

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Cuantificación de Giberelina A4 y trans Zeatina Ribosido, y su Relación en la Diferenciación Sexual del Sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.)

Por:

ADRIANA ROSABEL MARÍN CORTEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México
Noviembre 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Cuantificación de Giberelina A4 y trans Zeatina Ribosido, y su Relación en la Diferenciación Sexual del Sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.)

Por:

ADRIANA ROSABEL MARÍN CORTEZ


TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA


Aprobada


Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Asesor Principal


Dr. Antonio Juárez Maldonado
Coasesor


Dra. Silvia Yudith Martínez Amador
Coasesor


Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de Agronomía


Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México
Noviembre 2014

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi *Alma Mater la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*, ya que sin los apoyos que me ha brindado ni siquiera hubiera la oportunidad de continuar con mis estudios, de verdad atesoro cada una de las benevolencias hacia mi persona.

En segundo lugar, me gustaría agradecer al *Dr. Adalberto Benavides Mendoza* por facilitarme el material necesario para la realización de esta tesis, y así también a la *MC. Erika Nohemí Rivas Martínez*, por ayudarme y respaldarme en todo momento.

También quiero agradecer en demasía a la familia *Sosa Flores* por todo el apoyo y las consideraciones que me han tenido desde que llegue a esta ciudad, y por tratarme como un miembro más de su familia.

Sin duda, también quiero agradecer a mis compañeros de generación por hacerme la estancia en la Universidad lo más amena posible, y que de manera directa e indirecta contribuyeron y me acompañaron en este camino.

A mi familia le debo agradecer también, por dejarme seguir mis sueños, y apoyarme en todo momento.

Así también, a Dios por dejarme vivir esta hermosa vida.

Y por último, quiero agradecer a todas esas personas que en algún momento de mi vida, con sus alientos o desalientos han hecho de mí la persona que soy en la actualidad.

A todos, gracias.

“Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la posesión del conocimiento o de verdades irrefutables, sino la búsqueda desinteresada e incesante de la verdad...”

Karl Popper

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo en primera a mis maravillosos padres José Salomón Marín García y María Elena Cortez Aguilar; y a mis hermanos David Salomón Marín Cortez y María del Pilar Marín Cortez, porque ellos han sido la razón por la cual me encuentro en este lugar y en estas circunstancias. Sin su comprensión y amor ni siquiera tendría sentido estar aquí.

Para mis compañeros de generación de la carrera, que estuvieron conmigo en buenos y malos momentos.

Y por último quiero dedicarle este trabajo a todo los que me impulsaron y a los que dudaron de mí. Si se pudo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ÍNDICE DE CUADROS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. HIPÓTESIS.....	3
4. JUSTIFICACIÓN.....	4
5. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
5.1. <i>Dasyilirion cedrosanum</i>	5
5.1.1. Descripción botánica.....	5
5.1.2. Descripción morfológica.....	5
5.1.3. Especies.....	6
5.1.4. Distribución geográfica.....	7
5.1.5. Requerimientos climatológicos y geográficos.....	7
5.2. Usos e importancia.....	8
5.3. Problemática y solución.....	9
5.4. Evolución sexual en plantas.....	10
5.4.1. Plantas hermafroditas.....	11
5.4.2. Plantas monoicas.....	11
5.4.3. Plantas dioicas.....	12
5.5. Factores que intervienen en el sexo de las plantas.....	13
5.5.1. Marcadores moleculares.....	14
5.5.2. Genes y cromosomas relacionados al sexo.....	14
5.5.3. Análisis de Fitohormonas.....	15
5.6. Fitohormonas.....	15
5.6.1. Clasificación.....	16
5.6.2. Funciones e importancia.....	18
5.6.2.1. Función en la diferenciación sexual.....	18
5.7. Técnicas para cuantificar fitohormonas.....	19
5.7.1. Técnicas cromatográficas.....	20
5.7.1.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).....	20
5.7.1.2. Cromatografía de gases con detector de ionización de flama.....	23
5.7.1.3. CLAR con detector de masas.....	24
5.7.1.4. Cromatografía de gases con detector de masas.....	24
5.7.1.5. Cuantificación de fitohormonas por cromatografía.....	24

