design inside a greenhouse in Huachichil, Coahuila, Mexico. The evaluation of the results was carried out by real-time PCR using the ACO2 gene (involved in the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids). Of the results obtained, the treatment that obtained the highest overexpression of the ACO2 gene was the application of marine algae [15 cm³ L⁻¹], where the ACO2 gene increased its expression 2,862 times more than the witness. Other treatments that stood out when passing the control were: Humic and fulvic acids [20 cm³ L⁻¹] with an increase in the expression of 1,805 times, molasses [20 cm³ L⁻¹] 2,158 times, salicylic acid [1x10⁻⁴ M L⁻¹] 0.849 times,, glutamic acid [1.96 g / L] 2,901 times, and hydrogen peroxide 50% [30.014 x 10⁻⁴ M] 1.475 times.

KEY WORDS: α -linoleic acid (ALA), PCR, ACO2 gene, acetyl-CoA

INTRODUCCIÓN

La producción de fresa tiene una amplia distribución en el mundo, siendo los principales países productores: China, Estados Unidos, México, Egipto y Turquía. (Axayacatl, 2017). México es de los principales exportadores a nivel mundial con una producción anual de 468.25 mil toneladas de las cuales 52.20% son destinadas para la exportación. Se estima que para el 2030 la demanda mundial de fresa sea aproximadamente 34.44% mayor a la actual, mientras que la producción nacional en un crecimiento acumulado tiene la capacidad de incrementarse hasta 26.44% para el 2030 (Gallardo et al., 2017) Los cinco principales estados productores de fresa en México son Michoacán, Baja California, Guanajuato, Baja California Sur y Estado de México, en su conjunto, estas entidades aportan el 99% de la producción total (Martinez, 2017).

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs por sus siglas en inglés) son sumamente importantes para la salud, ya que proveen protección contra enfermedades cardiovasculares y favorecen el desarrollo del feto (NAPIER 2010; Saravanan *et al.*, 2010). El cuerpo humano sintetiza estos ácidos grasos en nula o pocas cantidades por lo que es imprescindible consumirlos en nuestra alimentación (NAPIER 2010). Los ácidos grasos más importantes para la salud son el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 Δ) y el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6), los cuales se sintetizan en bajas cantidades a partir del ácido α -linoleico (ALA; 18:3 Δ) (Ruiz-López *et al.*, 2014). En plantas, que a su vez también tiene aportes nutricionales, tiene mayor presencia en los vegetales como semillas de soya, nueces y aceite de canola (Pan *et al.*, 2012).

El acetil-CoA proveniente de los fotosintatos producidos en la fotosíntesis y es el precursor de ácidos grasos. La enzima del plástido piruvato dehidrogenasa provee la mayoría del acetil CoA (Hardwood, 2005) que ingresa a los dos sistemas enzimáticos encargados de la formación '*de novo*' de ácidos grasos en plantas, los cuales son la acetil CoA-carboxilasa (Gurr *et al.*, 2002; Page *et al.*, 1994) y ácido graso sintasa (Hardwood, 1995; Hardwood, 2005). Estos sistemas producen los ácidos grasos de cadena larga "palmitato" y "estearato". Posteriormente, estos

compuestos formarán cadenas de ácidos grasos de >18C como el ALA por medio de desaturación, elongación y otras modificaciones (Ruiz-López *et al.*, 2014).

El incremento en la demanda de EPA y DHA proveniente de peces marinos promueve la sobre-pesca, (Cressey, 2009) por lo que en conjunto con la preocupación ambiental se intensificó la búsqueda de nuevas fuentes de omega-3 (Tocher 2009). Como la producción de omega-3 en fresa está presente en bajas cantidades es posible incrementar su concentración con estímulo de enzimas o estrés oxidativo inducido para fomentar la producción ALA (Pan *et al.*, 2012). Se ha demostrado que el contenido de ALA en hojas incrementa con la activación de genes de defensa, y que por medio de estrés oxidativo inducido y controlado las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas, además de causar estrés oxidativo celular, también cumplen la función de señalización de estrés, así como segundos mensajeros en las sucesiones de transducción de señales en respuesta al estrés (Mittler 2002).

Con el uso de promotores de oxidación controlada, inductores químicos o naturales que funcionan como señalizadores, así como con el uso de ácidos orgánicos, húmicos y fúlvicos se ha reportado recientemente que es posible manipular los mecanismos de defensa de las plantas, los niveles de fitoquímicos específicos, de antioxidantes y de vitaminas (Lester, 2006; Dietrich *et al.*, 1999; Kocsy *et al.*, 2001; Benavides-Mendoza, 2002; Rosales-Velázquez *et al.*, 2006).

OBEJTIVO

Objetivo General

Analizar el cambio de expresión del gen ACO2 mediante PCR en tiempo real en respuesta a la aplicación de 12 compuestos elicitores o bioestimulantes con la finalidad de determinar indirectamente el incremento de la concentración de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en plantas de fresa cv. "Albión".

Objetivos Específicos

1. Establecer la técnica adecuada de extracción de ARN en el fruto de fresa.
2. Validar la amplificación del gen ACO2 mediante PCR en tiempo real utilizando iniciadores específicos.
3. Cuantificar la expresión del gen ACO2 mediante PCR en tiempo real en las plantas de fresa sometidas a los diferentes tratamientos.

Hipótesis

Al menos alguno de los tratamientos aplicados incrementará la expresión del gen ACO2 y como consecuencia aumentará la concentración de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en plantas de fresa, cv. "Albión".

REVISIÓN DE LITERATURA

La fruta de fresa es una de las más populares alrededor del mundo. Es un fruto agregado compuesto de un receptáculo agrandado con un alto número de aquenios que son la fruta verdadera (Hancock, 1999). Además de su sabor contiene un alto valor nutritivo y fuente de antioxidantes. La fruta de fresa contiene hasta 780 µg/g de ácido alfa linolenico (omega 3) en los aquenios; de 100-450 µg/100g de antocianinas y 567 µg/g de ácido ascórbico (vitamina C) entre otros antioxidantes (Oregon Strawberry Comission, 2014).

Por medio de ingeniería molecular se ha tratado de incrementar los contenidos de los ácidos grasos de interés (EPA y DHA) para la salud humana en vegetales a niveles similares a aquellos en peces, pero se ha comprobado que técnicamente es un gran reto (Ruiz-López *et al.*, 2014). En este sentido la modificación por medio de ingeniería genética no ha sido muy prometedora hasta ahora debido a que los niveles obtenidos en plantas transgénicas han sido relativamente bajos, <5% del total de ácidos grasos (Damunde y Kinney, 2008; Cheng, 2009). Además de que los productos genéticamente modificados requieren varios años en producirse y son costosos (Prado *et al.*, 2014), además de que no son totalmente aceptados por una gran parte de la población a nivel mundial por los posibles riesgos que pudiesen presentar a la salud humana y al medio ambiente (Riechmann, 2004).

Nutrición e Importancia de los Ácidos Grasos Omega 3

Los ácidos omega son ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en las grasas y los aceites tanto de animales como de vegetales se clasifican en base a su estructura química, la cual indica la posición de su primer doble enlace en referencia al último carbono, que se identifica con la letra griega omega (ω) y el número de carbonos presentes en la molécula (Alicia *et al.*, 2010; Oliva, 2013).

Los ácidos grasos poliinsaturados representan entre un 7-10% de la energía proveniente de la alimentación diaria (Instituto Superior de Ciencias Médicas Villa Clara 1997). Los principales ácidos que destacan por su importancia nutricional son el ácido eicosapentaenoico (EPA n-3) omega-3, el ácido decosahexaenoico (DHA n-3) omega 3 y el araquidónico (ARA n-6) omega-6, que son biosintetizados a partir

del ácido α -linoleico 18:3 (ALA) (Coronado *et al.*, 2006). El consumo de estos lípidos es de suma importancia debido a la incapacidad de cuerpo humano para sintetizarlos (Alicia *et al.*, 2010)

Se conocen dentro de los beneficios de los omega-3 una disminución en la viscosidad de la sangre al disminuir la cantidad de triglicéridos, esto trae en consecuencia una estabilidad en la hipertensión arterial, además son componentes estructurales del cerebro durante el embarazo (Isabel Castro-González Bióloga, 2002) Estudios realizados en roedores han demostrado que el consumo de ácidos grasos n-3 tienen un efecto en la disminución de tumores cancerígenos (Coronado Herrera *et al.*, 2006) Así mismo los omega 3 poseen efectos antiarrítmicos y antitrombóticos que alarga el periodo de sangrado impidiendo la adherencia de plaquetas en las arterias y disminuye la concentración de colesterol en plasma previniendo una arterosclerosis (Isabel Castro-González Bióloga, 2002).

Biosíntesis de Ácidos Grasos

El primer paso en el proceso de biosíntesis de ácidos grasos sucede dentro de la mitocondria (Figura 1), la enzima piruvato deshidrogenasa fracciona al piruvato para obtener acetil-CoA, sin embargo, la membrana mitocondrial es selectivamente permeable e impide la salida del acetil-CoA al citoplasma. Para salir, el acetil-CoA entra a una fracción del ciclo de Krebs para unirse con el oxaloacetato presente en la mitocondria y convertirse en citrato con la ayuda de la enzima citrato sintasa. Una vez en el citosol el citrato es dividido con la ayuda de la enzima citrato liasa para liberar acetil-CoA ("Metabolismo de Lípidos," 2010)

Esta reacción es llevada a cabo con una molécula de ATP y se obtienen nuevamente las dos moléculas constituyentes del citrato. En el citosol el oxaloacetato es transformado en malato mediante una reducción energizada por NADH+H utilizando la malato deshidrogenasa. Una vez formado el malato, la enzima málica y el NADP+ oxidado lo convierten en piruvato liberando en la reacción una molécula de CO₂ como resultado de la descarboxilación y una molécula de NADPH+H que será utilizada posteriormente en el proceso de biosíntesis de ácidos grasos. (de la Luz Velázquez Monroy & Ángel Ordorica Vargas, 2009)

Metabolismo de Lípidos

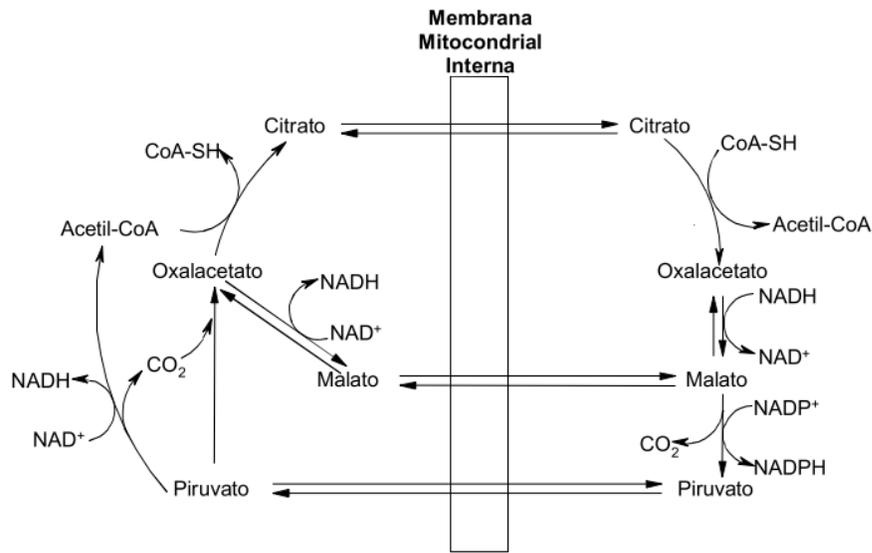


Figura 1. Transferencia de Acil-S-CoA desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial (Velázquez et al., 2009)

Para continuar con el proceso de formación de ácidos grasos es necesario un compuesto llamado malonil-CoA (Figura 2). Para fabricarlo entra en función un compuesto enzimático de gran importancia conocido como **Acetil-CoA carboxilasa** (compuesto por biotina, biotina carboxilasa, una proteína acarreadora de carboxibiotina, transcarboxilasa y un sitio alosterico regulador). La proteína acarreadora sujeta a la biotina y la dispone a la enzima biotina carboxilasa que se encarga de agregar un grupo carbonilo proveniente del bicarbonato utilizando ATP. Una vez realizada esta reacción la proteína acarreadora desplaza la biotina al sitio de acción de la transcarboxilasa, esta enzima sirve transferir el CO₂ a la acetil-CoA y formar el malonil-CoA. La biotina sirve como un transportador temporal del grupo carbonilo durante el proceso de fijación del dióxido de carbono (De & Leñero, 2009).

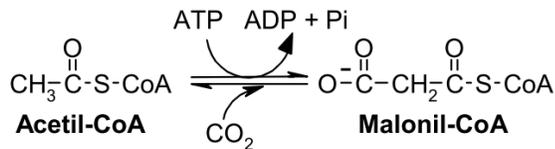


Figura 2. Formación del malonil-CoA (Velázquez et. al., 2009).

Es necesario activar las moléculas que servirán en los procesos subsecuentes de la lipogénesis, para ello se utiliza una proteína llamada “proteína acarreadora del acilo” (ACP) que se compone de 3 regiones, la primer parte es una proteína unida de forma covalente a una región protética la cual no está compuesta de aminoácidos y finalmente una región de anclaje donde se unirá la molécula a activar. En esta reacción la molécula de pierde la CoA-SH y recibe la proteína acarreadora del acilo. Sucede de la misma forma para la acetil-CoA (Figura 3) y para la malonil-CoA (Figura 4), lo que cambia es la enzima que se encarga de realizar el proceso. En el caso de la fijación del ACP a la molécula de malonil-CoA la enzima encargada es la malonil-CoA ACP transacilasa, esta enzima es específica para la molécula de malonil mientras que la enzima que trabaja con el acetil-CoA es multienzimatica, esto quiere decir que puede realizar la fijación del ACP a diferentes moléculas (“Metabolismo de Lpidos,” 2010).

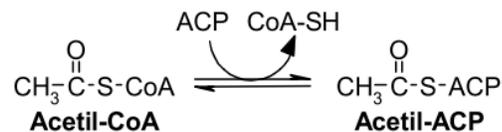


Figura 3. Activación del acetil-CoA con la proteína acarreadora del acilo (ACP) (Velázquez *et. al.*, 2009).

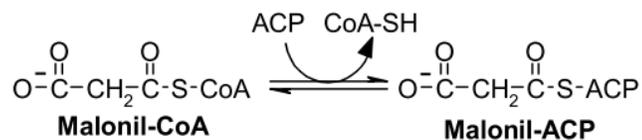


Figura 4. Activación del acetil-CoA con la proteína acarreadora del acilo (Velázquez *et. al.*, 2009).

Una vez cargadas las moléculas que servirán para la biosíntesis de ácidos grasos el complejo enzimático ácido graso sintetasa se encarga se formar únicamente palmitato también conocido como ácido palmítico, un ácido graso de 16 carbonos. En primer lugar, se realiza un proceso de condensación en el cual la acilmalonil ACP sintasa se encarga de unir una molécula de acetil-CoA y una de malonil-CoA, en

esta reacción se elimina una molécula de dióxido de carbono y simultáneamente se une el acetilo del ACP al C2 de la molécula de malonil. La molécula resultante, acetoacetil-ACP, es reducida de forma estereoespecífica por la enzima 3-cetoacil-ACP-reductasa que ocupa una molécula de NADPH⁺ para realizar la reducción y formar D-3-Hidroxiacil-ACP. En la tercera reacción, la deshidratación, la enzima D-3-hidroxiacil-ACP-deshidratasa se encarga de eliminar una molécula de H₂O. La molécula resultante se conoce como crotonil-ACP. Finalmente se realiza una segunda reducción energizada por NADPH⁺ con la acción de la enoil-ACP-reductasa que se encarga de eliminar el doble enlace restante para formar un acil-ACP saturado de 4 carbonos llamado butiril-ACP (Velázquez *et. al.*, 2009).

Para formar el palmitato (Figura 5), la ácido graso sintasa realiza 7 ciclos, para ello requiere 8 moléculas de acetyl-CoA de las cuales 7 son convertidas en malonil-CoA utilizando una molécula de ATP para cada conversión. Además, son necesarias 14 moléculas de NADPH⁺, dos por cada ciclo que realiza el complejo enzimático.

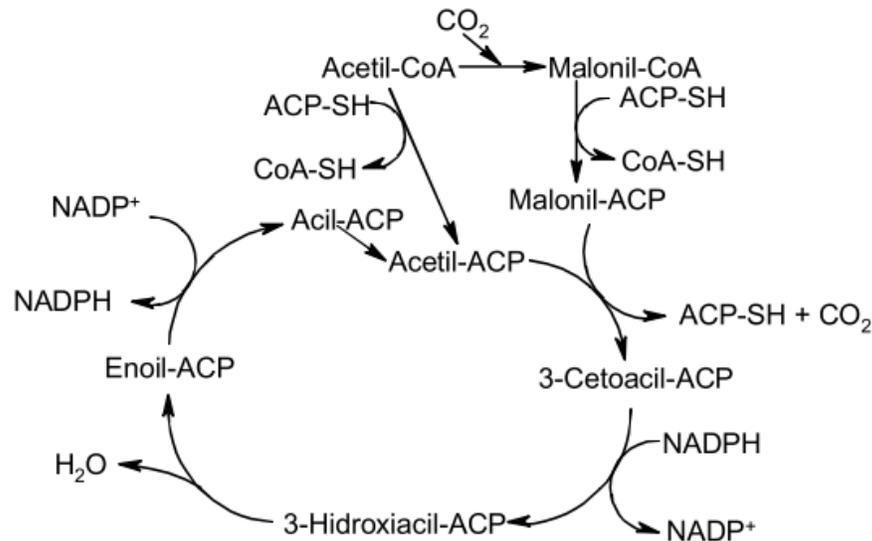


Figura 5. Formación del ácido palmítico (Velázquez *et. al.*, 2009).

Elongación de Ácidos Grasos: La ácido graso sintetasa genera ácido palmítico (C16) en forma de palmitil-CoA. Los ácidos grasos con cadenas más grandes se generan mediante dos sistemas de ácido graso elongasas independientes. En el caso de los mamíferos se utiliza acetyl-CoA como sustrato en el sistema de

elongación mitocondrial que se lleva a cabo en la mitocondria (por reversión de la β -oxidación, cambiando el cofactor $FADH_2$ por $NADPH$ en la reducción final). El sustrato utilizado para la elongación de ácidos grasos en los vegetales es malonil-CoA en el sistema de elongación microsomal (Figura 6) que tiene lugar en el retículo endoplasmático, donde todos los intermediarios se encuentran unidos a coenzima A. Este sistema es idéntico al de síntesis pero las enzimas son diferentes e independientes (Velázquez Monroy & Ordorica Vargas, 2009).

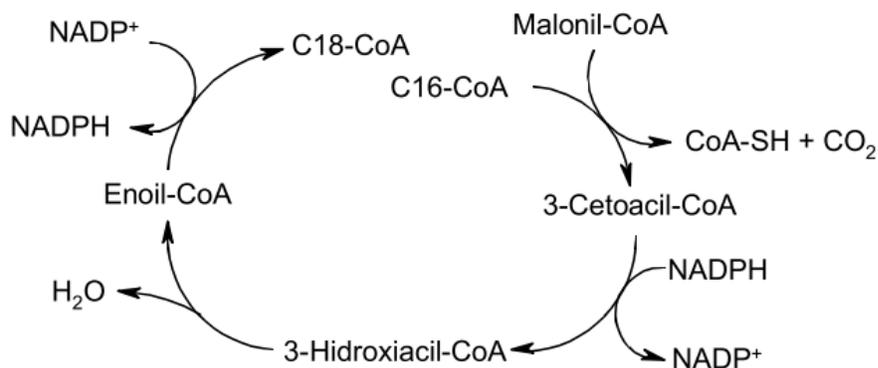


Figura 6. Sistema de elongación microsomal (Velázquez *et. al.*, 2009).

Insaturación de ácidos grasos: Para la síntesis de ácidos grasos insaturados, se usa un sistema microsomal de transporte de electrones que depende de $NADPH$ y O_2 (de la Luz Velázquez *et al.*, 2009). Una característica que poseen los vegetales es la capacidad de insertar dobles enlaces en los ácidos grasos gracias a la acción de las enzimas que presentan, entre el doble enlace del carbono 10 y el carbono metilo terminal.

Los nuevos dobles enlaces que son incorporados a la cadena del ácido graso están separados entre sí por un grupo metileno (interrumpidos por metileno). La enzima $\Delta 9$ desaturasa presente en los mamíferos les permite sintetizar la familia de ácidos grasos insaturados $\omega 9$ (ácido oleico, ácido palmitoleico etc.) mediante una combinación de alargamiento e insaturación de la cadena (De & Leñero, 2009).

Mientras que los vegetales tienen la capacidad de insertar dobles enlaces en los ácidos grasos entre el doble enlace del carbono 10 y el carbono metilo terminal debido a la acción de las enzimas que presentan (*Metabolismo de los Lípidos*. Facultad d, no date). Gracias a ello las plantas son capaces de sintetizar ácido linoleico ($\Delta 9,12$ C18:2) y ácido α -linolénico ($\Delta 9,12,15$ C18:3), necesarios para la síntesis de los otros miembros de las familias $\omega 6$ y $\omega 3$ (Figura 7).

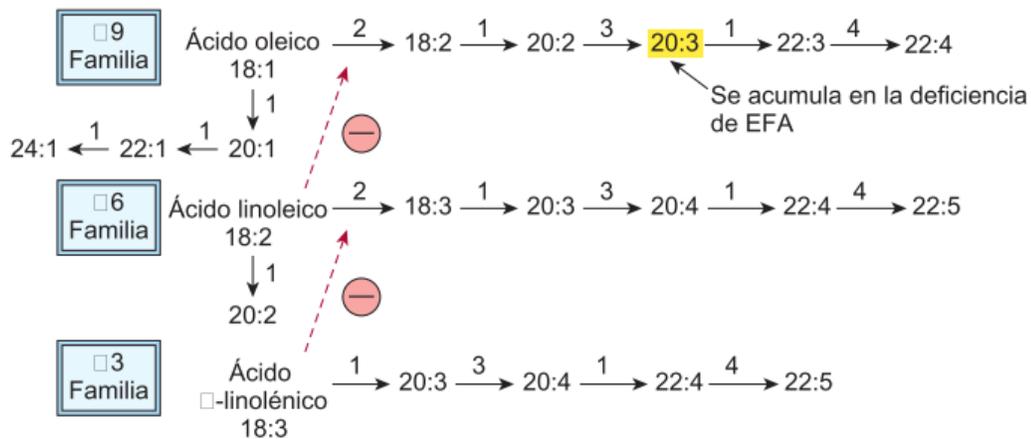


Figura 7. Biosíntesis de las familias $\omega 9$, $\omega 3$, $\omega 6$ de ácidos grasos poliinsaturados (De & Leñero, 2009).

Estrés

La productividad y la expansión territorial de los cultivos se ven constantemente amenazados por el estrés ambiental. Estudios estiman que tan sólo el 10% de la tierra arable se encuentra libre de estrés, 20% presentan deficiencia o toxicidad mineral, 26% se encuentra en condiciones de estrés hídrico y 15% bajo condiciones de congelación. (Blum, 1988)

El crecimiento, las interacciones con el medio ambiente y el desarrollo son algunas de las funciones más importantes que desempeñan las especies reactivas al oxígeno en las plantas. En el proceso de fotosíntesis y en el de respiración se producen grandes cantidades de ERO's (especies reactivas al oxígeno), no obstante, se mantiene un control de síntesis y depuración bajo un mecanismo de homeostasis oxido-reducción. Para mantenerse esta homeostasis existen dos

grupos de mecanismos antioxidantes: los mecanismos enzimáticos como es el caso de la catalasa, la superóxido dismutasa y las peroxidasas, y los mecanismos no enzimáticos como el glutatión y el ascorbato. Al generarse un desequilibrio entre la producción y la eliminación de las especies reactivas al oxígeno se genera el fenómeno que conocemos como estrés oxidativo (Miranda-ham & Castro-concha, 2009).

Un factor constante es la sobre producción de ERO's en la totalidad de las condiciones adversas independientemente de su naturaleza. (Inzé & Van Montagu, 1997). El estrés oxidativo es simplemente una alteración de la homeostasis REDOX intracelular, un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes. Debido a la elevada actividad de las especies reactivas al oxígeno y la ausencia de mecanismos que las depuren, las ERO's provocan alteraciones en la función y en la estructura de las células (Simontacchi M., 2001)

Especies reactivas de oxígeno: Uno de los gases más importantes y abundantes (21% de la atmósfera) del planeta Tierra es el oxígeno molecular (O_2), constituye cerca del 89% del peso del agua de mar y cerca del 47% de la corteza terrestre. Los seres vivos han evolucionado en base a estas condiciones, utilizando el oxígeno para respirar y obtener energía. Por otra parte, de esta molécula derivan las EROs. Dada su función en la producción de energía química, las mitocondria es considerada la fuente principal de las especies reactivas al oxígeno (Macedo-Márquez, 2012). Las especies reactivas al oxígeno se dividen en dos grupos: los radicales de oxígeno como el hidroxilo ($OH\cdot$), el superóxido ($O_2\cdot^-$), y el peróxido, y las moléculas no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singulete (O_2) Un radical libre es una especie cualquier con la capacidad de existir de manera independiente y que posee uno o más electrones no apareados (electrones que se encuentran solos ocupando un orbital atómico o molecular). Los radicales se forman a través de diferentes mecanismos que incluyen la adición de un electrón a un no-radical. Un ejemplo de ello es el oxígeno molecular, no posee un apareamiento completo de sus electrones. Sus dos electrones tienen el mismo número cuántico de spin, es decir, sus spins son paralelos; de aquí su gran

capacidad para reaccionar con la mayoría de las moléculas que no son radicales (Halliwell, 2006)

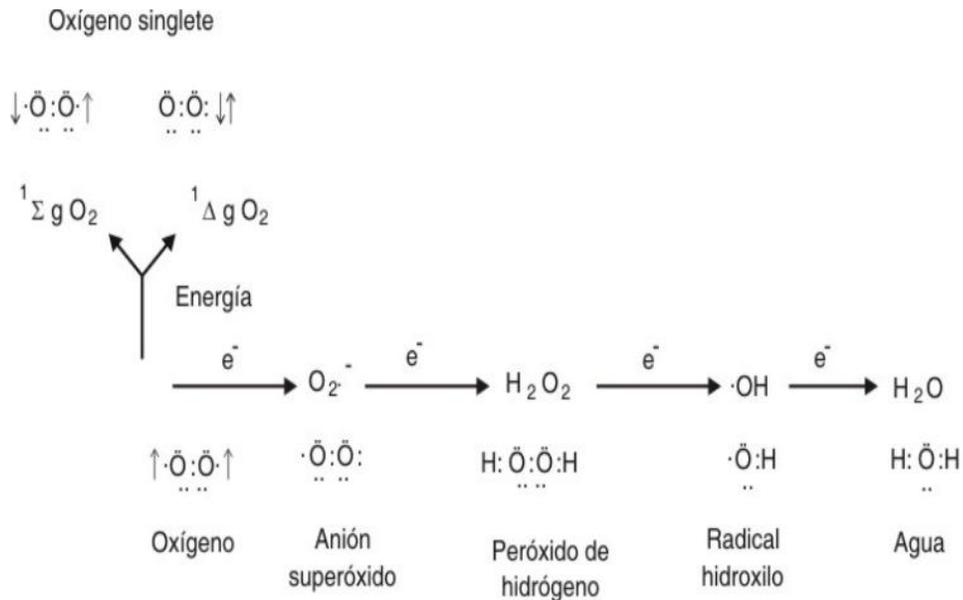


Figura 8. Principales especies reactivas de oxígeno.

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se genera bajo condiciones desfavorables para la planta, estas condiciones bien pueden ser bióticas, por acción de otros seres vivos o abióticos, por excesos o limitaciones en el medio ambiente físico y químicos que les rodea. (Inzé & Van Montagu, 1997)

Estrés biótico: en su mayoría causada por patógenos. Existe una reacción conocida como explosión oxidativa, es una de las respuestas más rápidas de defensa que se basa en la producción de especies reactivas al oxígeno, principalmente superóxido y peróxido de hidrógeno en el lugar afectado por el patógeno. La relación que existe entre la planta y el patógeno puede ser de compatible, donde el patógeno infecta la planta provocándole una enfermedad, o incompatible, en la que los mecanismos de defensa de la planta impiden su entrada o establecimiento. En este último caso entra en función un sistema llamado “resistencia sistémica adquirida” en el cual las células afectadas por el patógeno se comunican con las células y tejidos

adyacentes a través de señales que activan la producción de compuestos bioquímicos para evitar la diseminación del patógeno. Este sistema se denomina resistencia sistémica adquirida (Cabrera-De la Fuente, *et. al.*, 2006)

Estrés abiótico: En condiciones normales la regulación de síntesis y degradación de las especies reactivas del oxígeno se encuentra estrictamente regulada, y se encuentran en constante producción en los peroxisomas, la mitocondria y el cloroplasto. No obstante, este equilibrio se puede ver alterado por factores externos, como son los cambios fisicoquímicos del medio ambiente que provocan déficit hídrico, altas temperaturas, la salinidad, un aumento en la intensidad de la radiación, o falta de oxigenación en las raíces (anaerobiosis). Dentro de los factores mecánicos se pueden manifestar fuertes vientos, compactación del suelo y lesiones a los tejidos de las plantas, entre otras. Por otro lado la deficiencia de los elementos macro y micro nutrientes, la presencia de contaminantes inorgánicos como los metales pesados, NOX, O3 y SO2 y orgánicos como los compuestos bifenilos policlorados (BPC), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) o los clorofluorocarbonados (CFC), son conocidos como factores químicos estresantes. Generalmente se presentan combinaciones de más de 2 condiciones a la vez (Cabrera-De la Fuente, *et. al.*, 2006)

Metabolitos

El metabolismo de las plantas es un sistema complejo de producción y degradación de compuestos orgánicos. Estos compuestos son conocidos como metabolitos, y han sido estudiados desde la segunda mitad del siglo XIX (Croteau, Kutchan, & Lewis, 2000). Esta diversidad bioquímica es el resultado de la co-evolución entre plantas y el medio ambiente en el que viven. (Rausher, 2001). En la actualidad no existe una diferenciación entre ellos, sin embargo hay una clasificación que se divide en: metabolitos primarios (lípidos, carbohidratos y proteínas) y metabolitos secundarios (terpenos, cumarinas, flavonoides, alcaloides, entre otros). Existe una amplia variedad de metabolitos secundarios (80 mil aproximadamente) y constantemente se

caracterizan casi 4 mil al año, debido a su vasta diversidad los usos y aplicaciones de estos compuestos tienen un aporte en diversos campos de estudio. (Theis & Lerda, 2003)

Producción de Metabolitos La información genética se ve influenciada por el medio ambiente y se encarga de la síntesis de metabolitos que en consecuencia modulan el crecimiento, y desarrollo de las plantas. En la búsqueda por aumentar a producción de los compuestos metabólicos se han implementado tecnologías de mejoramiento genético como es el caso del aumento genotípico (heredable) y por otro lado el aumento fenotípico (no heredable) que se implementa como el manejo y manipulación de los factores ambientales como la temperatura, la humedad, la salinidad del suelo, la nutrición etc. Dentro de las tecnologías implementadas para el aumento del fenotípico, se propone que se pueden inducir respuestas en el crecimiento de las plantas y la síntesis de metabolitos, mediante la aplicación exógena de compuestos, evocadores o precursores. (Benavides Mendoza, 2002)

Ácidos orgánicos

Los compuestos resultantes del metabolismo son productos carbonados, en su mayoría orgánicos que se denominan ácidos orgánicos. Dentro de esta clasificación de compuestos se encuentra el ácido salicílico y su precursor el ácido benzoico, ambos actúan como activadores o promotores de la oxidación controlada (POC) (Benavides Mendoza, 2002a). Aplicaciones de ácido glutáminico parece jugar un papel de precursor energético (Steer y Breves, 1966), incluso como sinergista que en la combinación con otros compuestos pueden aceleran la producción y concentración de los metabolitos de interés (Sandoval y Kamara, 2002).

Ácido Glutámico

El ácido glutámico (Figura 9). Se deriva del ácido α -ceto glutárico en el ciclo de Krebs, y a su vez es precursor de glutamina, sustrato de otros aminoácidos, proteínas y ácido delta-aminolevulínico que da origen a clorofila y fitocromos.

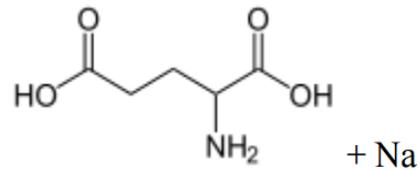


Figura 9. Estructura química del ácido glutámico

Una de las amidas más importantes en las plantas es la glutamina (Figura 11), la cual se forma gracias a la acción de la enzima glutamato sintetasa que se encarga de la adición de un grupo amino (NH_2), derivado del amonio (NH_4^+), al grupo carboxilo más lejano del carbono alfa formando un enlace amida en la estructura del ácido glutámico ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$). Posteriormente la glutamina sede su grupo amida al carbono carbonílico del ácido cetoglutárico obteniendo 2 moléculas de ácido glutámico, una de ellas es necesaria para mantener la reacción mientras la otra puede entrar directamente a la síntesis de otros compuestos, parte del glutamato se trasporta hacia otros tejidos, en donde se utiliza de manera similar en procesos de síntesis.

El hierro en las plantas

El hierro forma parte estructural de los quelatos y fitoferritina., (Sánchez, 2007).

En condiciones de crecimiento controladas, aproximadamente el 80% del hierro está localizado en los cloroplastos en forma de ferredoxina, la ferredoxina actúa en varios procesos metabólicos como la fotosíntesis y la reducción del nitrógeno (Alegría, 2016). El hierro destaca del resto de los micronutrientes por ser el que se requiere en mayor cantidad. Puede ser absorbido como Fe III-ión férrico y como FeII- ión ferroso, esta última forma de hierro se absorbe mayor facilidad debido a su solubilidad. El Fe se acumula en las hojas más antiguas y es relativamente inmóvil en el floema por la formación de óxidos o fosfatos férricos, aunque esta cuestión no está suficientemente dilucidada (Azcón-Bieto & Talón, 2003).

En una amplia cantidad de organismos gran porcentaje del Fe está asociado con las porfirinas. En las plantas, los citocromos son las moléculas más comunes que contienen porfirinas. Los citocromos son fundamentales en los sistemas respiratorio y fotosintético y su propiedad más importante, la función redox, se deriva de la capacidad del Fe de ser oxidado de manera reversible de Fe (II) a Fe (III). Esta capacidad permite realizar reacciones redox rápidas por transferencia de electrones (Benavides Mendoza, 1999). Existe una serie de enzimas en las que el hierro actúa como un componente metálico redox o como un elemento de unión entre enzima y sustrato. Un ejemplo de ello son las lipoxigenasas que regulan la peroxidación de lípidos, por lo que están implicadas en la senescencia. El principal efecto de la deficiencia de hierro en hojas se produce en los cloroplastos, se reduce el número de tilacoides y granas, y se altera la estructura del tilacoide. La reducción en la membrana del tilacoide va acompañada de una disminución en todos los pigmentos que recogen la luz lo que en consecuencia provoca una reducción en la capacidad fotosintética de la planta que se traduce en una disminución de azúcares y almidón, con la consiguiente alteración en la síntesis de proteínas, y enriquecimiento de los lípidos en ácidos grasos insaturados. Al igual que las raíces, en hojas y savia del xilema se acumulan ácidos orgánicos, principalmente citrato y malato, y se incrementa la actividad de PEPC y de distintas enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos como malato deshidrogenasa (MDH), citrato sintetasa, isocitrato

deshidrogenasa etc. El enzima PEPC cataliza la incorporación de bicarbonato en un ácido orgánico C3, fosfoenol piruvato, generando oxalacetato, que es transformado a malato por malato deshidrogenasa. (Juárez et al., , 2015)

Dentro de las funciones de hierro en las plantas son tres las más relevantes. Es un componente estructural de las moléculas de porfirina: citocromos, hem, hematina, ferricromo, hemoglobinas animales y vegetales. Involucrado en reacciones de oxidación-reducción en la respiración y la fotosíntesis. En segundo lugar es un componente estructural de moléculas no hem: ferredoxinas y proteínas. Y finalmente forma parte de varios sistemas enzimáticos: citocromo oxidasa, catalasa, peroxidasa, aconitasa, desaturasas de ácidos grasos, síntesis de clorofila, peptidilprolina hidrolasa, nitrogenasa, etc (Benavides-Mendoza, 1999).

El Cobre en las Plantas

El Cu es absorbido como catión divalente (Cu^{2+}) en suelos oxigenados o como ion cuproso (Cu^+) en suelos con poca aireación. La forma divalente fácilmente forma quelatos lo que pueden generar estados de toxicidad si no son tomados en cuenta (Azcón-Bieto & Talón, 2003).

Azcón-Bieto y Talón (2003) explican que la esencialidad del Cu radica en su presencia en diversas proteínas y enzimas implicadas en procesos de óxido-reducción. Como la plastocianina, una proteína cloroplástica que interviene en la transferencia de electrones del fotosistema I y II. El cobre también se encuentra en la enzima respiratoria citocromo oxidasa que cataliza la transferencia de electrones hasta el oxígeno en las crestas mitocondriales. El Cu es un componente del complejo polifenol oxidasas, que se involucra en la biosíntesis de lignina y alcaloides y en la formación de sustancias melanóticas, que actúan como fitoalexinas inhibiendo la germinación de esporas y el crecimiento de hongos” (Alegría 2016). También es constituyente de ascorbato oxidasa, cresolasa, tirosinasa e interviene en los procesos de, regulación hormonal, fijación de nitrógeno y el metabolismo de compuestos secundarios (Sánchez, 2007).

En condiciones de deficiencia, disminuye la actividad enzimática drásticamente que se correlaciona con la acumulación de fenoles y disminución de la formación de

sustancias melanóticas. En notable el desecamiento de las partes jóvenes de la planta debido a las dificultades en el transporte del agua por insuficiente lignificación del xilema. Disminuye la tasa fotosintéticas y en consecuencia bajan los niveles de carbohidratos (Alegría, 2016).

Ácido salicílico

El ácido salicílico (AS), también conocido como ácido otoxibenzóico es derivado de la fenilalanina, es un compuesto fenólico simple; su estructura química es el ácido 2-hidroxibenzoico y su fórmula molecular: $C_7H_6O_3$ (Cuéllar *et al.*, 2008). Algunos de sus derivados tienen aplicaciones médicas por sus propiedades analgésicas, un claro ejemplo de ello es el ácido acetil salicílico también conocido como aspirina. El ácido salicílico en las plantas tiene campo de acción reducido como regulador de crecimiento. En ciertos casos actúa en un efecto cadena al inhibir o estimular la biosíntesis de bioreguladores que se encuentran directamente relacionados con algún proceso fisiológico en específico. En el caso del etileno, la presencia de AS interrumpe su síntesis de tal forma que la senescencia de las hojas se retrasa así como la inducción floral (Martínez *et al.* 2004).

Funciones del AS en las plantas

La función más estudiada de este compuesto es como elicitador, es decir, como señalizador en la respuesta de las plantas para generar moléculas de defensa y la regulación sistémica desencadenada por el ataque de algún patógeno (Dong 2004; Shah 2003). Se ha determinado que es necesario un aumento en la cantidad de AS en los tejidos para manifestar la sintomatología de un ataque de hongos y bacterias cuando estos invaden la planta, además, esto coincide con la expresión de los genes que se tienen reconocidos como de defensa, estos genes se encargan de codificar las proteínas ligadas a la patogenicidad. Wildermuth demostró la correlación y función del AS con la aplicación de agentes que bloquean la síntesis de AS o la expresión de los genes que codifican enzimas para su degradación (Wildermuth, Dewdney, Wu, & Ausubel, 2001)

Por otra parte, las aplicaciones exógenas de la hormona AS tienen la capacidad de inducir el sistema de defensa proteico relacionado con la patogenicidad e incluso

fortalecer la resistencia contra patógenos. Cuando la concentración de AS en el área infectada es elevada se activa una señal sistémica que se cree que puede ser metil-salicilato, que funciona para provocar una respuesta sistémica adquirida ligada a la expresión de genes de resistencia en sitios lejanos al infectado (Dempsey 1999).