5.7.2. Técnicas Inmunológicas.....	25
5.7.2.1. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).....	25
5.7.2.2. Radioinmunoensayo (RIA).....	26
5.7.2.3. Cuantificación de fitohormonas por técnicas inmunológicas.....	26
5.7.3. Técnicas colorimétricas.....	27
5.7.3.1. Espectrofotometría UV-VIS.....	27
5.7.3.2. Cuantificación de fitohormonas por técnicas colorimétricas.....	28
5.7.4. Técnicas de biología molecular.....	28
5.7.4.1. PCR- Tiempo real.....	28
5.7.4.2. Western-Blot.....	29
5.7.4.3. Northest-Blot.....	29
5.7.4.4. Cuantificación de fitohormonas por técnicas de biología molecular.....	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1. Localización Geográfica del Área de Muestreo.....	31
6.2. Muestreo Dirigido.....	31
6.2.1. Identificación y Muestreo de planta de <i>Dasyllion cedrosanum</i>	31
6.3. Procesamiento de la muestra.....	32
6.3.1. Liofilización y almacenamiento.....	32
6.3.2. Extracción de hormonas.....	33
6.4. Cuantificación de Gibelina A4 por CLAR.....	34
6.5. Cuantificación de trans Zeatina Ribosido por CLAR.....	35
6.6. Análisis Estadístico.....	36
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
8. CONCLUSIONES.....	45
9. RECOMENDACIONES.....	46
10. ANEXOS.....	47
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Clasificación Taxonómica de <i>Dasyilirion cedrosanum</i> Trel.....	5
Cuadro 2. Funciones de los principales tipos de fitohormonas.....	18

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Apariencia típica de la planta de <i>Dasyilirion cedrosanum</i>	6
Figura 2. Región del desierto Chihuahuense y sus tres subregiones.....	7
Figura 3. Paisaje típico de área de distribución de <i>D. cedrosanum</i>	8
Figura 4. Bebida alcohólica llamada “Sotol” destilada a partir de <i>D. cedrosanum</i>	9
Figura 5. Estrategias sexuales en plantas.....	10
Figura 6. Representación esquemática de una planta hermafrodita.....	11
Figura 7. Representación esquemática de una planta monoica.....	12
Figura 8. Representación esquemática de una especie dioica.....	13
Figura 9. Estructuras químicas de las principales fitohormonas.....	17
Figura 10. Diagrama que muestra los componentes de un instrumento CLAR	22
Figura 11. Diagrama esquemático del detector por ionización de flama y el circuito asociado	23
Figura 12. Muestra de tejido de hoja con su respectivo envase y etiqueta.....	32
Figura 13. Liofilización de las muestras.....	33
Figura 14. Metodología de extracción de hormonas para su cuantificación en CLAR ..	34
Figura 15. Concentración de GA4 (a, b, c: hoja, piña y escapo) y tZR (d, e, f: hoja, piña y escapo) en plantas hembras y macho de <i>Dasyilirion cedrosanum</i>	38
Figura 16. Comportamiento del GA4 en distintos órganos de plantas hembra de <i>D. cedrosanum</i> durante muestreos semanales.....	40
Figura 17. Comportamiento del GA4 en distintos órganos de plantas macho de <i>D. cedrosanum</i> durante muestreos semanales.....	41
Figura 18. Comportamiento del tZR en distintos órganos de plantas hembra de <i>D. cedrosanum</i> durante muestreos semanales.....	42
Figura 19. Comportamiento del tZR en distintos órganos de plantas macho de <i>D. cedrosanum</i> durante muestreos semanales.....	43

RESUMEN

Aunque la sexualidad en plantas es muy diversificada al contar con especies hermafroditas, monoicas y dioicas, actualmente existe la interrogante sobre los factores que intervienen en la diferenciación sexual en especies dioicas. Partiendo de que el dioicismo depende no solo del genotipo, sino también de diferentes procesos de regulación, donde muchos de estos son de carácter hormonal, el objetivo del presente trabajo fue establecer el efecto individual de la Giberelina A4 y la trans Zeatina Ribosido, en relación con la diferenciación sexual en plantas hembra y macho de *Dasyllirion cedrosanum* Trel. Las fitohormonas fueron cuantificadas en hoja, piña y escapo de plantas silvestres localizadas en General Cepeda, Coahuila, México; durante cinco semanas, desde la aparición del escapo hasta la muerte de este órgano. La cuantificación de GA4 y tZR se llevó a cabo mediante la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con la detección de GA4 a 205nm y de tZR a 268nm. Los resultados obtenidos dan a conocer que no existe una diferencia significativa en los niveles hormonales de GA4 al comparar un mismo órgano entre plantas hembras y machos. Por otro lado, el comportamiento hormonal que fue exhibido por cada órgano de plantas de ambos sexos difiere para ambas hormonas, destacándose una mayor concentración de GA4 en las hojas de plantas de ambos sexos durante la tercera semana de muestreo. Los datos obtenidos no fueron concluyentes para establecer una diferencia entre plantas hembras y machos relacionada con GA4 o el tZR.

Palabras clave: Fitohormonas, Sexualidad en Plantas, Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, Dioicismo, *Dasyllirion* spp.