Concentraciones de 10^{-5} M generaron una actividad mayor de la enzima nitrato reductasa en un estudio realizado en la producción y parámetros de cosecha del cultivo de mostaza. El nitrógeno es un elemento fundamental para la síntesis de aminoácidos y sistemas enzimáticos (Friedman, 2004). El nitrógeno participa en la producción de la clorofila, que es una molécula indispensable de la fotosíntesis, una mayor cantidad de este compuesto favorece el desarrollo vegetativo de las plantas (Bartolini, 1989).

Un estudio realizado en plantas de chile jalapeño reportó una respuesta significativa en la producción de biomasa foliar y radicular con aplicaciones de AS en dosis menores a 1×10^{-7} y 2×10^{-7} M (Sánchez, 2011). Yanexis (Carrasco, 2008) reporta que al aplicar AS también hubo un aumento generalizado de la biomasa de la planta de tomate, así como un mayor diámetro ecuatorial de fruto, aumento en el número de flores y frutos por planta y en la producción en kg/planta.

Anchondo et al., (2011) reporta que al realizar una aspersión por semana de AS, durante ocho semanas, en concentraciones de 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} M. Se registraron cambios a los 40 días en el crecimiento vertical de la planta y el aumento en el número de hojas en el cultivo de fresa. Por otro lado una investigación en crisantemo realizada por Villanueva *et al.* (2009) reporta que aplicaciones foliares de AS asperjado en concentraciones de 10^{-8} y 10^{-10} M crisantemo da como resultado un incremento en el diámetro de tallo en referencia al testigo.

Melaza

La melaza es el término conocido del producto líquido obtenido de la elaboración de azúcar. Es el resultado de la cristalización continua, la materia pasa por un proceso de evaporación seguido de la cristalización, generalmente se repite 3 veces hasta que la viscosidad de las melazas y el azúcar invertido (hidrolizarían de la sacarosa en sus dos unidades de glucosa) no permitan una cristalización adicional de la

sacarosa (Swan, 1990) El producto conocido como melaza es una mezcla compleja de carbohidratos, minerales y otros compuestos solubles en álcali, que se encuentran en el extracto líquido de la caña de azúcar, adicionado a los productos formados durante el proceso de elaboración del azúcar. En una evaluación realizada en la utilización de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* se encontró que además de las azúcares fermentables de la melaza (sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa) también contiene sustancias reductoras no fermentables (Castillo *et al.*, 2007). Estos compuestos no fermentables son principalmente carbohidratos libres de nitrógeno productos de las altas temperaturas utilizadas en la manufactura del azúcar más las melanoidinas ricas en nitrógeno que provienen de la condensación del azúcar y amino compuestos (Honig, 1969).

Cuadro 1. Composición de la melaza de la caña de azúcar (Téllez, 2004).

COMPONENTES	CONSTITUYENTES	CONTENIDO
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60%-63%
	Azúcares reductores	3-5 %
	Sustancias disueltas (diferentes azúcares)	4-8 %
	Agua	16 %
	Grasas	0.4%
Componentes mayores	Cenizas	9%
Contenido de minerales	Calcio	0.74%
	Magnesio	0.35%
	Fósforo	0.08%
	Potasio	3.67%
	Glicina	0.10%

Contenido de aminoácidos	Leucina	0.01%
	Lisina	0.01%
	Treonina	0.06%
	Valina	0.02%
Contenido de vitaminas	Colina	600 ppm
	Niacina	48.86 ppm
	Ácido pantoténico	42.90 ppm
	Piridoxina	44.00ppm
	Riboflavina	4.4 ppm
	Tiamina	0.88 ppm

La incorporación de melaza al suelo tiene un efecto repelente para el control de hormigas, y existen indicios de que es una fuente de energía para las raíces en momentos de estrés (USAID, 2006). La función principal de la melaza es el aporte energético que sirve para la activación del metabolismo microbiológico del suelo, potencializa la fermentación y provee elementos en pequeñas cantidades como zinc, potasio, boro, magnesio, fosforo, calcio, y fierro (Restrepo Rivera, 2007).

Macías (2014) reporta, con diferencia estadísticamente significativa, que al aplicar melaza a razón de 8 y 16 L⁻¹/ Ha⁻¹/semana, aumenta el peso de fruto de 17.6% a 24.6% respecto al testigo en el cultivo de chile habanero (*Capsicum chinense*). En el cultivo de cebolla (*Allium cepa*) retarda la marchitez de parte aérea de planta que sirve como indicador para su cosecha. La incorporación de melaza en dosis de 0.5 a 10 ml/Kg de suelo reducen el ataque de nematodos (Sosa, 1973)

Sustancias Húmicas

Desde hace tiempo se conocen los beneficios que aportan las sustancias húmicas al suelo siendo estas el componente principal de la materia orgánica en él. Además, se han utilizado en distintas ramas de la ciencia aplicadas en la agricultura para favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas (Tan, 1998).

Existe una clasificación de las sustancias húmicas realizada por Justus von Liebig (1840) basada en su solubilidad en medios alcalinos, neutros y soluciones acidas. Von Liebig descubrió que tanto los ácidos húmicos como las huminas no eran completamente solubles en soluciones de tipo alcalino o ácido, mientras un tercer grupo era muy soluble en todos los medios de pH: alcalino, ácido y neutro. A este grupo lo llamó AF. Las sustancias húmicas provienen de la descomposición químico-microbiana de animales y vegetales. Se caracterizan por su color oscuro, pH bajo y elevado peso molecular. Hoy en día la clasificación más utilizada para estos compuestos se fundamenta en las diferentes solubilidades en agua en diferentes rangos de pH. (Aiken *et. al.*, 1985; Stevenson *et. al.*, 1994)

1. Ácidos húmicos: Fracción insoluble en medio ácido, pero soluble en medio alcalino.
2. Ácidos Fúlvicos: Fracción soluble en medios ácidos como en alcalinos.
3. Húmina: Fracción insoluble en cualquier valor de pH.

Composición y Estructura

Las sustancias húmicas poseen muchas estructuras aromáticas en forma de anillos que se encuentran relacionadas entre sí y otras cadenas alifáticas que dan origen a moléculas de mayor tamaño y masa variable. Teniendo en cuenta la amplia variedad de reacciones y combinaciones que se llevan a cabo en la formación de estas sustancias, resulta difícil definir con claridad su composición (Hayes, 1997).

Por otra parte, existen estudios en suelos provenientes de distintas regiones con diferentes climas que han demostrado que los ácidos fúlvicos contienen una proporción mayor de Oxígeno y Azufre, y en menor cantidad Nitrógeno, Carbono e Hidrógeno respecto a los Ácidos Húmicos (Senesi & Loffredo, 1999).

Los ácidos húmicos destacan por su alto y heterogéneo peso molecular, oscilan entre 5,000 Da y 1,000,000 Da, mientras que los ácidos fúlvicos tienen un peso molecular menor y homogéneo que varía entre 500 Da y 5000 Da. (Aiken, *et. al.*, 1985) Las estructuras de los AH son más complejas que los AF (Calace *et. al.*, 2000). Gracias a su elevado contenido de los grupos carboxílicos (-COOH) e hidroxílicos (-OH) los AF duplican la acidez total de los AH, pueden ir de 900-1400

cmol/Kg y de 500-870 cmol/Kg respectivamente. Estas diferencias se relacionan con grupos funcionales oxigenados siendo la proporción O:C 0,5 para AH y 0,7 para AF, así como la relación H:C que indica el carácter alifático para AH y AF de 1.0 y 1.4 respectivamente (Steelink, 1985; Stevenson *et. al.*, 1994).

Las estructuras de los AH y AF generalmente presentan grupos funcionales alcohólicos y fenólicos, cetónicos y quinónicos. A pesar de los efectos favorables que poseen tanto los AH como los AF para la planta y el suelo, sus diferentes propiedades físico-químicas hacen que resulten unos más eficientes para determinadas situaciones que otros (Stevenson *et. al.*, 1994)

Ácidos Húmicos y Fúlvicos en las Plantas

Las sustancias húmicas se han estudiado exhaustivamente y han demostrado tener una capacidad de transporte y fijación de minerales del suelo a las plantas. Los AF tienen una mayor absorción y capacidad de intercambio catiónico que los AH. Por otro parte los AF son responsables de quelatar y movilizar iones metálicos, incluyendo Fe y Al (Bocanegra *et. al.*, 2006; Silva *et. al.*, Navarrete *et. al.*, 2004)

Narro (1987) menciona que los AH favorecen la permeabilidad de la membrana celular permitiendo una mejor asimilación de nutrimentos por parte de las raíces y de las hojas. También favorecen el movimiento de elementos mayores y elementos menores en el interior de planta mejorando la nutrición de la misma; aumentan la concentración de clorofila acelerando el proceso fotosintético, lo que se ve relegado en el crecimiento y la producción (Narro, 1987).

Un estudio realizado en lechuga hidropónica reporta que no se observaron cambios en la calidad y el diámetro de la planta al realizar aplicaciones de ácidos húmicos Días *et al.* (2009). Flores (1993) explica que los ácidos húmicos son activadores y estabilizadores enzimáticos. Fortalecen la recuperación de plantas jóvenes recién plantadas y estimula el crecimiento foliar y del sistema radical. Los AH presentan efectos favorables en la planta como el traslado de nutrimentos desde las raíces hasta la parte aérea y del exterior de las hojas hasta los lugares de acumulación. Dado su pequeño tamaño molecular, los AF pueden pasar a través de microporos de la membrana y llegar hasta el plasmalema de las células, mientras que los ácidos

húmicos solo se relacionan con la pared celular (Nardi *et al.* 2002). La capacidad combinada de AF para moverse a través de las membranas ha sugerido que los AF pueden desempeñar un papel similar a quelatos naturales para la movilización y transporte de Fe y otros micronutrientes. También pueden permanecer en solución del suelo incluso a altas concentraciones de salinidad y en una amplia gama de pH. Por lo tanto, tienen la ventaja de una larga duración para interactuar con las raíces de las plantas (Bocanegra *et al.* 2006).

Magañas (2015), reporto que la aplicación de AH y AF en lechuga hidropónicas para aumentar número de hojas, nos dice que la calidad de la lechuga no se ve afectada por dicha aplicación. Por otra parte, Suh *et al.* (2014), quienes reportan que el incremento de la concentración de AH y AF, aplicados de manera foliar al tomate afecta disminuyendo la altura de la planta y el rendimiento en el fruto. Por otra parte Pimienta (2004) reporta que al realizar un estudio sobre la fertilización completa y diferentes porcentajes de AH y AF su análisis de varianza muestra que para la variable diámetro de tallo en el cultivo de tomate en invernadero, existe diferencia altamente significativa entre sus tratamientos, con un diámetro promedio de 3.26 mm más sobresaliente a diferencia del testigo.

Algas marinas

Las algas de mar son organismos que carecen de raíz, tallo y hojas, a este grupo de plantas se le conoce como talofitas y pueden ser unicelulares o pluricelulares. Se desarrollan en un medio acuoso, ya sea dulce o salino, y generalmente tienen actividad fotosintética. En el caso de los especímenes pluricelulares el tallo se encuentra en forma de filamento y puede presentar ramificaciones ramificado (Robledo, 1997).

Se clásica taxonómicamente en 3 grupos que se distinguen por color como resultado de la concentración de pigmentos vegetales como carotenoides, ficobilinas y clorofilas (Quitral, Morales, Sepúlveda, & Schwartz, 2012).

1. Verdes (Chlorophyceae)
2. Pardas (Phaeophyceae)
3. Rojas (Rhodophyceae)

Representan un recurso de gran importancia para la alimentación marina, humana y animal. Además son utilizadas en diferentes industrias para la elaboración de fertilizantes y como una fuente de ficocoloides tales como agar, ácido alginico y carragenina (Sathya et al., 2010).

Las algas tienen la capacidad de adaptarse a una gran variedad de ambientes, desde temperaturas estables hasta condiciones extremas, incluso en superficies expuestas a la desecación, como el caso de las rocas. Pueden sobrevivir a fuentes termales, y la nieve. Es común encontrarlas en lugares oscuros a grandes profundidades gracias a su alta flexibilidad de adaptación (Erulanet et al., 2009) La mayoría de las algas marinas utilizan como materia prima el dióxido de carbono para la formación de sustancias ricas en carbono y compuestos inorgánicos hidrosolubles gracias al proceso de fotosíntesis, donde la molécula de clorofila actúa como procesador de la energía lumínica para la elaboración de estos compuestos. A diferencia de las plantas terrestres, no poseen tejidos de conducción ni de sostén, su posición erecta se debe a la baja acción de la gravedad ejercida sobre ellas al vivir en el agua (Abowei et al., 2013)

Extractos de algas marinas

Los extractos de algas marinas utilizados en la agricultura son materiales bioactivos hidrosolubles, se utilizan como fertilizantes orgánicos que estimulan la germinación, el desarrollo y la producción en las plantas. Además, contienen macro y micro elementos indispensables para la nutrición, amino ácidos, vitaminas, y reguladores de crecimiento como Auxinas, Citocinas y ABA (Ácido Abscisico) (Zhang, Ervin, & Schmidt, 2003; Zhang & Schmidt, 2000). Los extractos de algas son un importante recurso renovable para la fertilización, rico en reguladores de crecimiento naturales, siendo esto un aspecto importante respecto a las prácticas agrícolas sostenibles con el medio ambiente (Hong, 2007).

La incorporación de extractos de algas al suelo favorece la producción y la calidad de frutos, no sólo gracias a su aporte de todos los elementos mayores y menores que requiere la planta, sino también por su contenido de compuestos naturales que tienen un comportamiento similar a los promotores de crecimiento, dentro de los ya

identificados se encuentran algunos agentes quelatantes como ácidos algínicos, ácidos fúlvicos y manitol así como vitaminas, enzimas y algunos compuestos biosidas que ayudan al control de enfermedades y plagas de las plantas (Canales López, 2000; J. Crouch & van Staden, 1993).

Se han realizado experimentos con diferentes productos hechos a base de algas marinas. Alberto Ramírez (2015) reporta que aplicando dosis menores a 5 ml/L^{-1} de Algaenzims^{MR} en un estudio realizado para analizar el comportamiento de Tomate var. Rio Grande bajo condiciones de invernadero se produce un aumento en área foliar, con un 18.28% superior al testigo. Romeo Guillen (Guillen Coutiño, 2011) evaluó diferentes concentraciones de los productos Algaenzims^{MR}, Algaroot^{MR}, y Turboenzims^{MR}, encontrando una diferencia estadísticamente significativa respecto al número y diámetro de tallos en el cultivo de Papa variedad Norteña, donde el tratamiento con mejores resultados fue el Algaenzims^{MR} aplicados a una dosis de $2 \text{ L}^{-1} / \text{Ha}^{-1}$ durante la siembra más 1 L^{-1} aplicado de manera foliar a los 45 días después de siembra.

Algunos estudios reportan un desarrollo de tolerancia al estrés en las patatas, mejor absorción nutrimental en el suelo y un aumento en la concentración de propiedades antioxidantes con la aplicación de extractos de algas marinas. (N. Verkleij, 1992; Turan & Köse, 2004).

El efecto benéfico que se consigue con la incorporación de extractos de algas es resultado de diversos compuestos que actúan de forma sinérgica en diferentes concentraciones (Fornes, Sánchez-Perales, & L. Guardiola, 2002). La reciente tendencia de los últimos años en la utilización de productos orgánicos ha hecho notar un aumento en el uso de extractos de algas marina debido a su potencial de ser utilizado en la agricultura como alternativa al uso de fertilizantes químicos contaminantes y para promover una mejor absorción nutrimental por parte de la planta. Además, son biodegradables, no tóxicos ni contaminantes para personas y animales (Dhargalkar & Pereira, 2004).

Expresión génica

El ácido ribonucleico es un polímero que se compone de un azúcar de cinco carbonos conocido como ribosa, de uno a tres grupos fosfatos y un ácido nucleico, que puede ser adenina, guanina, citosina o uracilo. A diferencia del ADN, el ARN presenta una sola hélice en su estructura, esta característica física le permite al ARNm salir de la membrana nuclear a través de sus poros nucleares. Existen principalmente 4 tipos de ácidos ribonucleicos: el ARN-mensajero encargado de codificar la información genética del ADN al exterior del núcleo, el ARN-transferencia que funciona como facilitador de aminoácidos al complejo ribosomal, ARN-ribosomal que ayuda al ARNm a situarse en el lugar específico para interpretar la secuencia y ARN-interferencia, conocidos también como no codificantes, estos sirven como reguladores de la expresión génica y a pesar de que no están involucrados en la síntesis de proteínas, tienen una función muy importante en la formación de tejidos. (Horowitz et al., 2004).

El ARN es un material susceptible a la degradación debido a la acción de las ribonucleasas (ARNsas). Por esta razón, requiere de una adecuada toma de muestra, condiciones de frío durante la manipulación, conservación y trabajo de meseta con el objetivo de inhibir la degradación enzimática. En general, se obtiene muy poca cantidad de este material por lo que cuantificarlo implica perder una parte apreciable” (Díaz-Alonso et al., 2013)

Un gen es una cadena de nucleótidos que contiene una región que codifica para una molécula de ADN. Empieza con un promotor y termina en una región de terminación, existen secuencias regulatorias dentro de los genes. La transcripción se lleva a cabo dentro del núcleo de la célula mientras que la traducción se desarrolla en el citoplasma. (“Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008”). La transcripción utiliza una región de ADN para formar una molécula de ARNm con la ayuda de la ARN-polimerasa, este proceso se divide en 3 etapas: iniciación, elongación y terminación. En la iniciación, donde se lleva a cabo la mayor parte de la transcripción, la región promotora sirve como un sitio de reconocimiento para la enzima ARN-polimerasa. La primera función de esta enzima es la división de la doble hélice del ADN, de tal forma que se pueda obtener un producto codificado de

la región en transcripción. Durante la elongación, la enzima se desplaza a lo largo del gen uniendo las bases complementarias formando así una molécula de ARNm codificado. Una vez que la enzima llega a la región de terminación se desprende del gen. El producto, conocido como ARNm transcripto primario, contiene exones (los cuales codifican las proteínas) e intrones (regiones no codificantes, que deben de removerse mediante un complejo de proteínas y ARN's denominados spliciosoma); además se debe agregar el capuchón en 5' y la cola Poli-A en 3' en un proceso denominado "splicing". El producto final es una hebra de ARNm maduro que puede salir del núcleo a través de un poro nuclear hacia el citoplasma decodificada para la síntesis de una proteína. La codificación de bases nitrogenadas se agrupa en segmentos de 3 denominados codones que son específicos para un aminoácido en específico, el código genético incluye 64 codones). Existen 4 aminoácidos distintos, 1 que codifica para el inicio de la traducción y 3 más que indican su terminación. El proceso inicia con la unión de la subunidad ribosómica menor previo al codón de iniciación del ARNm. El ARNt, encargado de unir los aminoácidos a los codones para formar anticodones, cada aminoácido está determinado por la secuencia de transferencia del anticodón del ARN de transferencia específico. Luego de que el primer ARNt se une al codón de iniciación, la subunidad ribosómica mayor se asocia para formar el complejo de traducción el cual se divide en tres regiones llamadas E, P y A. Durante la elongación los aminoácidos son conducidos a la hebra de ARN mensajero por un ARNt y se aparean las bases complementarias entre codones y anticodones. Un ARNt cargado se posiciona en la región A formando un enlace peptídico entre su aminoácido y el que se encuentra en el ARNt ubicado en la región P. El complejo ribosomal se desplaza hacia la derecha y el ARNt sin carga se mueve a la región E para ser liberado al citoplasma de tal forma que la región A queda libre para recibir la siguiente molécula de ARNt. El proceso se repite hasta que el complejo ribosomal recibe un codón de terminación, entonces un factor de terminación se une al complejo A para liberar del sitio P el polipéptido formado por los aminoácidos unidos en el proceso de traducción. (Nakagawa, Niimura, Miura, & Gojobori, 2010) (J.L. Sánchez Gullen, 2003)

Regulación de la Expresión Génica

La regulación de la expresión génica hace referencia al control de la cantidad de proteínas presentes en la célula en un momento determinado, esta regulación se manifiesta tanto en la síntesis como en la degradación. Permite fabricar únicamente las proteínas que necesita la célula y un ahorro vital energía para la síntesis de otros compuestos (R. Silva, n.d.). La regulación de genes puede manifestarse en forma positiva y en forma negativa, en la regulación positiva interviene un activador que se adhiere al ADN para incrementar la expresión de la información genética de una secuencia específica, por otro lado en la regulación negativa interviene un represor genético que disminuye la expresión génica de determinada secuencia. La regulación de genes se lleva a cabo en diferentes niveles del proceso de expresión génica. En el caso de las células eucariotas existen 4 niveles de regulación: nivel de transcripción, nivel de post-transcripción, nivel de translación y nivel de post-translación.

Análisis de expresión de genes

PCR

La reacción en cadena polimerasa fue descubierta por Kary Mullis en 1986 con el objetivo de obtener un gran número de fragmentos de ADN de tal forma que pudiesen ser cuantificados. Usando como base las ADN polimerasas y su capacidad de replicar el ADN en un proceso conocido como amplificación, el profesor Mullis descubrió que si se hacían repeticiones sucesivas con variantes de temperatura específicas en tres pasos: Primero una temperatura elevada fragmentaria la doble hélice del ácido desoxirribonucleico para convertirla en una estructura de una sola hélice, el segundo paso consiste en el anillamiento de los polinucleótidos y finalmente la polimerización donde entra en juego la ADN polimerasa para catalizar la formación de la doble cadena de ADN. Con ello la amplificación del ADN se convertía en cifras exponenciales abriendo la posibilidad de cuantificar su concentración a través de un espectrofotómetro. (Díaz-Alonso et al., 2013).

Desde su creación el método de Kary Mullis ha sufrido modificaciones, una de ellas es la RT-PCR (transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa). Debido a sus características el ácido ribonucleico no tiene la capacidad de amplificarse directamente en PCR. Este problema se resolvió con la adición de una etapa previa a la PCR conocida como síntesis de ADNc, en ella se hace una transcripción inversa utilizando la muestra de ARN para formar un ADN complementario de doble cadena. “Tradicionalmente, la reacción de transcripción inversa se realiza en un tubo aparte y el ADNc producido se transfiere después a un tubo nuevo para la reacción de la PCR. Sin embargo, ya se dispone de polimerasas de ADN termoestables con actividad transcriptasa inversa y tampones específicos en los cuales las polimerasas RT y ADN están activas. Ambas permiten una reacción RT-PCR que tiene lugar en el mismo tubo en secuencia directa sin manipulación adicional y con menos probabilidad de seguir contaminando (OIE, 2008)

Reacción en Cadena Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)

La reacción en cadena polimerasa en tiempo real, también conocida como qPCR, es un método que permite cuantificar el ácido nucleico en tiempo real. Gracias a esta tecnología es posible tener un monitoreo constante de la reacción en cada ciclo de amplificación, en este procedimiento la detección se realiza de manera simultánea. La detección es posible gracias a la fluorescencia emitida en cada ciclo de amplificación. Se produce gracias a la presencia de un fluoróforo. La qPCR se divide en 4 etapas: 1.- Desnaturalización: en ella se crea una ruptura de la doble hélice del ADN gracias a una elevación en la temperatura a 95°C durante 30 segundos. (OIE, 2008) 2.- Hibridación: la temperatura disminuye a un rango que varía dependiendo el tamaño, la composición y la concentración de los primers, los cuales realizan un anillamiento de la secuencia específica del ADN de interés para su amplificación (Kramer & Coen, 2002) 3.- Extensión: en esta tercera etapa la temperatura desciende a los 72°C para iniciar la acción de la polimerasa, que se encarga de unir los nucleótidos complementarios en el orden específico de la secuencia (Kramer & Coen, 2002). Las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a 2 °C varia de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo del

buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza de la hebra molde de ADN) (Patricia & Canón, 2014). 4.- Número de ciclos: Un ciclo constituye una desnaturalización, una hibridación y una extensión. Al repetir esta secuencia unas 40 veces podemos obtener el experimento de ampliación que contiene millones de copias cuantificables del gen problema. La cantidad de ciclos necesarios está ligado principalmente a la cantidad inicial de las hebras molde del ADN. Pocos ciclos dan como resultado bajo rendimiento del producto, mientras que una cantidad elevada puede incrementar la cantidad y complejidad de productos no específicos (Patricia & Canón, 2014).

MATERIALES Y METODOS

Localización

El experimento se llevó a cabo en el rancho “La Gloria” (Figura 13), a 2006 msnm, ubicado a los 25°12'39.30" de Latitud Norte, 100°46'5.58" de Longitud Oeste en Huachichil, Municipio de Arteaga, Coahuila, México. En el periodo del 5 de enero 2015 al 30 de marzo 2015. Se realizó sobre plantas de fresa (*Fragaria x ananassa*) ya establecidas del cultivar Albión que poseían un número similar de coronas. Las plantas se cultivaron en bloques de fibra de coco como sustrato de crecimiento con dimensiones de 12 x 8 x 100 centímetros de ancho, alto y longitud respectivamente. La densidad de plantación fue de 5 plantas por bloque de fibra de coco dentro de un invernadero de producción comercial.



Figura 11. Localización del experimento

La distribución del experimento se realizó con un diseño experimental en bloques al azar. Se implementaron 12 tratamientos con 4 repeticiones cada uno. Cada repetición tuvo cuatro plantas, con un resultante de 16 plantas por tratamiento y 208 plantas en total por todo el experimento (Cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución de los tratamientos, adicionados a fresa, cv. “Albión”.

Estrés Oxidativo		
Tratamiento	Producto	Concentración
T1	Peróxido de Hidrogeno 50% (34.0147)	$30.014 \times 10^{-4} \text{ M}$
T2	Peróxido de Hidrogeno 50% (34.0147)	$30.014 \times 10^{-3} \text{ M}$
T3	Sulfato de Cobre (159.62)	$159.62 \times 10^{-4} \text{ M}$
T4	Acido Glutámico	1.96 g/L
T5	Sulfato de Hierro (151.9)	$151.9 \times 10^{-4} \text{ M}$
T6	Sulfato de Hierro (151.9)	$151.9 \times 10^{-3} \text{ M}$
Estimulo enzimático		
Tratamiento	Producto	Concentración
T7	Ácido salicílico (138.12)	$1 \times 10^{-4} \text{ M L}^{-1}$
T8	Ácido salicílico (138.12)	$1 \times 10^{-3} \text{ M L}^{-1}$
T9	Melaza	$20 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$
T10	Ácidos húmicos y fúlvicos	$20 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$
T11	Algas Marinas	$15 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$
T12	Algas Marinas	$30 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$

Las aplicaciones (Figura 12) se realizaron con aspersiones foliares cada 2 semanas por un tiempo de 2 meses sobre plantas con suficiente número de inflorescencias. La primer y tercer cosecha de frutos inmaduros se realizó 48 horas después de la 3ra y 6ta aplicación de tratamientos; ya que el máximo efecto de los estimulantes de enzimas, como el ácido salicílico, se encuentra en su máxima expresión en este periodo de tiempo después de una aplicación foliar (A. Benavides, comunicación personal). La segunda y cuarta cosecha se realizó en frutos maduros después de la 3ra y 6ta aplicación de tratamientos.

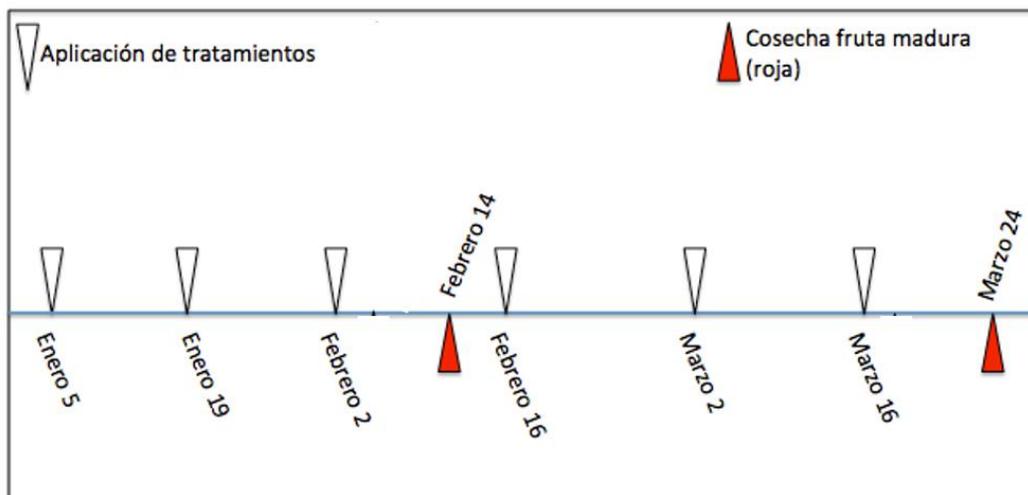


Figura 12. Aplicación de tratamientos (triángulo blanco) y cosecha de fruta madura (triángulo rojo) en plantas de fresa cultivar Albi3n tratadas con 12 diferentes inductores de estr3s y cultivadas en un sistema hidrop3nico abierto bajo condiciones de invernadero.

Las plantas recibieron la misma soluci3n nutritiva (Cuadro 3) mediante un sistema abierto de fertirrigaci3n de acuerdo a la formulaci3n comercial del productor la cual se aplic3 por medio de espagueti de pl3stico con un di3metro de 4 mil3metros y una longitud de 70 cent3metros conectados a la tuber3a secundaria de distribuci3n. La capacidad de emisi3n de los goteros fue de 2 litros por minuto y la frecuencia de riego fue cada 2 horas con un tiempo suficiente para lograr un volumen de drenaje del 15 al 25%.

Cuadro 3. Composici3n de la soluci3n nutritiva utilizada comercialmente para el cultivo de fresa cultivar "Albi3n".

Nutriente	Meq L / ppm
Nitr3geno	
NO ₃ -N	5.5
NH ₄ -N	2
Fosforo H ₂ PO ₄	1
Azufre SO ₄	3.5

Potasio K	2.5
Calcio Ca	3.5
Magnesio Mg	2
Hierro (ppm)	2.8
Boro (ppm)	0.6
Manganeso	0.04
Zinc	0.2
Cobre	0.1
Molibdeno	0.03
pH	5.5 – 6.0
Conductividad eléctrica(dSm-1)	~1.0

Mediciones ambientales

Las muestras fueron tomadas en frutos maduros de fresa después de la 3ra y 6ta aplicación de los tratamientos usando guantes de nitrilo, la fruta fue cortada en 4 secciones para colocarse en frascos de plástico perfectamente identificados, y finalmente las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido a -190°C. Una vez finalizada la cosecha los frutos se trasladaron en una hielera con nitrógeno líquido a un ultra congelador con temperatura controlada a -80°C en el laboratorio de horticultura de la UAAAN.

Análisis de expresión de genes

Extracción del ARN

La extracción de ARN se hizo utilizando el método de Pillet (2017). Las muestras de fruta fresca madura fueron almacenadas a -80°C en el Ultracongelador. Se macerará la muestra en un mortero de cerámica con nitrógeno líquido hasta obtener un aspecto de polvo procurando cuidar la temperatura con adiciones de nitrógeno líquido en el proceso. Inmediatamente se pesaron 250 mg de la muestra en un tubo de 2ml y se adicionaron 625 ul de solución buffer de extracción a 65°C (2% CTAB,

2% PVP (K30), 100mM Tris, 25mM EDTA, 2M NaCl, 2% β -Mercaptoethanol) y se agitó en el vortex hasta mezclar los componentes. Se incubó la muestra a 65°C durante 10 min. Después se agregaron 625 μ l de cloroformo y se homogeneizó en el vortex a máxima potencia durante 1 min, en seguida las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente por 10 min a 8,000 g en una centrifuga. Una vez terminada la centrifugación se extrajo el sobrenadante de la muestra y se dispuso en un tubo de 2 ml. Una vez más se agregaron 625 μ l de cloroformo y se llevó a agitación en el vortex. Las muestras fueron centrifugadas a temperatura ambiente por 10 min a 8,000 g, se obtuvo el sobrenadante para ponerlo en un tubo nuevo del mismo volumen, a lo que se agregó LiCl hasta obtener una concentración de 2M. Las muestras fueron incubadas durante una noche a 4°C. Posteriormente se sacaron del refrigerador y se llevaron directo a la centrifuga, previamente enfriada a 4°C, por 30 min a 10,000 g. Se decantó el sobrenadante obtenido de la muestra en un tubo nuevo y se resuspendió en 500 μ l de solución buffer SSTE (1M y 500 μ l de cloroformo, se llevó a agitación en el vortex y se extrajo el sobrenadante. El sobrenadante fue puesto en un tubo nuevo y se adicionaron 2.5 vol de etanol frío al 100%. Después, se precipitó el ARN a -80°C durante 30 min. Las muestras fueron llevadas a la centrifuga con una temperatura de 4°C durante 30 min a 10,000 g para formar la pastilla. Se decantó el sobrenadante y se adicionaron 500 μ l de etanol al 76% y acetato de sodio [0.3M] para lavar, las muestras fueron llevadas nuevamente a centrifugación a la misma temperatura durante 30 min a 10,000 g. El sobrenadante fue decantado y la pastilla de ARN se dejó secar durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió la muestra en un volumen de 30 μ l (10mM Tris, 2.5mM EDTA) para la disolverla (Pillet et al., 2017).

Cuantificación

Los ácidos nucleicos obtenidos fueron cuantificados utilizando un espectrofotómetro en el método de RNA. En primer lugar, se midió el blanco utilizando agua milliQ y enseguida se cuantificaron las muestras agregando 2 μ l de muestra más 198 μ l de agua milliQ con un volumen total de 200 μ l. Se registraron los datos y se realizaron los cálculos para determinar la concentración del ARN (μ g/ml) utilizando la fórmula

siguiente: $\text{Concentración}=(A_{260})(100)(50)$, y finalmente se calculó la concentración en UgTotales con la fórmula $\text{UgTotales}=(\text{Ug/ml})(0.05)$.

Calidad del ARN

La calidad del ARN fue medida mediante una electroforesis desnaturalizante. Se preparó un gel de agarosa al 1.3%, utilizando una parrilla magnética se calentaron 75 ml de agua de DEPC en un vaso de precipitado. Posteriormente fueron agregados 1.56 g de agarosa y se dejó calentar y agitar hasta que se obtuvo un color transparente. Se agregaron 24 ml de MOPS 5X y 21 ml de formaldehído agitando constantemente por unos segundos e inmediatamente se agregó la muestra al portagel cuidando que no hubiera burbujas se colocó un peine de 16 cavidades. Se dejó solidificar la muestra durante 30min. En tubos de 0.5ml se prepararon las muestras utilizando μl de muestra (2 μg totales), μl de agua de DEPC hasta aforar a 5 μl y 5 μl de buffer de carga (buffer loading) sumando un volumen total de 20 μl de la mezcla. Una vez mezcladas todas las muestras fueron incubadas a 60°C durante 10 minutos en una parrilla eléctrica e inmediatamente se pasaron a 4°C para enfriarse. Una vez solidificado el gel de agarosa se sumergió en la cámara de electroforesis para ARN y se agregó solución MOPS 1X a la cámara hasta la marca indicada dentro de ella, y se retiró el peine con precaución. Posteriormente se cargó cada una de las muestras (10 μl) en los pocillos y se registró el orden. La cámara fue conectada a una fuente eléctrica y se dejó correr a 70 Volts durante 1 hora con 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo el gel fue retirado cuidadosamente y colocado en el transiluminador para observar las bandas.

Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA de las muestras de ARN obtenidas se utilizó SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit de la marca Bioline. Se preparó en hielo, en tubos de 0.5 ml, una mezcla para cada muestra de 20 μl que constaba de 1 μl de muestra, 4 μl de 5x TransAmp Buffer, 1 μl de Reverse Transcriptase, se aforó a 20 μl con agua de grado biología molecular y finalmente se mezcló cuidadosamente con

pipeteo. Las muestras fueron colocadas en la gradilla del termociclador (Marca Labnet) y se configuró de la siguiente manera:

1. 25°C por 10 minutos
2. 42°C por 15 minutos
3. 48°C por 15 minutos
4. 85°C por 15 minutos
5. 4°C en espera
6. Las muestras fueron almacenadas a -20°C

PCR

Una vez sintetizado el cDNA se llevó a cabo la Reacción en Cadena de Polimerasa en tiempo real (qPCR) para el gen acetil CoA carboxilasa (ACO), además de incluir el gen endógeno de actina (ACT). Se realizó un coctel en un tubo de 0.6ml con los siguientes reactivos:

Cuadro 4. Coctel para qPCR

Gen	Concentración de primers	MasterMix	Foward Primer	Reverse Primer	Agua °BM	Muestra	Total
ACT	200µM	10µl	0.27µl	0.27µl	194.22µl	2µl	20µl
ACO	100µM	10 µl	0.13µl	0.13µl	200.98µl	2µl	20µl

Cuadro 5. Secuencia de los Primers

Gen	Iniciador Foward	Iniciador Reverse	Temp.anilamiento (°C)
ACT	3'- TGCTGAGCGGAAATTGTCAG A-5'	3'- ACCTGCCCATCAGGCAATTCAT -5'	65°C
ACO2	5'- GGGGGTAGCTGGGGAGTTA-3'	5'- GAGAGGTAGGTGCGGGTTTG – 3'	65°C

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación

En el Cuadro 6 y 7 se muestran los resultados de la cuantificación del ARN, el cual se tiene que llevar a cabo ya que tenemos que ajustar la cantidad de ug para todas las muestras. La absorbancia de 260 nm cuantifica la cantidad de ácidos nucleicos, la de 280 nm cuantifica las proteínas y la R es un valor de relación 260/280, con el cual podemos medir la pureza del ácido nucleico, un valor de 3 es de un ácido nucleico de una pureza del 100%.

Cuadro 6. Cuantificación de ARN del primer muestreo.

MUESTRA	Abs260	Abs280	R
T1 - R1	0.106	0.082	1.293
T1 - R2	0.054	0.043	1.256
T1 - R3	0.128	0.092	1.391
T1 - R4	0.066	0.044	1.500
T4 - R1	0.081	0.067	1.209
T4 - R2	0.052	0.042	1.238
T4 - R3	0.098	0.08	1.225
T4 - R4	0.11	0.073	1.507
T5 - R1	0.089	0.063	1.413
T5 - R2	0.223	0.187	1.193
T5 - R3	0.237	0.181	1.309
T5 - R4	0.17	0.125	1.360
T6 - R1	0.196	0.152	1.289
T6 - R2	0.187	0.128	1.461
T6 - R3	0.186	0.147	1.265
T6 - R4	0.074	0.049	1.510
T9 - R1	0.076	0.051	1.490
T9 - R2	0.072	0.053	1.358
T9 - R3	0.084	0.066	1.273
T9 - R4	0.065	0.048	1.354

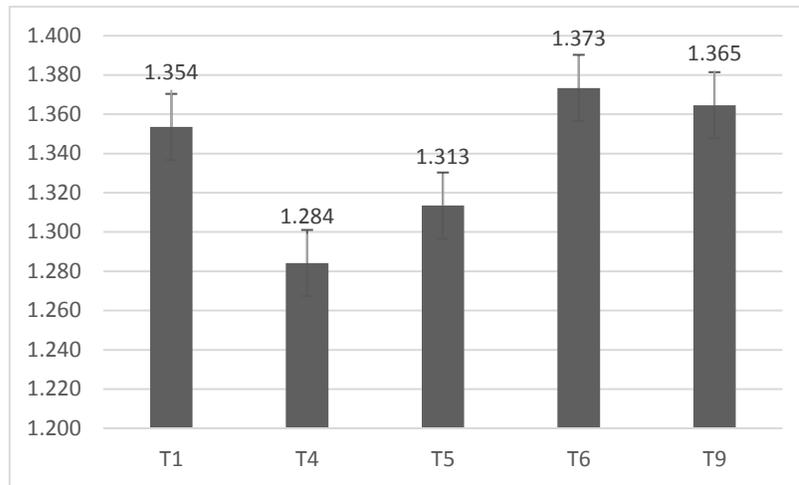


Figura 13. Grafica de medias de los resultados de la cuantificación del ARN del primer muestreo.

Cuadro 7. Cuantificación de ARN del segundo muestreo.

Tratamiento	Abs260	Abs280	R
T1 - R1	0.092	0.064	1.438
T1 - R2	0.1	0.057	1.754
T1 - R3	0.119	0.082	1.451
T1 - R4	0.132	0.085	1.553
T2 - R1	0.102	0.062	1.645
T2 - R2	0.092	0.072	1.278
T2 - R3	0.082	0.055	1.491
T2 - R4	0.052	0.037	1.405
T3 - R1	0.084	0.054	1.556
T3 - R2	0.134	0.074	1.811
T3 - R3	0.043	0.031	1.387
T3 - R4	0.133	0.092	1.446
T4 - R1	0.133	0.091	1.462
T4 - R2	0.161	0.107	1.505
T4 - R3	0.084	0.062	1.355
T4 - R4	0.057	0.05	1.140

T5 - R1	0.121	0.112	1.080
T5 - R2	0.036	0.03	1.200
T5 - R3	0.074	0.062	1.194
T5 - R4	0.08	0.066	1.212
T6 - R1	0.096	0.085	1.129
T6 - R2	0.083	0.071	1.169
T6 - R3	0.061	0.043	1.419
T6 - R4	0.132	0.106	1.245
T7 - R1	0.156	0.159	1.019
T7 - R2	0.161	0.131	1.229
T7 - R3	0.077	0.052	1.481
T7 - R4	0.06	0.049	1.224
T8 - R1	0.107	0.084	1.274
T8 - R2	0.166	0.142	1.169
T8 - R3	0.118	0.091	1.297
T8 - R4	0.109	0.075	1.453
T9 - R1	0.112	0.064	1.750
T9 - R2	0.057	0.037	1.541
T9 - R3	0.087	0.056	1.554
T9 - R4	0.114	0.081	1.407
T10 - R	0.068	0.046	1.478
T10 - R	0.107	0.088	1.216
T10 - R	0.098	0.076	1.289
T10 - R	0.085	0.046	1.848
T11 - R1	0.132	0.097	1.361
T11 - R2	0.138	0.091	1.516
T11 - R3	0.104	0.067	1.552
T11 - R4	0.113	0.075	1.507
T12 - R1	0.127	0.087	1.460
T12 - R2	0.046	0.033	1.394

T12 - R3	0.099	0.071	1.394
T12 - R4	0.101	0.079	1.278
Testigo 1	0.067	0.058	1.155
Testigo 2	0.087	0.071	1.225
Testigo 3	0.101	0.071	1.423
Testigo 4	0.049	0.035	1.400

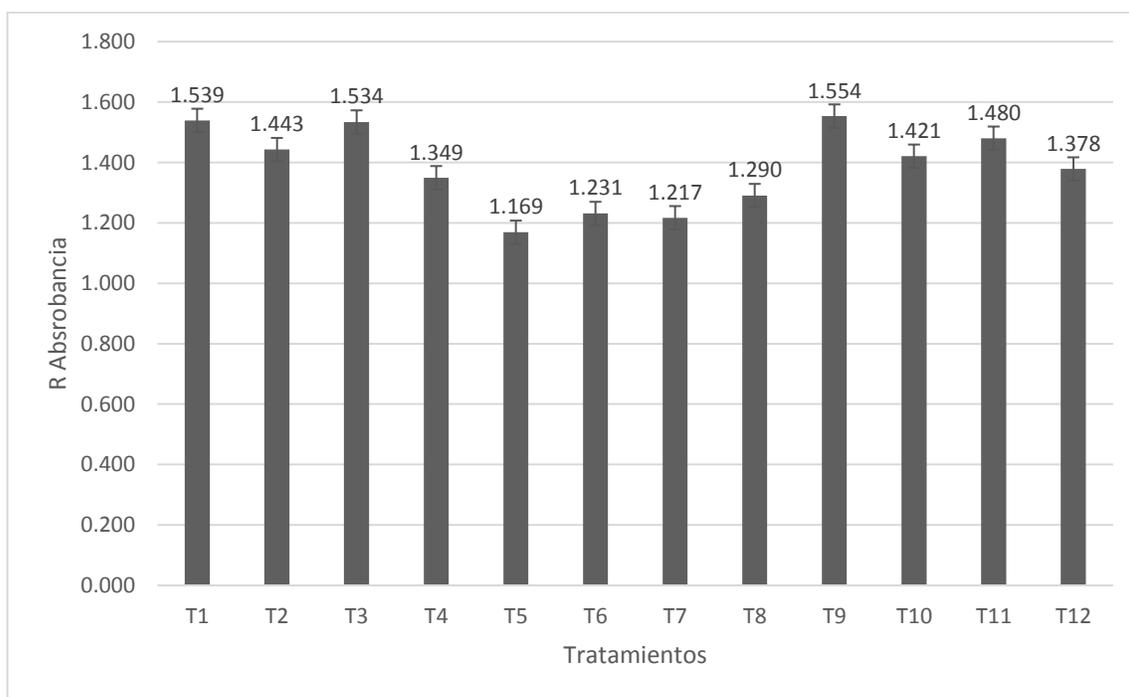


Figura 14. Grafica de medias de los resultados de la cuantificación del ARN del primer muestreo

Calidad de ARN por Electroforesis

Para realizar un análisis de expresión de genes es necesario extraer ARN de buena calidad, es decir, que no esté desnaturalizado. Para corroborar esto, se utiliza la técnica de electroforesis desnaturalizante, donde en un ARN de buena calidad se pueden apreciar 2 bandas intensas que pertenecen al ARN ribosomal (ARNr), seguido de un barrido donde se encuentra el ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt) y el ARN de interferencia (ARNi). En las Figuras 14-17 se observan las muestras de todos los tratamientos con características de un ARN de buena calidad.

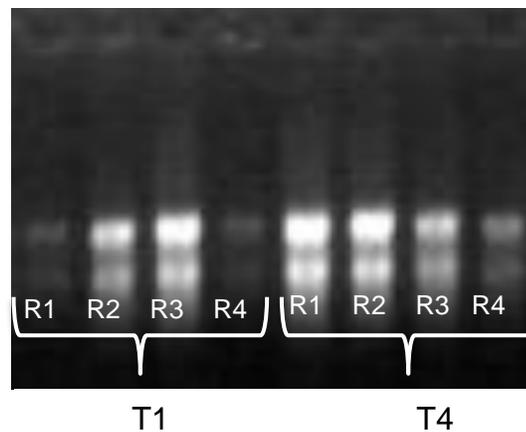


Figura 15. Calidad del ARNm por medio electroforesis de los tratamientos T1, y T4 del primer muestreo.

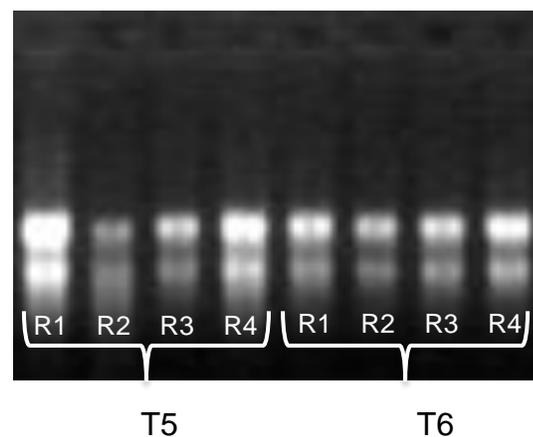


Figura 16. Calidad del ARNm por medio electroforesis de los tratamientos T5, y T6 del primer muestreo.

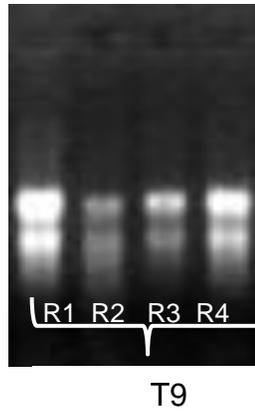


Figura 17. Calidad del ARNm por medio electroforesis del tratamiento T9

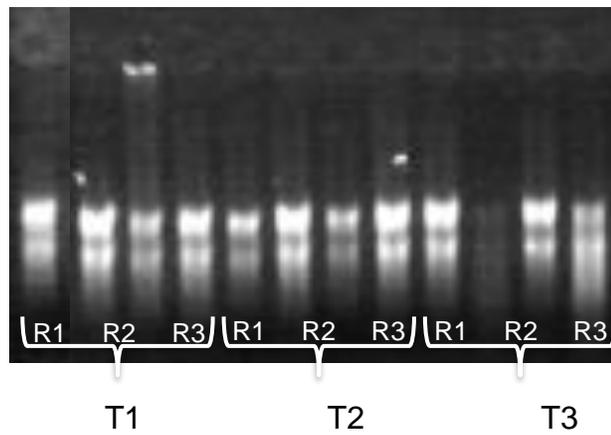


Figura 18. Calidad del ARNm por medio electroforesis de los tratamientos T1, T2 y T3 del segundo muestreo.

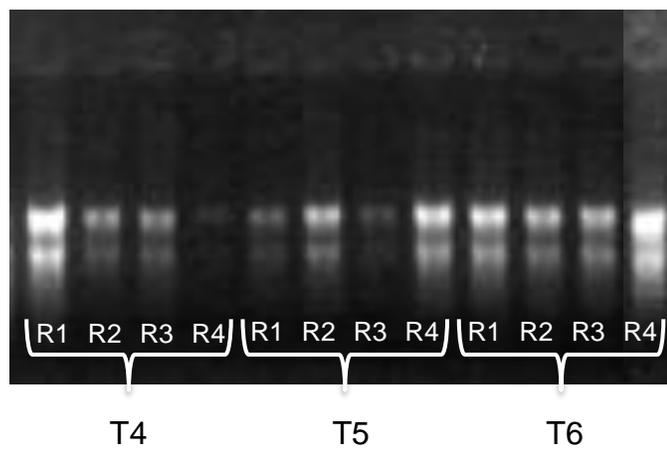


Figura 19. Calidad del ARNm por medio electroforesis de los tratamientos T4, T5 y T6 del segundo muestreo.

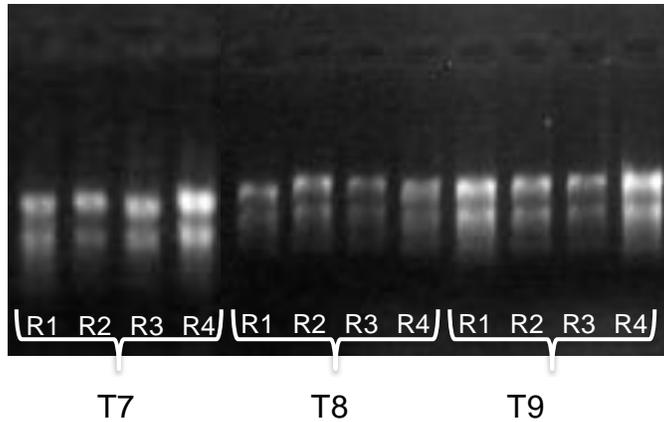


Figura 20. Calidad del ARNm por medio electroforesis de los tratamientos T7, T8 y T9 del segundo muestreo.

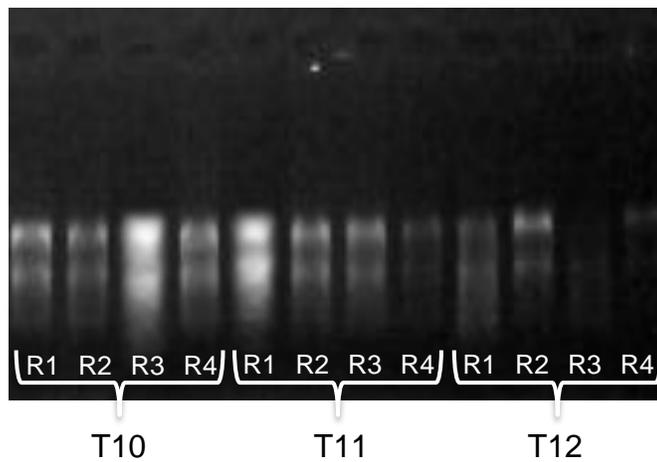


Figura 21. Calidad del ARNm por medio electroforesis de los tratamientos T10, T11 y T12 del segundo muestreo.

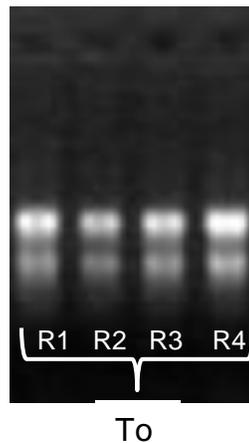


Figura 22. Calidad del ARNm por medio electroforesis del Testigo absoluto del muestreo 2

PCR en Tiempo Real (qPCR)

En el análisis de expresión del gen ACO2 en el muestreo 1 (muestreo realizado posterior a 3 aplicaciones del tratamiento de manera foliar en intervalos de 15 días), el tratamiento T1, donde se efectuaron aplicaciones de peróxido de hidrogeno (50%) [30.014×10^{-4} M], se encontró que el gen ACO2 se expresó 0.011 veces respecto al testigo absoluto. El T4, donde se aplicó ácido glutámico [1.96 g/L] el gen ACO2 se expresó 1.901 veces más, el T5 y el T6 donde se aplicó sulfato de hierro en las concentraciones [151.9×10^{-4} M] y [151.9×10^{-3} M] el gen ACO2 se expresó 0.594 y 0.461 veces menos que el testigo, finalmente el T9 donde se aplicó melaza [$20 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$] el gen ACO2 se expresó 1.158 veces más en comparación al testigo. (Cuadro 8 y Figura 23)

Cuadro 8. Cuantificación en qPCR de la expresión del Gen ACO2 para los tratamientos del primer muestreo.

Muestreo 1			
Tratamiento		CT (PCR cycle)	RQ (Relative quantification)
To	Testigo Absoluto	---	1
T1	Peróxido de Hidrogeno 50% [30.014×10^{-4} M]	24.849	1.011
T4	Acido glutámico [1.96 g/L]	24.843	2.901
T5	Sulfato de hierro [151.9×10^{-4} M]	23.278	0.594
T6	Sulfato de hierro [151.9×10^{-3} M]	23.538	0.461
T9	Melaza [$20 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$]	24.694	2.158

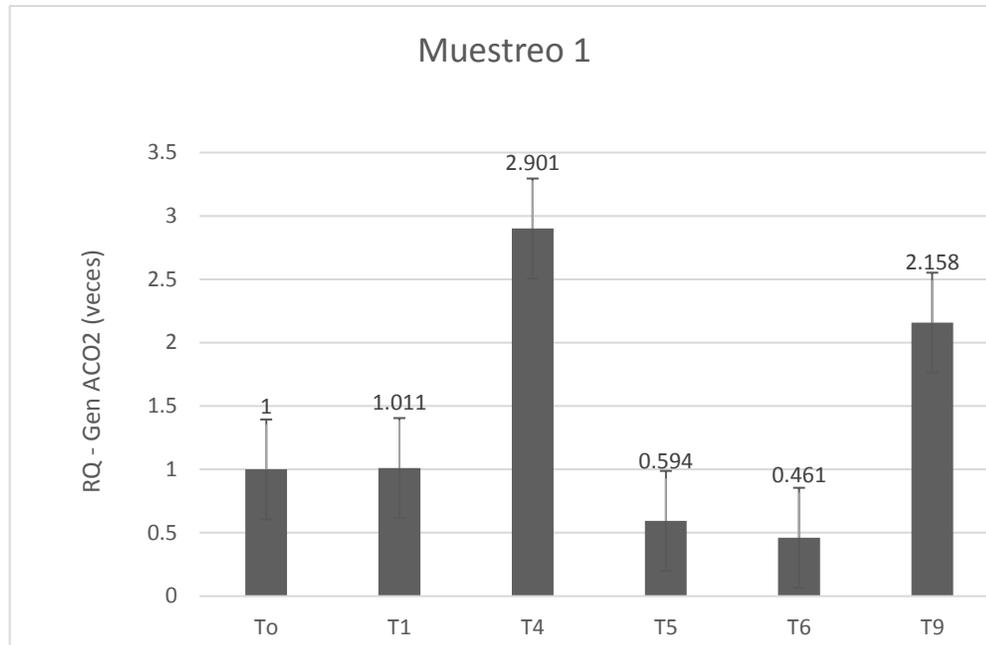


Figura 23. Respuesta de la expresión del gen ACO2 del primer muestreo en fresa cultivar “Albi3n”, a la aplicaci3n de: T1 (Per3xido de Hidrogeno 50% [30.014×10^{-4} M]), T4 (Acido glut3mico [1.96 g/L]), T5 (Sulfato de hierro [151.9×10^{-3} M]), T6 (Sulfato de hierro [151.9×10^{-3} M]), y T9 (Melaza [20 cm³ L⁻¹]). Los n3meros en la parte superior de las barras representan el RQ de la expresi3n del gen ACO2, en n3mero de veces expresadas comparadas con un Testigo(T) = 1. La l3nea en la parte superior de las barras representa el error est3ndar.

En el an3lisis de expresi3n del gen ACO2 en el muestreo 2 (muestreo realizado posterior a 6 aplicaciones del tratamiento de manera foliar en intervalos de 15 d3as). En los tratamientos T1 y T2, donde se efectuaron aplicaciones de per3xido de hidrogeno (50%) en las concentraciones [30.014×10^{-4} M] y [30.014×10^{-3} M] se encontr3 que el gen ACO2 se expres3 0.475 veces m3s y 0.652 menos respectivamente en comparaci3n al testigo absoluto. El T3, donde se aplic3 acido Sulfato de Cobre [159.62×10^{-4} M] el gen ACO2 se expres3 0.183 veces menos, el T4 donde se aplic3 Acido glut3mico [1.96 g/L] el gen ACO2 se expres3 0.8 veces m3s, los tratamientos T5 y el T6 donde se aplic3 sulfato de hierro en las concentraciones [151.9×10^{-4} M] y [151.9×10^{-3} M] el gen ACO2 se expres3 0.725 y 0.499 veces menos que el testigo, los tratamiento T7 y T8 donde se aplic3 3cido

salicílico en las concentraciones $[1 \times 10^{-4} \text{ M L}^{-1}]$ y $[1 \times 10^{-3} \text{ M L}^{-1}]$ el gen ACO2 se expresó 0.499 veces menos y 0.849 veces más respectivamente, el T9 donde se aplicó melaza $[20 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}]$ el gen ACO2 se expresó 0.001 veces más, en el T10 donde se aplicaron ácidos húmicos y fúlvicos $[20 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}]$ el gen ACO2 se expresó 1.805 veces más y finalmente en los tratamientos T11 y T12 donde se aplicaron algas marinas en las concentraciones $15 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$ y $30 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$ el gen ACO2 se expresó 2.862 y 0.086 veces más en comparación al testigo. (Cuadro 9 y Figura 22)

Cuadro 9. Cuantificación en qPCR de la expresión del Gen ACO2 para los tratamientos del segundo muestreo.

Muestreo 2			
Tratamiento		CT (PCR cycle)	RQ (Relative quantification)
To	Testigo Absoluto	---	1
T1	Peróxido de Hidrogeno 50% $[30.014 \times 10^{-4} \text{ M}]$	24.223	1.475
T2	Peróxido de Hidrogeno 50% $[30.014 \times 10^{-3} \text{ M}]$	23.084	0.652
T3	Sulfato de Cobre $[159.62 \times 10^{-4} \text{ M}]$	23.209	0.183
T4	Acido glutámico $[1.96 \text{ g/L}]$	23.787	1.8
T5	Sulfato de hierro $[151.9 \times 10^{-4} \text{ M}]$	26.696	0.725
T6	Sulfato de hierro $[151.9 \times 10^{-3} \text{ M}]$	24.267	0.499
T7	Ácido salicílico $[1 \times 10^{-4} \text{ M L}^{-1}]$	24.851	1.849
T8	Ácido salicílico $[1 \times 10^{-3} \text{ M L}^{-1}]$	24.576	1.188
T9	Melaza $[20 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}]$	24.236	1.001
T10	Ácidos húmicos y fúlvicos $[20 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}]$	24.086	2.805
T11	Algas Marinas $[15 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}]$	25.877	3.862
T12	Algas Marinas $[30 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}]$	27.766	1.086

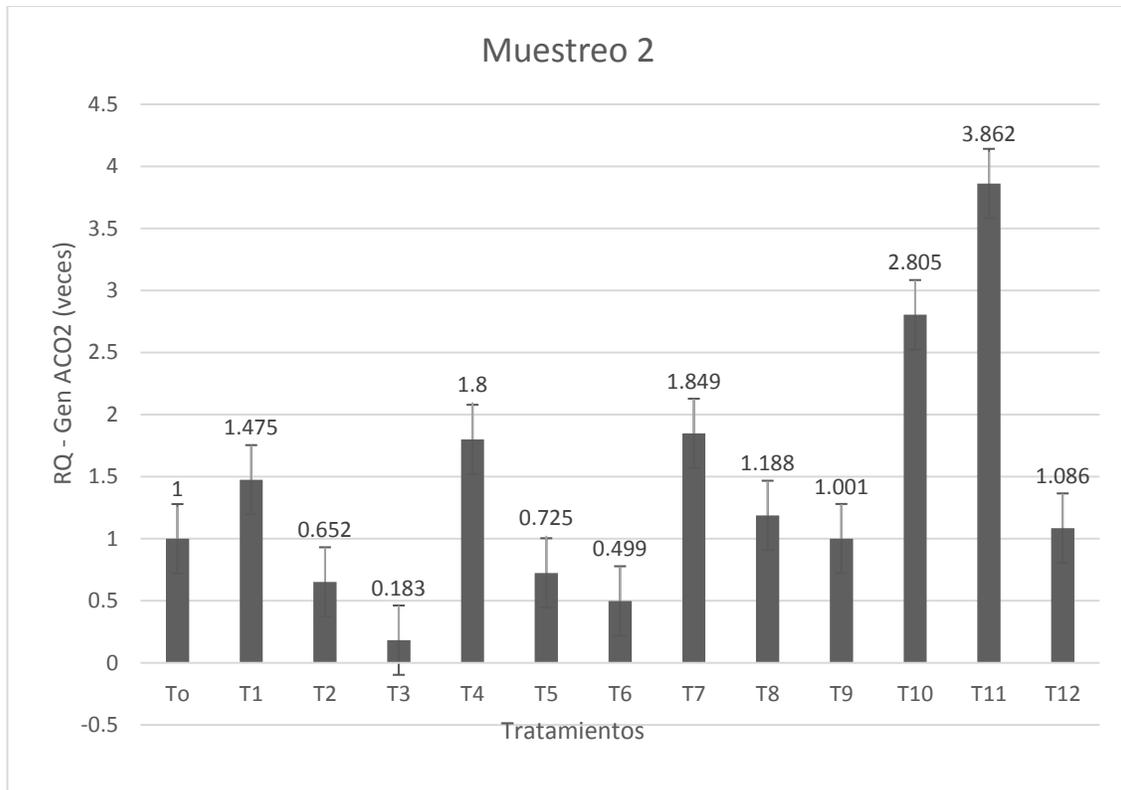


Figura 24. Respuesta de la expresión del gen ACO2 del segundo muestreo en fresa cultivar “Albi3n”, a la aplicaci3n de: T1 (Per3xido de Hidrogeno 50% [30.014×10^{-4} M]), T2 (Per3xido de Hidrogeno 50% [30.014×10^{-3} M]), T3 (Sulfato de Cobre [159.62×10^{-4} M]), T4 (Acido glut3mico [1.96 g/L]), T5 (Sulfato de hierro [151.9×10^{-3} M]), T6 (Sulfato de hierro [151.9×10^{-3} M]), T7 (3cido salic3lico [1×10^{-4} M L⁻¹]), T8 (3cido salic3lico [1×10^{-3} M L⁻¹]), T9 (Melaza [20 cm³ L⁻¹]), T10 (3cidos h3micos y f3lvicos [20 cm³ L⁻¹]), T11 (Algas Marinas [15 cm³ L⁻¹]), T12 (Algas Marinas [30 cm³ L⁻¹]). Los n3meros en la parte superior de las barras representan el RQ de la expresi3n del gen ACO2, en n3mero de veces expresadas comparadas con un Testigo (T) = 1. La l3nea en la parte superior de las barras representa el error est3ndar.

Muestreo 1

Per3xido de hidrogeno (H₂O₂)

En el T1, donde se efectuaron aplicaciones de per3xido de hidrogeno (50%) [30.014×10^{-4} M], se encontr3 que el gen ACO2 se expres3 0.011 veces (Figura 23) respecto al testigo absoluto, en fruta del primer muestreo realizado posterior a 3

aplicaciones del tratamiento de manera foliar en intervalos de 15 días. Se mantuvo prácticamente igual al testigo con una ligera diferencia mayor de 0.011 veces en la expresión del gen ACO2.

Ácido Glutámico

En el muestreo 1, el T4 donde se efectuaron aplicaciones de ácido glutámico [1.96 g/L], fue el tratamiento que presentó un resultado más favorable en base al testigo, en cuanto al estrés oxidativo inducido y controlado, logrando expresar el gen ACO2 1.901 veces más en comparación al testigo absoluto (Figura 23), en fruta del primer muestreo realizado posterior a 3 aplicaciones del tratamiento de manera foliar en intervalos de 15 días. Esto indica que el AG aplicado de manera foliar, en una concentración de 1.96 g/L, favorece notablemente la expresión del gen ACO2, logrando expresarlo casi 2 veces más respecto al testigo.

Sulfato de hierro (FeSO₄)

En el muestreo 1, los tratamientos T5 y T6, donde se efectuaron aplicaciones de sulfato de hierro (FeSO₄) en las concentraciones $151.9 \times 10^{-4}\text{M}$ y $151.9 \times 10^{-3}\text{M}$, se encontró que el gen ACO2 se expresó 0.594 y 0.461 veces menos respectivamente en comparación al testigo absoluto (Figura 23), en fruta del primer muestreo realizado posterior a 3 aplicaciones de los tratamientos de manera foliar en intervalos de 15 días. Los resultados indican que existe relación entre la concentración de FeSO₄ de las aplicaciones, $151.9 \times 10^{-4}\text{M}$ (T5) y $151.9 \times 10^{-3}\text{M}$ (T6), y la expresión del gen ACO2. A mayor concentración de sulfato de hierro el gen se suprimió en mayor proporción, siendo el T6 con mayor contenido de FeSO₄ el gen tan solo se expresó 0.461 veces (Figura 23), menos del 50% respecto al testigo; mientras que el T5 que contenía una menor cantidad de FeSO₄ suprimió el gen 0.594 veces (Figura 23). Dicho esto, podemos observar que en los tiempos de muestreo las aplicaciones de sulfato de hierro inhiben la expresión del gen ACO2.

Melaza

En el muestreo 1, el T9 donde se efectuaron aplicaciones de melaza ($20 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$), se encontró que el gen ACO2 se expresó 2.158 veces (Figura 23) respecto al testigo absoluto, en fruta del primer muestreo realizado posterior a 3 aplicaciones del

tratamiento de manera foliar en intervalos de 15 días. Esto indica que las aplicaciones de este compuesto en las primeras etapas de floración tienen un impacto positivo en los sistemas enzimáticos encargados de la formación de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga, de tal forma que los contenidos de Omega-3 en fresa pueden ser incrementados con aplicaciones de Melaza en dosis y etapas específicas dentro del periodo de floración en plantas de fresa.

Muestreo 2

Peróxido de hidrogeno (H₂O₂)

Los frutos para esta cuantificación se obtuvieron del segundo muestreo en plantas con 6 aplicaciones foliares en ambas concentraciones de H₂O₂. Las plantas del tratamiento 1 [30.014 x 10⁻⁴ M] expresaron el gen ACO2 0.475 (Figura 24) veces más que el testigo, a diferencia del tratamiento 2 donde la concentración de H₂O₂ fue mayor [30.014 x 10⁻³ M] y suprimió el gen ACO2, el cual se expresó 0.652 veces (Figura 22) menos que el testigo.

En ambos tratamientos T1 [34.014 x 10⁻⁴ M] y T2 [34.014 x 10⁻³ M] no se obtuvieron diferencias significativas para las variables de altura de planta, diámetro de planta, número de coronas, y concentración relativa de clorofila, se obtuvieron ligeras diferencias numéricas mayores al testigo. Esta información concuerda con los resultados que presentaron diferencia numérica en aumento frente al testigo. Sin embargo, el tratamiento 1 presentó una diferencia significativa en el diámetro de corona de 17.86% mayor al testigo y el T2 presentó una diferencia numérica de 14.25% mayor. El peróxido de hidrogeno además de ser señalizador de expresión de genes relacionados con la tolerancia a estrés oxidativo (Orozco-Cárdenas *et. al.*, 2001), el H₂O₂ también sirve como un mediador clave de la activación de ABA (Benezer *et. al.*, 2008) , razón por la cual las plantas mostraron mayor diámetro de corona comparado con el testigo. El H₂O₂ es transportado desde el apoplasto hacia el citosol a través de acuaporinas; si este transporte ocurriera a mayores distancias el H₂O₂ podría ser considerado como un compuesto con acción hormonal (Benavides Mendoza, 2002b). Gondim *et. al.*, (2013) menciona que al presentarse

estrés oxidativo la planta lo reduce con glutamina reductasa y esta misma es favorable para la síntesis de clorofila.

En el peso de fruto el T2 presentó una diferencia significativamente menor de 24.9% inferior al testigo, es probable que la deficiencia de oxígeno en el medio radical produzca un efecto negativo en el crecimiento de las raíces y en la absorción de nutrientes (Orihuela, Hernández, & Tornos, 2013). En cuanto a la concentración de sólidos solubles totales tampoco se presentó una diferencia significativa en comparación al testigo, sin embargo, hubo una diferencia numérica menor de 22.2% y 14.32% para los tratamientos T1 y T2 respectivamente. La gráfica presento una tendencia creciente en los sólidos solutos totales conforme la concentración de H₂O₂ aumentaba. En trabajos más recientes se demostró que H₂O₂ en bajas concentraciones menores a 20×10^{-3} M actúa como señal para la síntesis y asimilación de azúcares solubles, incrementando el contenido de éstos en hojas y frutos (Ozaki et al., 2009). Aplicaciones semanales de H₂O₂ 5mM mostraron un aumento significativo en la concentración total de sólidos solubles y el contenido total de azúcar de los frutos de manzana de cera (*Syzygium samarangense*) (Ismail et al., 2015).

El T1, con menor concentración de H₂O₂, logró estimular la expresión del gen ACO2 a pesar de tener una concentración más baja en el contenido de sólidos solubles totales. Parece ser que la moderada aplicación de H₂O₂ estimulo la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en cierto punto de la floración en las plantas de fresa utilizadas para este experimento. Se observó que la misma concentración de H₂O₂ [30.014×10^{-4} M] estimulo en mayor proporción la expresión del gen ACO2 en la fruta obtenida del segundo muestreo. Es probable que la asimilación H₂O₂ haya tenido un efecto retardado o posiblemente desencadeno una serie de procesos metabólicos que dieron como resultado un aumento en expresión del gen en la fruta del segundo muestreo. Además, la expresión del gen de interés para este experimento disminuyo considerablemente al aumentar la concentración de H₂O₂ a 30.014×10^{-3} M (T2) lo indica que en mayores concentraciones el H₂O₂

inhibe la producción de ácidos grasos. El H_2O_2 es una molécula señal y un regulador de la expresión de algunos genes. Cuando se acumulan en las plantas, activa factores de transcripción que regulan diferentes procesos fisiológicos y estimula los mecanismos de defensa ante el estrés (Hung, Yu, & Lin, 2005; Pnueli, Liang, Rozenberg, & Mittler, 2003; Yu, Murphy, & Lin, 2003) organismos evolutivamente desarrollaron sistemas de defensa antioxidante que retarda o previene la oxidación de un sustrato oxidable, ya sean lípidos, proteínas, ADN etc. neutralizando a las ROS (Constanza, María, & Ariza, 2012) La interacción de NO y H_2O_2 en las plántulas de trigo alivió el estrés del zinc mediante el aumento del sistema antioxidante, disminuyendo la per oxidación de lípidos y la expresión de genes de resistencia (Ortega-Villasante, Aro, Carter, Liao, & Niu, 2016)

Sulfato de Cobre ($CuSO_4$)

El tratamiento 3 (T3) fue el tratamiento que suprimió en mayor cantidad de veces el gen ACO2. En las plantas asperjadas con Sulfato de Cobre [159.62×10^{-4} M] la expresión de el gen fue 0.183 veces menor al testigo absoluto (T0) (Figura 24). En este tratamiento no se obtuvieron diferencias significativas en relación al testigo para las variables de altura de planta, diámetro de planta, número de coronas, sólidos solubles totales, peso de fruto ni contenido relativo de clorofila. Fulford (1970) explica que el sulfato de cobre disminuye la concentración del ácido indolacético (AIA) y aumenta el etileno ocasionando una disminución en el crecimiento.

Azcón-Bieto y Talón (2003) hace mención de que la esencialidad del Cu radica en su presencia en diversas proteínas y enzimas implicadas en procesos de óxido-reducción. El T3 presento una diferencia significativa en la variable del diámetro de corona. Varias proteínas que contienen Cu desempeñan un papel fundamental en procesos fisiológicos tales como la desintoxicación de radicales superóxido y lignificación. El Cu es un componente del complejo Polifenol oxidasas, que se involucra en la biosíntesis de lignina y alcaloides. (Alegría, 2016). Además es un componente de muchas metalo-enzimas como la citocromo oxidasa, que cumple

una función de activador de procesos metabólicos basales, y la fenolasa, responsable de la lignificación (Dell, Malajczuk, & Grove, 1995).

La aplicación de CuSO_4 afectó el contenido relativo de clorofila dando como resultado una diferencia numérica mayor en comparación al testigo de 6.17%. Alegría (2016) explica que el Cu forma parte de la plastocianina, una proteína cloroplástica que interviene en la transferencia de electrones del fotosistema I y II, así como con la ferredoxina inhibiendo la foto-reducción del NADP^+ (Shioi, Tamai, & Sasa, 1978). Como consecuencia de menores contenidos de plastocianina, disminuye la tasa de fijación de CO_2 de modo que el contenido de almidón y de carbohidratos solubles también se reduce (Kirkby, Römheld, & Parte, 2009) Esto también explica la diferencia numérica menor en relación al testigo (17.62%) en cuanto al contenido de sólidos solubles totales.

La función de los fotosistemas se encuentra estrechamente ligada con el contenido de carbohidratos, un cambio en estos sistemas metabólicos representan alteraciones en la biosíntesis de ácidos grasos (Maksymiec *et al.*, 2006) Por otra parte Quartacci *et al.*, (2003) explica que el cobre en exceso afecta la composición y la fluidez de los lípidos. Esto, aunado al desequilibrio fotosintético afecta negativamente la expresión del gen ACO2 que forma parte de la formación de ácidos grasos de cadena larga afectando el contenido final del compuesto de nuestro interés, el omega-3.

Ácido Glutámico

En el muestreo 2, eIT4 donde se aplicó ácido glutámico [1.96 g/L] en 6 ocasiones con intervalos de 15 días, expresó el gen ACO2 0.8 veces más que el testigo (Figura 24). En ambos muestreos el resultado fue favorable para los intereses de este experimento. Entre ambos muestreos existe una diferencia de 1.101 veces de expresión en comparación al testigo (Figura 24). Podemos afirmar que las aplicaciones de ácido glutámico favorecen la expresión del gen ACO2, involucrado en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, de tal manera

que los frutos obtenidos de estas plantas tenían un mayor contenido nutricional de omega-3.

Se obtuvo una diferencia significativa menor en comparación al testigo en las variables de peso de fruto (69.5%), diámetro de corona (23.4%), y altura de planta (31.22%) En cuanto a la producción; una planta con mayor biomasa potencialmente es más productiva, algunos estudios hacen mención de la función que el ácido glutámico cumple sobre la germinación del grano de polen y la viabilidad de frutos formados posterior a la fecundación de las flores (Baker & Baker, 1973). Esta información sustenta el bajo rendimiento obtenido en el T4, la biomasa de la planta no tenía la capacidad de producir lo que una de mayor tamaño sí. Es importante tomar esta información en cuenta: se obtuvieron frutos de peso más bajo pero con un mayor contenido de Omega-3. Pereyra (2001) sugirió que el glutamato aplicado foliarmente se traslada a la raíz y hacia los plástidos para generar nitrógeno amídico, por otra parte, también es aprovechado por los cloroplastos de los tallos para asimilar el amonio producido por la foto-respiración, de ser así las células vegetales evitan la toxicidad del amonio incorporándolo rápidamente en los esqueletos carbonados para formar aminoácidos. Tomando en cuenta los resultados de la altura de planta es posible que el ácido glutámico se haya traslocado a otras rutas metabólicas razón por la cual en diámetro de corona no fue superior comparado con plantas testigo.

Para las variables: diámetro de planta, número de coronas, contenido de sólidos solubles totales y contenido relativo de clorofila no se obtuvieron diferencias significativas en base al testigo. Sin embargo, se obtuvieron diferencias numéricas mayores en comparación al mismo de 7.24% en el diámetro de planta y 14.12% en el número de coronas. Los aminoácidos intervienen en el crecimiento y desarrollo vegetal, especialmente cuando se presenta algún tipo de estrés en las planta (Arjona et al., , 2004). Las plantas tienen la capacidad de biosintetizar aminoácidos, sin embargo requiere un proceso complejo que demanda un gasto energético muy

elevado, por lo que la aplicación de aminoácidos permite un ahorro de energía y un mejor desempeño de la planta (Ángulo Rodríguez, 2009).

Las variables de sólidos solubles totales y contenido relativo de clorofila obtuvieron diferencia numérica menor en comparación a testigo de 18.33% y 0.1% respectivamente. Estas variables difieren de los resultados sobre la expresión del gen ACO2. Se esperaría una mayor concentración de clorofila y de sólidos solubles totales, debido a su importancia en el aporte en carbohidratos y su productividad energética, sin embargo, los resultados mostraron que la expresión del gen ACO2 que fue de 1.901 (muestreo 1) y 0.8 (muestreo 2) veces mayor en relación al testigo (Figuras 23 y 24). Es probable que la interacción del ácido glutámico con los aminoácidos y proteínas hayan estimulado rutas metabólicas específicas para la biosíntesis de ácidos grasos, mientras que las variables fisiológicas no necesariamente se vieron favorecidas significativamente por las aplicaciones de Ac. Glutámico.

Sulfato de hierro (FeSO₄)

El muestreo 2 se realizó posterior a 6 aplicaciones de sulfato de hierro (FeSO₄) y los resultados demostraron que ambas concentraciones de (FeSO₄) suprimieron el gen ACO2, el T5 (FeSO₄ [151.9 x 10⁻⁴ M]) y el T6 (FeSO₄ [151.9 x 10⁻³ M]), expresaron 0.725 y 0.499 veces menos el gen ACO2 (Figura 24), respectivamente comparado con el testigo. Tomando en cuenta los resultados del muestreo anterior es posible afirmar que las aplicaciones de FeSO₄ no son favorables para la estimulación de la expresión del gen de interés para este experimento.

El T5 no obtuvo diferencias significativas en las variables de altura de planta, diámetro de planta, diámetro de corona, número de coronas, contenido de sólidos solubles totales, peso de fruto y contenido relativo de clorofila; mostro diferencias numéricas ligeramente mayores al testigo. En lo que respecta al tratamiento 6 de FeSO₄ concentrado a 151.9 x 10⁻² M fue significativamente diferente mayor en comparación al testigo en diámetro de planta (15.83%), diámetro de corona

(19.51%), número de coronas (30.21%), sólidos solubles totales (1.7%) y en la variable peso de fruto resultó significativamente menor (27.77%). Esta concentración de sulfato de hierro muestra diferencia numérica de 11.8% mayor al testigo en altura de planta y 6.53% mayor en contenido relativo de clorofila. Los citocromos son las moléculas más comunes que contienen porfirinas, que están compuestas por Fe. Los citocromos son fundamentales en los sistemas respiratorio y fotosintético y su propiedad más importante, la función REDOX. Esta capacidad permite realizar reacciones REDOX rápidas por transferencia de electrones. Así mismo forma parte de varios sistemas enzimáticos como: citocromo oxidasa, catalasa, peroxidasa, desaturasas de ácidos grasos, síntesis de clorofila, peptidilprolina hidrolasa, nitrogenasa, etc. (Benavides Mendoza, 1999).

Los resultados indican que las variables relacionadas con el desarrollo y crecimiento se vieron favorecidas con las aplicaciones de FeSO_4 , notablemente en ambas concentraciones, la concentración más elevada de FeSO_4 [$151.9 \times 10^{-3} \text{ M}$] (T6) tuvo un mayor impacto en dichas variables. Sin embargo, en cuanto a la expresión del gen de nuestro interés (ACO2), ambas concentraciones no estimularon favorablemente el gen relacionado con la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga para mejorar la calidad nutricional de la fresa. Así mismo pudimos observar que la supresión del gen ACO2 tuvo un comportamiento constante entre ambos muestreos donde sucedió en mayor severidad en relación a la concentración aplicada.

Ácido salicílico

La cosecha para estos tratamientos se realizó exclusivamente en el segundo muestreo, donde se realizaron 6 aplicaciones de ácido salicílico en 2 concentraciones en intervalos de 15 días, previos al corte de la fruta evaluada. Se realizaron aplicaciones de ácido salicílico en concentraciones de [$1 \times 10^{-4} \text{ M L}^{-1}$] y de [$1 \times 10^{-3} \text{ M L}^{-1}$] para los tratamientos T7 y T8 respectivamente. El T7, de menor concentración, presentó un aumento considerable frente al testigo en la expresión del gen ACO2, el cual se expresó 0.849 veces (Figura 24) más con las aplicaciones

de ácido salicílico a [$1 \times 10^{-4} \text{ M L}^{-1}$], acercándose bastante a duplicar la expresión de dicho gen ligado a la formación de ácidos grasos de cadena larga. En el caso del T8 [$1 \times 10^{-3} \text{ M L}^{-1}$] la expresión del gen ACO2 incremento ligeramente respecto al testigo, siendo de 0.188 veces mayor a este (Figura 24). Esto bien podría deberse a la concentración más elevada que se utilizó para el segundo tratamiento de ácido salicílico (T8). Podemos afirmar que este compuesto químico tiene la capacidad de modificar la expresión del gen ACO2.

En cuanto a las variables fisiológicas evaluadas los resultados no obtuvieron diferencia significativa, pero si un pequeño decremento numérico en las variables de: altura de planta, diámetro de planta, número de corona, y peso de fruto el cual disminuyó notablemente al testigo 41.8% en la dosis más baja de ácido salicílico y 39.2% en el T8. Probablemente la planta respondió a las aplicaciones de manera negativa debido a la concentración elevada. El diámetro de corona y contenido relativo de clorofila tampoco obtuvieron una diferencia significativa, sin embargo, mostraron un aumento en comparación al testigo en la dosis de [$1 \times 10^{-4} \text{ M L}^{-1}$], posiblemente se deba a que en esta variable si es favorable al aplicar dosis más bajas. Martínez *et al.*, (2004) menciona que el ácido salicílico afecta la síntesis de algunos reguladores de crecimiento que afectan directamente los procesos fisiológicos. En contribución a esto, Sánchez *et al.*, (2011) reportan que aplicar dosis más bajas de 1×10^{-7} y $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ a plantas de chile jalapeño aumentó significativamente la producción de biomasa foliar y radicular, indicando que a dosis más bajas el AS provee cierto beneficio.

En el contenido de sólidos solubles totales fue mayor en aquellas que fueron tratadas con ácido salicílico $1 \times 10^{-4} \text{ M L}^{-1}$ (T7) superando 14.8% al testigo (T), por el contrario, el T8 mostró una disminución de 5.8 % en comparación al testigo. Teniendo una diferencia en total de 19.8 % entre ambas aplicaciones. Estas variables se vieron afectadas en similar proporción a la expresión del gen ACO. El T7, que posee mayor contenido de sólidos solubles totales, así como una mayor estimulación de la expresión del ACO2 asociado a la formación de ácidos grasos

poliinsaturados de cadena larga, fue el tratamiento con concentración más baja. Estos resultados confirman que el AS juega un papel en la formación de ácidos grasos, y propone que las dosis de menor concentración tienen un impacto positivo frente a las concentraciones más elevadas de dicho compuesto. La función más estudiada del AS es como elicitador, que sirve como señalizador en la respuesta de las plantas para generar moléculas de defensa (Dong, 2004; Shah, 2003). Dempsey (1999) explica que las aplicaciones exógenas de ácido salicílico tienen la capacidad de inducir el sistema de defensa proteico.

Melaza

En el segundo muestreo las plantas contaban con 6 aplicaciones de melaza a una concentración de $20 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$ y el experimento no obtuvo resultados positivos ni negativos respecto a la expresión del gen ACO2. Se mantuvo prácticamente igual al testigo con un muy ligero incremento de 0.001 veces en comparación a éste (Figura 24). Los resultados indican que las aplicaciones de melaza modifican la expresión del gen ACO2 positivamente en plantas de fresa en la dosis aplicada [$20 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$], pero su constante aplicación interactúa con la planta de una manera posiblemente antagónica, o por otro lado su acumulación en los tejidos genera una migración de las moléculas de AS a otros órganos no involucrados en la formación de ácidos grasos.

En cuanto a las variables fisiológicas de altura de planta, peso de fruto y contenido relativo de clorofila tuvieron una diferencia numérica menor respecto al testigo de 23.45%, 13.8% y 2.3% respectivamente. En cuanto al diámetro de corona y número de coronas los resultados indicaron que las aplicaciones de melaza a esta concentración no influyen para la modificación positiva o negativa de estos parámetros ya que se mantuvieron prácticamente iguales frente al testigo. Por otro lado, este tratamiento (T9) parece afectar negativamente el diámetro de planta debido a que mostro una diferencia significativa menor en comparación al testigo de 20.89% al igual que el contenido de sólidos solubles totales que fue menor significativamente frente al testigo.

Restrepo (2007) menciona que la función principal de la melaza es el aporte energético para la activación del metabolismo microbiológico del suelo, potencializa la fermentación y provee elementos en pequeñas cantidades como zinc, potasio, boro, magnesio, fosforo, calcio, y fierro. Los resultados obtenidos posiblemente se consecuencia de un exceso en las dosis aplicadas, con las aplicaciones foliares las hojas se tornaron oscuras afectando el proceso fotosintético al disminuir la incidencia de luz sobre la lámina foliar, de tal forma que no se desarrollaron adecuadamente los azúcares dañando el proceso fisiológico del fruto; por eso existe un decremento en el peso de los frutos y en la expresión del gen ACO₂. En relación a esto Guillermo (2009) menciona que la fotosíntesis es el proceso por el cual mediante la intercepción de luz fotosintéticamente activan las plantas transforman la materia inorgánica de su medio externo en materia orgánica que utilizarán para su crecimiento y desarrollo.

Ácidos húmicos y fúlvicos

La cosecha para este tratamiento se realizó exclusivamente en el segundo muestreo, donde se realizaron 6 aplicaciones de ácidos húmicos y fúlvicos en intervalos de 15 días previos al corte de la fruta evaluada. El T10, en el cual se realizaron aplicaciones en forma foliar de ácidos húmicos y fúlvicos a una concentración de [20 cm³ L⁻¹], demostró tener influencia sobre la expresión del gen ACO₂, el cual se expresó 2.805 veces más respecto al testigo (Figura 24). Tuvo un gran resultado en comparación al resto de tratamientos.

No se encontró diferencia significativa en cuanto al diámetro de corona y número de coronas, al igual que en contenido relativo de clorofila, y altura de planta, sin embargo, en estas dos últimas variables se presentó un incremento del 7.75% y el 11% respectivamente. En el peso de fruto hubo un decremento de 49.4% en comparación al testigo, mientras que en el contenido de los sólidos solubles totales si hay diferencia significativa, ya que disminuyo 24.6 %. Posiblemente se pudo haber generado un estrés en respuesta a las dosis de aplicación. En

complementación a los resultados obtenidos, Vaughan & Malcom (1985) reportan que los beneficios de AH y AF se presentan de manera más general en la parte radicular que en la aérea lo que justificaría algunos de los decrementos obtenidos en las variables fisiológicas.

Las diferentes propiedades físico-químicas entre los ácidos húmicos y los ácidos fúlvicos hacen que resulten unos más eficientes para determinadas situaciones que otros (Stevenson *et al.*, 1994). Estas características les permiten resistir altas concentraciones de salinidad y en una amplia gama de pH, de esta forma se prolonga su duración en el suelo para interactuar con las raíces de las plantas (Bocanegra *et al.*, 2006).

En este tratamiento se notó un incremento considerable en la expresión del gen ACO2 que está relacionado con la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Indudablemente los resultados muestran que efectivamente las aplicaciones AH y AF modifican favorablemente la expresión del gen involucrado en la formación de omegas. Sin embargo, es difícil explicar con precisión el papel que juegan estos compuestos en la formación de ácidos grasos. Flores (1993) explica que los AH presentan efectos favorables en la planta como el traslado de nutrimentos desde las raíces hasta la parte aérea y del exterior de las hojas hasta los lugares de acumulación. Otros autores destacan que los AF tienen una mayor absorción y capacidad de intercambio catiónico que los AH, y son responsables de quelatar y movilizar iones metálicos, incluyendo Fe y Al (Bocanegra *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2009; Navarrete *et al.*, 2004). Como podemos observar se le atribuyen diferentes características a cada grupo (AH y AF). Narro (1987) menciona que los AH favorecen la permeabilidad de la membrana celular permitiendo una mejor asimilación de nutrimentos por parte de las raíces y de las hojas; lo que a su vez sugiere que no sólo es una función directa la que desempeñan los AH y AF para la biosíntesis de ALA, su función como quelatantes y facilitadores de la translocación de nutrimentos eficientiza los procesos metabólicos de la planta, favoreciendo su

crecimiento, desarrollo y calidad de fruto, que para interés de este experimento se traduce en un mayor contenido de omega-3.

Algas Marinas

La cosecha para estos tratamientos se realizó exclusivamente en el segundo muestreo, donde se realizaron 6 aplicaciones de algas marinas, en 2 concentraciones en intervalos de 15 días, previas al corte de la fruta evaluada. En los tratamientos 11 y 12 se realizaron aplicaciones de algas marinas en concentraciones de $15 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$ y $30 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$, respectivamente. El tratamiento con la dosis más baja de $15 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$ sobresalió notablemente de todos los tratamientos, incluyendo a los tratamientos que se realizaron para generar estrés oxidativo inducido y controlado. El tratamiento 11 expresó el gen ACO2 3.862 veces más en comparación al testigo (Figura 24), casi logró cuadruplicar la expresión del mismo. En cuanto a la concentración más elevada de algas marinas en el T12 ($30 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$) la alta concentración afectó la expresión del gen ACO2, confirmando que las algas marinas tienen un efecto sobre la expresión de este gen. En el T12 las plantas de fresa se expresaron 1.086 veces respecto al testigo (Figura 24). Prácticamente fueron iguales con un ligero incremento. El efecto benéfico que se consigue al aplicar extractos de algas es resultado de diversos compuestos que interactúan de forma sinérgica en diferentes concentraciones (Fornes *et al.*, 2002). En algunos estudios se reportan un aumento en la concentración de propiedades antioxidantes con la aplicación de extractos de algas marinas (N. Verkleij, 1992; Turan & Köse, 2004).

En lo que respecta a las variables fisiológicas, el T11 ($15 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$) superó numéricamente 20% al testigo en diámetro de corona, y 15.58% en el diámetro de planta. En los resultados se encontró que el contenido relativo de clorofila logró superar al testigo significativamente en los tratamientos T11 y T12, 3.2% y 3.8 % respectivamente. López (2015) realizó un experimento sobre el efecto a la aplicación del extracto de alga marina al suelo y foliar en una plantación de vid (Cv. Siras), donde obtuvieron un incremento de los pigmentos de clorofila de las hojas de 2.68% en comparación al testigo. Shehata y El-yazied (2015) reportan que el

aumento de clorofila probablemente se deba que el extracto de alga marina contiene elementos como el hierro y el nitrógeno, que se requieren en la síntesis de clorofila en las hojas ya que por eso el contenido de clorofila aumenta. La variable altura de planta tuvo diferencia significativa inferior al testigo en ambos tratamientos. De igual forma las variables de peso de fruto y contenido de sólidos solubles totales se vieron afectadas por las aplicaciones de algas marinas en ambas concentraciones, encontrándose una diferencia significativa menor de 37.4% (T11) y 44 % (T12) en el peso de fruto, de 23.2% (T11) y 8.7% (T12) en el contenido de sólidos solubles totales. Estos resultados posiblemente son consecuencia de un exceso en las dosis aplicadas en forma foliar, las cuales tornaron las hojas de color oscuro disminuyendo la incidencia lumínica sobre la lámina foliar.

Las aplicaciones de algas marinas en ambas dosis presentan comportamientos similares superiores o inferiores al testigo, el T11, donde la concentración fue de $15 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$ se obtuvieron mejores resultados en la mayoría de las variables en comparación al T12. Esta información indica que las algas marinas actúan en varios procesos metabólicos de las plantas, afectando diferentes órganos en proporción variable. Los extractos de algas marinas estimulan la germinación, el desarrollo y la producción en las plantas. Además, contienen macro y micro elementos indispensables para la nutrición, así como amino ácidos, y vitaminas (Zhang et al., 2003; Zhang & Schmidt, 2000) Además, la expresión del gen ACO2, en el T11 destaca sobresalientemente de cualquier otro tratamiento. Más estudios sobre el comportamiento de las algas marinas en bajas concentraciones podrán esclarecer algunas de las incógnitas respecto a su influencia en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en vegetales. Canales y Crouch (2000; 1993), mencionan que los extractos de algas marinas son ricos en compuestos naturales con comportamiento similar a los promotores de crecimiento, como es el caso de algunos agentes quelatantes como ácidos algínicos y ácidos fúlvicos (Canales López, 2000; J. Crouch & van Staden, 1993). Una gran ventaja del uso de algas marinas en la agricultura es que los extractos de algas marinas son un importante recurso renovable y una alternativa al uso de fertilizantes químicos, gracias a su

contenido de reguladores de crecimiento naturales y aminoácidos, sirven para promover una mejor absorción nutrimental por parte de la planta, y además, son biodegradables, no tóxicos ni contaminantes para personas y animales (Dhargalkar & Pereira, 2004; Hong, 2007)

CONCLUSIONES

- Las aplicaciones de H₂O₂ [30.014×10^{-4} M], ácido glutámico [1.96g/L] y ácido salicílico [1×10^{-4} M L⁻¹] mejoraron la calidad nutricional de la fruta de fresa al favorecer positivamente la formación de LC-PUFAs (Omegas-3), considerados indispensables debido a la incapacidad de cuerpo humano de sintetizarlos
- La aplicación de algas marinas, en una concentración de 15 cm³ L⁻¹, obtuvo una destacada respuesta destacada en la biosíntesis de Omega 3 en plantas de fresa respecto al resto de los tratamientos, logrando estimular casi 3 veces más el gen encargado de la formación de acetyl-coA.
- Las aplicaciones de melaza y de ácidos húmicos y fúlvicos, ambos aplicados en dosis de 20 cm³ L⁻¹, mostraron tener influencia positiva en la nutrición de la fresa acercándose a duplicar el contenido de Omega-3 en comparación al control.
- Los compuestos: peróxido de hidrógeno [30.014×10^{-3} M, sulfato de cobre [159.62×10^{-4} M], y sulfato de hierro en concentraciones de 151.9×10^{-4} M y 151.9×10^{-3} M afectan negativamente la formación de Omega-3 en la plantas de fresa.
- Ningún tratamiento orgánico inhibió la expresión del gen ACO2.
- La técnica de extracción de ARN en el fruto de fresa fue exitosa para los fines de esta investigación

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agriculturae, S., Abowei, J. F. N., & Ezekiel, E. N. (2013). The potentials and utilization of Seaweeds. *Sci. Agri*, 4(2), 58–66. Retrieved from <http://www.pscipub.com/Journals/Data/JList/ScientiaAgriculturae/2013/Volume4/Issue2/5.pdf>
- Aiken, G. R., Mcknight, D. M., P., W., & Maccarthy, R. L. (1985). An introduction to humic substances in soil, sediment, and water. In humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation and characterization. *Wiley-Interscience*, pp:1-9.
- Alegría, W. (2016). Texto básico para profesional en Ingeniería forestal en el área de Fisiología Vegetal. *Textos*, 1–210.
- Alicia, D., Moreno, O., Lidia, D., Alvarez, D., En, M., Obed, C., & Esquivel, O. (2010). *ÁCIDOS GRASOS OMEGA EPA Y DHA*. Retrieved from <http://asociaciondenutriologia.org/sites/default/files/miembros-archivos/manuscrito.pdf>
- Amick Dempsey, D., Shah, J., & F. Klessig, D. (1999). *Salicylic Acid and Disease Resistance in Plants. Critical Reviews in Plant Sciences* (Vol. 18). <https://doi.org/10.1080/07352689991309397>
- Anchondo-Aguilar, A., Núñez-Barrios, A., Ruiz-Anchondo, T., Martínez-Tellez, J., Vergara-Yoisura, S., & Larqué-Saavedra, A. (2011). EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA BIOPRODUCTIVIDAD DE LA FRESA (*Fragaria ananassa*) cv Aromosa* EFFECT OF SALICYLIC ACID IN BIOPRODUCTIVITY OF STRAWBERRY (*Fragaria ananassa*) cv Aromosa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2, 293–298. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v2n2/v2n2a10.pdf>
- Ángulo Rodríguez, F. R. (2009). *Evaluación de Cuatro Bioestimulantes Comerciales en el Desarrollo de Plantas Injertadas de Cacao (*Theobroma cacao* L) Cultivar Nacional*. Escuela Superer Politecnica de Chimborazo. Retrieved from <http://dspace.epoch.edu.ec/bitstream/123456789/319/1/13T0621.pdf>
- Arjona, H., Herrera, J. E., Gómez, J. A., & Ospina, J. (2004). *Evaluación de la aplicación de urea , melaza y aminoácidos sobre el crecimiento y rendimiento*

de la cebolla de bulbo (*Allium cepa* L. Grupo cepa) híbrido yellow granex, en condiciones de la Sabana de Bogotá. Bogotá, Colombia.

- Axayacatl, O. (2017). Estadísticas agrícolas de fresa: producción, superficie y rendimiento. Retrieved November 21, 2018, from <https://blogagricultura.com/estadisticas-fresa-produccion/>
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2003). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGrawHill (1°). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Baker, H. G., & Baker, I. (1973). Amino-acids in Nectar and their Evolutionary Significance. *Nature*, 241, 543. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/241543b0>
- Benavides Mendoza, A. (1999). Absorción y asimilación de hierro en las plantas. *Depto. Horticultura*.
- Benavides Mendoza, A. (2002a). *Ecofisiología y bioquímica del estrés en plantas*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/305346608_Ecofisiologia_y_bioquimica_del_estres_en_plantas
- Benavides Mendoza, A. (2002b). Estrategias Para El Uso De Los Mecanismos Naturales De Tolerancia Al Estrés En Plantas, (February), 1–9.
- Benezzer-Benezzer, M., Castro-Mercado Ernesto García-Pineda, E., & García-Pineda, E. (2008). La Producción de Especies Reactivas de Oxígeno Durante la Expresión de la Resistencia a Enfermedades en Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v26n1/v26n1a9.pdf>
- Blum, A. (1988). Plant breeding for stress environments. CRC Press.
- Bocanegra, M. P., Lobartini, J. C., & Orioli, G. A. (2006). Plant Uptake of Iron Chelated by Humic Acids of Different Molecular Weights. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 37(1–2), 239–248. <https://doi.org/10.1080/00103620500408779>
- Cabrera-De la Fuente, Benavides-Mendoza, A., Fuentes-Lara, L. O., Ortega-Ortiz, H., Ramírez, H., & Rosales-Velázquez, J. L. (2006). Acumulación de plata por semillas de sandía expuestas a diferentes concentraciones de nitrato de plata.

In Memoria del Simposio Internacional Alternativas para la Rehabilitación de Suelos Contaminados con Metales Pesados y Metaloides. Colegio de Posgraduados y Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México.

Calace, N., Furlani, G., Petronio, B. M., & Pietroletti, M. (2000). *Sedimentary humic and fulvic acids: Structure, molecular weight distribution and complexing capacity*. *Annali di Chimica* (Vol. 90).

Canales López, B. (2000). ENZIMAS-ALGAS: POSIBILIDADES DE SU USO PARA ESTIMULAR LA PRODUCCION AGRICOLA Y MEJORAR LOS SUELOS Seaweed-Enzymes: Possibilities for Stimulating Crop Yield and Improving Soil Quality. *Palau Bioquim, S.A. de C.V.* Retrieved from <https://www.chapingo.mx/terra/contenido/17/3/art271-276.pdf>

Castañeda Macias, F. (2014). *Aplicación de Melaza en el Sistema de Riego en la Produccion de Chile Habanero (Capsicum chinense.)*. Uniersidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Retrieved from <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/682/T20234MACIASCASTAÑEDA%2CFERNANDO%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Constanza, L., María, M., & Ariza, M. (2012). *Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno*. Bogotá, D.C., Colombi. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a08.pdf>

Coronado Herrera, M., Vega y León, S., Gutiérrez Tolentino, R., García Fernández, B., & Díaz González, G. (2006). Los ácidos grasos omega- 3 y o. *Reb*, 25(3), 72–79.

Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). *Natural products (secondary metabolites)*, in *Biochemistry and molecular biology of plants* (eds B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jones). *American Society of Plant Physiologists, Rockville.*

da Silva, J. C. G. E., Machado, A. A. S. C., & Oliveira, C. J. S. (2009). Effect of pH on complexation of Fe(III) with fulvic acids. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(7), 1268–1273. <https://doi.org/doi:10.1002/etc.5620170711>

De, C., & Leñero, L. A. (2009). *Herper Bioquímica ilustrada* (McGrawHill).

de la Luz Velázquez Monroy, M., & Ángel Ordorica Vargas, M. (2009). Metabolismo

- de Lípidos. Retrieved from <http://www.bioquimica.dogsleep.net/Teoria/archivos/Unidad72.pdf>
- Dell, B., Malajczuk, N., & Grove, T. S. (1995). *Nutrient Disorders in Plantation Eucalypts. Australian Centre for International Agricultural Research.*
- Dhargalkar, V. K., & Pereira, N. (2004). *Seaweed: Promising Plant of the Millennium. Sci and Cult (Vol. 71).*
- Díaz-Alonso, L. C., Heidys Garrote-Santana, D., Ana, D. C., Amor-Vigil, M., Yandi Suárez-González, L., Raúl, L., & Romero, G.-M. (2013). Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR Ribonucleic acid quantification for the performance of RT-PCR technique. *Revista Cubana Hematología Inmunología y Hemoterapia*, 2929(33). Retrieved from <http://scielo.sld.cu>
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(5), 547–552. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2004.07.005>
- Esperanza, E., Castillo, F., Constanza, S., & Forero, S. (2007). *EVALUACIÓN DE MELAZA DE CAÑA COMO SUSTRATO PARA LA PRODUCCIÓN DE Saccharomyces cerevisiae.* Retrieved from <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf>
- Flores, A. J. (1993). *Evaluación de los ácidos húmicos (Humiplex plus) a diferentes dosis en el desarrollo del cultivo de papa. Tesis de Licenciatura. U.A.A.A.N., . 15-18p.*
- Fornes, F., Sánchez-Perales, M., & L. Guardiola, J. (2002). *Effect of a Seaweed Extract on the Productivity of “de Nules” Clementine Mandarin and Navelina Orange. Botanica Marina - BOT MAR (Vol. 45).* <https://doi.org/10.1515/BOT.2002.051>
- Friedman, M. (2004). Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 385–406. <https://doi.org/10.1021/jf030490p>
- Fulford, R. M. (1970). The Effect of Chemical Defoliation on the Development of Apple Spurs. *Annals of Botany*, 34(5), 1079–1088. Retrieved from

<http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a084439>

- Gallardo, J., Lopez, E., Luna, S., & Rello, C. (2017). *Fresa Mexicana*. Retrieved from <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>
- Gondim, F. A., De Souza Miranda, R., Gomes-Filho, E., & Tarquinio Prisco, J. (2013). *Enhanced salt tolerance in maize plants induced by H₂O₂ leaf spraying is associated with improved gas exchange rather than with non-enzymatic antioxidant system. Theoretical and Experimental Plant Physiology* (Vol. 25). Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/txpp/v25n4/03.pdf>
- Guillen Coutiño, R. A. (2011). UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA. Retrieved from [http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1472/EVALUACION DE ALGAENZIMS\(MR\), Algaroot\(MR\), Turboenzims\(MR\), Quitaflores y MAYOR EN EL CULTIVO DE PAPA \(Solanum tuberosum L.\) VARIEDAD NORTE%20D1A.pdf?sequence=1](http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1472/EVALUACION%20DE%20ALGAENZIMS(MR),%20Algaroot(MR),%20Turboenzims(MR),%20Quitaflores%20y%20MAYOR%20EN%20EL%20CULTIVO%20DE%20PAPA%20(Solanum%20tuberosum%20L.)%20VARIEDAD%20NORTE%20D1A.pdf?sequence=1)
- Halliwell, B. (2006). *Update on Reactive Species and Antioxidants Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Hayes, M. H. B. (1997). Emerging Concepts of the Compositions and Structures of Humic Substances. In *Humic Substances, Peats and Sludges* (pp. 3–30). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-85573-805-8.50005-7>
- Hong, D., Hoang, M.-H., & N. Son, P. (2007). *Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer. Journal of Applied Phycology* (Vol. 19). <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9228-x>
- Honig, P. (1969). *Principios de tecnología azucarera*. México: Compañía Editorial Continental.
- Horowitz, N. H., Berg, P., Singer, M., Lederberg, J., Susman, M., Doebley, J., & Crow, J. F. (2004). A centennial: George W. Beadle, 1903-1989. *Genetics*, 166(1), 1–10. <https://doi.org/10.1534/genetics.166.1.1>
- Hung, S.-H., Yu, C.-W., & Lin, C. H. (2005). *Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants*. Retrieved from <https://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2005/1/Bot461-01.pdf>

- Instituto Superior de Ciencias Médicas (Villa Clara, C. (1997). *Revista Medicentro electrónica. Medicentro Electrónica* (Vol. 19). Instituto Superior de Ciencias Médicas de VC. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432015000300001
- Inzé, D., & Van Montagu, M. (1997). *Oxidative Stress in Plants. Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 6). [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80024-7](https://doi.org/10.1016/0958-1669(95)80024-7)
- Isabel Castro-González Bióloga, M. (2002). *ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3: BENEFICIOS Y FUENTES* (Vol. 27). Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/339/33906605.pdf>
- Ismail, S. Z., Khandaker, M. M., Mat, N., & Boyce, A. N. (2015). Effects of Hydrogen Peroxide on Growth, Development and Quality of Fruits: A Review. *Journal of Agronomy*, 14(4), 331–336.
<https://doi.org/10.3923/ja.2015.331.336>
- J. Crouch, I., & van Staden, J. (1993). *Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. Plant Growth Regulation* (Vol. 13). <https://doi.org/10.1007/BF00207588>
- J.L. Sánchez Gullen. (2003). *Síntesis de Proteínas*. Retrieved from <http://www.iespando.com/web/departamentos/biogeo/web/departamento/2BCH/PDFs/16Traduccion.pdf>
- Juárez, Margarita; Cerdán, Mar; Sánchez-Sánchez, A. (2015). Hierro en el sistema suelo-planta. *Depto. Agroquímica y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante*, (August 2015).
- Kirkby, E., Römheld, V., & Parte, S. (2009). *Cobre (Cu) MICRONUTRIENTES EN LA FISILOGIA DE LAS PLANTAS: FUNCIONES, ABSORCION Y MOVILIDAD* 1. Retrieved from [https://www.ipni.net/ppiweb/iaecu.nsf/\\$webindex/FEB8DB4F5AFB8FF50525748300700842/\\$file/Micronutrientes+en+la+Fisiología+de+las+Plantas+II+Parte.pdf](https://www.ipni.net/ppiweb/iaecu.nsf/$webindex/FEB8DB4F5AFB8FF50525748300700842/$file/Micronutrientes+en+la+Fisiología+de+las+Plantas+II+Parte.pdf)
- Kramer, M. F., & Coen, D. M. (2002). The Polymerase Chain Reaction. In *Current Protocols in Protein Science* (Vol. 29, p. A.4J.1-A.4J.8). Hoboken, NJ, USA:

- John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa04js29>
- Liliana Cuéllar, D., Sehtman, A., Lucila Donatti, D., Allevato, M., Becaria, M., Planta Jefe De Médicos Becarios Y Cursistas, M. DE, & Planta, M. DE. (2008). *Acido salicílico*. Retrieved from http://www.atdermae.com/pdfs/atd_31_02_06.pdf
- Macedo-Márquez, A. (2012). Macedo-Márquez, A.: Producción de EROs en mitocondrias de *S. cerevisiae*, *15*(2), 97–103. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/tip/v15n2/v15n2a3.pdf>
- Maksymiec, W., Russa, R., Urbanik-Sypniewska, T., & Baszyński, T. (2006). Effect of excess Cu on the photosynthetic apparatus of runner bean leaves treated at two different growth stages. *Physiologia Plantarum*, *91*(4), 715–721. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1399-3054.1994.tb03010.x>
- Martínez, C., Pons, E., Prats, G., & León, J. (2004). Salicylic acid regulates $\bar{}$ owering time and links defence responses and reproductive development. *The Plant Journal*, *37*, 209–212. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01954.x>
- Martinez, M. (2017). Exportaciones de fresa dejan 650.8 mdd en 2016 | El Economista. Retrieved November 21, 2018, from <https://www.eleconomista.com.mx/empresas/Exportaciones-de-fresa-dejan-650.8-mdd-en-2016-20170416-0095.html>
- Metabolismo de Lpidos. (2010). *Metabolismo de Los Lípidos*. Retrieved from http://www.fca.proed.unc.edu.ar/pluginfile.php/33180/mod_folder/content/0/Complemento Teórico de Química Biológica/07- Cap 5 - Metabolismo de Lípidos.pdf?forcedownload=1
- Miranda-ham, L., & Castro-concha, L. (2009). El Estrés Oxidativo En Plantas. *Sociedad Mexicana De La Ciencia Del Suelo*.
- N. Verkleij, F. (1992). *Seaweed Extracts in Agriculture and Horticulture: a Review. Biological Agriculture & Horticulture - BIOL AGRIC HORTIC* (Vol. 8). <https://doi.org/10.1080/01448765.1992.9754608>
- Nakagawa, S., Niimura, Y., Miura, K. -i., & Gojobori, T. (2010). Dynamic evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(14), 6382–6387. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002036107>

- Narro, F. E. A. 1987. (1987). *Física de los Suelos con Enfoque Agrícola*. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México: U.A.A.A.N.
- Navarrete, J., M. Urbina, V., Martínez, T., & Cabrera, L. (2004). *Role of fulvic acids for transporting and fixing phosphate and iron ions in bean plants by radiotracer technique*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry - J RADIOANAL NUCL CHEM* (Vol. 259). <https://doi.org/10.1023/B:JRNC.0000017309.59429.1c>
- OIE. (2008). VALIDACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS MÉTODOS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA UTILIZADOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS. In *Manual de la OIE sobre Animales Terrestres*. Retrieved from http://wahis2-devt.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.05.Validadci%F3n y control de calidad.pdf
- Oliva, H. (2013). ¿Qué son los ácidos grasos y las. *Ciencia*, (2), 60–65.
- Orihuela, D. L., Hernández, J. C., & Tornos, P. (2013). *La Oxidertirrigación y su efecto sobre algunos parámetros productivos en fresa (Fragaria x ananassa)*. Retrieved from [http://www.sech.info/ACTAS/Acta n° 59. X Jornadas del Grupo de Sustratos/Comunicaciones/La oxifertirrigación y su efecto sobre algunos parámetros productivos en fresa \(Fragaria x ananassa\).pdf](http://www.sech.info/ACTAS/Acta n° 59. X Jornadas del Grupo de Sustratos/Comunicaciones/La oxifertirrigación y su efecto sobre algunos parámetros productivos en fresa (Fragaria x ananassa).pdf)
- Orozco-Cárdenas, M. L., Narváez-Vásquez, J., & Ryan, C. A. (2001). *Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate*. *The Plant Cell* (Vol. 13). Retrieved from www.plantcell.org
- Ortega-Villasante, C., Aro, E.-M., Carter, C., Liao, W., & Niu, L. (2016). Hydrogen Peroxide Signaling in Plant Development and Abiotic Responses: Crosstalk with Nitric Oxide and Calcium. *Frontiers in Plant Science | Wwww.Frontiersin.Org*, 7, 230. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00230>
- Ozaki, K., Uchida, A., Takabe, T., Shinagawa, F., Tanaka, Y., Takabe, T., ... Takabe, T. (2009). Enrichment of sugar content in melon fruits by hydrogen peroxide treatment. *Journal of Plant Physiology*, 166(6), 569–578. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.08.007>

- Patricia, A., & Canón, C. (2014). Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de *Helicobacter pylori* en aguas de consumo. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/46636/1/05599317.2014.pdf>
- Pereyra, M. (2001). *Asimilación del nitrógeno en los vegetales*. La pampa, Argentina. Retrieved from [http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Asimilacion del nitrogeno.pdf](http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Asimilacion%20del%20nitrogeno.pdf)
- Pillet, J., Chambers, A. H., Barbey, C., Bao, Z., Plotto, A., Bai, J., ... Folta, K. M. (2017). Identification of a methyltransferase catalyzing the final step of methyl anthranilate synthesis in cultivated strawberry. *BMC Plant Biology*, *17*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1088-1>
- Pnueli, L., Liang, H., Rozenberg, M., & Mittler, R. (2003). Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient Arabidopsis plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *34*(2), 187–203. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694594>
- Quartacci, M. F., Pinzino, C., Sgherri, C. L. M., Dalla Vecchia, F., & Navari-Izzo, F. (2003). Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiologia Plantarum*, *108*(1), 87–93. <https://doi.org/doi:10.1034/j.1399-3054.2000.108001087.x>
- Quitral, V., Morales, C., Sepúlveda, M., & Schwartz, M. (2012). Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. *Rev Chil Nutr*, *39*. Retrieved from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v39n4/art14.pdf>
- Ramirez Ruiz, L. A. (2015). *Comportamiento de Plántulas de Tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) en dos Cubiertas de Sustrato y Tres Dosis de un Biofertilizante Bajo Condiciones*. Retrieved from [http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6719/63414 RAMIREZ RUIZ%2C LUIS ALBERTO TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6719/63414_RAMIREZ_RUIZ%2C_LUIS_ALBERTO_TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Rausher, M. D. (2001). Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature*, *411*, 857. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/35081193>

- Restrepo Rivera, J. (2007). *Manual Práctico El A, B, C de la agricultura orgánica y harina de rocas*. Retrieved from http://caminosostenible.org/wp-content/uploads/BIBLIOTECA/EI_ABC_de_la_agricultura_organica_y_harina_de_rocas.pdf
- Robledo, D. (1997). Las Algas y la Biodiversidad. *CONABIO. Biodiversitas*, 13, 1–4. Retrieved from <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv13art1.pdf>
- Salisbury, F. B., Ross, C. W., & Velázquez, V. G. (1994). *Fisiología vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=QIVAAAACAAJ>
- Sánchez-Chávez, E., Barrera-Tovar, R., Muñoz-Márquez, E., & Leopoldina Ojeda-Barrios, D. (2011). EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO SOBRE BIOMASA, ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA, CONTENIDO NUTRICIONAL Y PRODUCTIVIDAD DEL CHILE JALAPEÑO EFFECT OF SALICYLIC ACID ON BIOMASS, PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY, NUTRIMENT CONTENT AND PRODUCTIVITY OF JALAPEÑO PEPPER. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 17(1), 63–68. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v17nspe1/v17nspe1a10.pdf>
- Sánchez, J. (2007). Fertilidad del suelo y nutrición mineral de plantas. *Fertitec S.A.*, 1, 1–19. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Fertilidad+del+suelo+y+nutrici?n+mineral+de+plantas.#0>
- Sathya, B., Indu, H., Seenivasan, R., & Geetha, S. (2010). Influence Of Seaweed Liquid Fertilizer on the Growth and Biochemical Composition of Legume Crop, *Cajanus cajan* (L). Mill sp. *Journal of Phytology*, 2(5), 50–63.
- Senesi, N., & Loffredo, E. (1999). The Chemistry of soil organic matter. In *Soil physical chemistry* (D.L. Spark). Newark, Delaware.
- Shah, J. (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 365–371. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00058-X)
- Shehata, S. M., & El-yazied, A. A. (2015). Effect of Foliar Spraying with Amino Acids and Seaweed Extract on Growth Chemical Constitutes , Yield and its Quality of

- Celeriac Plant, (August 2011).
- Shioi, Y., Tamai, H., & Sasa, T. (1978). Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 19(2), 203–209. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a075586>
- Silva, R. (n.d.). Regulación de la Expresión Génica. 2007.
- Steelink, C. (1985). Implications of elemental characteristics of humic substances. Wiley.
- Stevenson, F. J., & J.J.Mortveds F., R. Cox L., M., Shuman R., M. W. (1994). Organic matter-micronutrient reactions in soil. Micronutrientes in Agriculture. In *Soil Science Society of America*. (p. PP:145-186.).
- Swan, H., Karalazos, A. (1990). Las melazas y sus derivados. *Revista Tecnologica*. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000098&pid=S0123-4226201000010001100021&lng=es
- Téllez, D. (2004). *Caracterización de las melazas empleadas en el proceso fermentativo de la destilería San Martín - Industria de Licores del Valle*. Santiago de Cal. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000108&pid=S1692-3561201100020000600019&lng=es
- Theis, N., & Lerdau, M. (2003). The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. *International Journal of Plant Sciences*, 164(S3), S93–S102. <https://doi.org/10.1086/374190>
- Turan, M., & Köse, C. (2004). *Seaweed extracts improve copper uptake of grapevine*. *Acta Agric. Scand.* (Vol. Sect. B). <https://doi.org/10.1080/09064710410030311>
- V. Erulan, P. Soundarapandian, G. Thirumaran, & G. Ananthan. (2009). Studies on the Effect of Sargassum polycystum (C.Agardh, 1824) Extract on the Growth and Biochemical Composition of *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*, 6, 392–399. <https://doi.org/1818-6769>
- Vaughan, D., & Malcom, R. E. (1985). Influence of humic substances on growth and physiological processes. In *Soil Organic Matter and Biological Activity* (p. 37–

76.). Dordrecht, The Netherlands.

- Villanueva-Couoh, E., Alcántar-González, ; G, Sánchez-García, P., Soria-Fregoso, ; M, & Larque-Saavedra, ; A. (2009). EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO Y DIMETILSULFÓXIDO EN LA FLORACIÓN DE [Chrysanthemum morifolium(Ramat) Kitamura] EN YUCATÁN. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(2), 25–31. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v15nspe/v15nspea5.pdf>
- von Liebig, J. (1840). *Química orgánica y su aplicación a la agricultura y a la fisiología*.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414, 562. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/35107108>
- Yu, C.-W., Murphy, T. M., & Lin, C.-H. (2003). Hydrogen peroxide-induced chilling tolerance in mung beans mediated through ABA-independent glutathione accumulation. *Functional Plant Biology*, 30, 955–963. <https://doi.org/10.1071/FP03091>
- Zhang, X., Ervin, E. H., & Schmidt, R. E. (2003). Plant Growth Regulators Can Enhance the Recovery of Kentucky Bluegrass Sod from Heat Injury. *Crop Science*, 43, 952–956. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.9520>
- Zhang, X., & Schmidt, R. E. (2000). Hormone-Containing Products' Impact on Antioxidant Status of Tall Fescue and Creeping Bentgrass Subjected to Drought. *Crop Science*, 40, 1344–1349. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4051344x>