ABSTRACT

Although sexuality in plants is highly diversified by having hermaphrodite, monoecious and dioecious species, currently there is the question about the factors involved in sexual differentiation of dioecious species. Assuming that dioecism depends not only on the genotype, but also of different regulatory processes, where many of these are hormonal nature, the objective of this work was to establish the individual effect of Gibberellin A4 and trans Zeatin Riboside, in relation to sexual differentiation in female and male plants of *Dasyliirion cedrosanum* Trel. Phytohormones were quantified in leaf, crown and inflorescence of wild plants located in General Cepeda, Coahuila, Mexico; since the emergence of inflorescence until the death of this organ. The quantification of GA4 and TZR was carried out by the technique of High Performance Liquid Chromatography with the detection of GA4 to 205nm and tZR to 268nm. The results disclose that there is no significant difference in hormone levels when comparing GA4 in the same organ between male and female plants. Furthermore, the hormonal behavior of each organ, of male and female plants differs for both hormones, highlighting a higher concentration of GA4 in the leaves of both sexes in the third week of sampling. The data were inconclusive for differentiating between male and female plants related GA4 or TZR.

Keywords: Phytohormones, Sex on Plants, High Performance Liquid Chromatography, Dioecius, *Dasyliirion* sp.

INTRODUCCIÓN

El reino vegetal ha permanecido a través del tiempo gracias al paso de genes entre generaciones, lo cual se logra con la reproducción sexual y asexual. Ambos tipos de reproducción tienen ventajas y desventajas; sin embargo, es la reproducción sexual la que favorece la adaptación a los ambientes cambiantes (Jiménez y Matías, 2010). No obstante, a que la sexualidad en las plantas es muy diversificada, ya que podemos encontrar especies monoicas, dioicas y hermafroditas; solo el 5 % de las plantas pertenece a especies dioicas, siendo muchas de estas de un importante valor comercial (Giraldo *et al.*, 2004).

Aunque la diferenciación sexual en las plantas dioicas se relaciona con cambios en el genotipo de la planta; la manifestación o expresión de los caracteres sexuales depende no solo del genoma de ésta, sino también de diferentes procesos de regulación asociados con el efecto de las condiciones ambientales y cambios metabólicos internos, dichos procesos de regulación generalmente son de carácter hormonal. Khryanin (2007) establece que la diferenciación sexual en las plantas es un proceso que depende de la interrelación que existe entre los programas genéticos y hormonales.

De acuerdo con Soldatova y Khryanin (2010), se ha demostrado que las giberelinas y citoquininas, junto con otras fitohormonas, tales como: auxinas, ácido abscísico y etileno, desempeñan un papel decisivo en la sexualización de plantas dioicas, como lo ha sido para *Cannabis sativa*, *Cucumis melo* y *Cucumis sativus*.

Dentro de las plantas dioicas se encuentra el género *Dasyllirion* que está constituido por plantas de hojas fibrosas que parten de un tallo central formando una especie de corona, de la cual emerge un escapo compuesto de flores unisexuales. Éste género se encuentra distribuido en zonas áridas y altas del suroeste de Estados Unidos y Norte de México (Blogger, 1994), regiones en las cuales *D. cedrosanum* (especie perteneciente a *Dasyllirion*), representa un recurso natural de gran valor por sus distintos usos, donde destaca la elaboración de la bebida alcohólica llamada “sotol”. En los últimos años, a causa del aumento en la demanda de bebidas tradicionales

producidas a partir de agaves como el tequila y el mezcal, ha surgido el interés de producir sotol a escala industrial; por consiguiente, aumentó el número de solicitudes para aprovechamiento de la especie. De acuerdo con esto Coahuila posee un alto potencial en la elaboración e industrialización del sotol como bebida destilada. (Contreras y Ortega, 2005)

Si bien, hasta el momento no existe la explotación controlada de este recurso silvestre, es necesario originar información que nos proporcione las bases para promover e iniciar plantaciones dirigidas al uso industrial, esto con la finalidad de llevar a cabo el aprovechamiento de manera sustentable de *D. cedrosanum*, así como, de otras especies usadas para la elaboración del "sotol". Para lo anterior, se requiere dar solución a la interrogante del sexo en las plantas de sotol a una edad temprana, que complementarían en gran medida los lineamientos de explotación existentes.

Teniendo como antecedente que dentro de los distintos indicadores responsables de la diferenciación sexual en las plantas, la participación de las fitohormonas ha demostrado estar íntimamente relacionada con dicho proceso; se efectuó la cuantificación en tejidos de hoja, piña y escapo (inflorescencia) de *D. cedrosanum* de dos de las fitohormonas que han sido ampliamente reportadas como factores inductores de la diferenciación sexual, siendo estas: la giberelina A4 (GA4) y la trans Zeatina Ribósido (tZR).

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer si la concentración de Giberelina A4 y/o de trans Zeatina Ribósido se asocian con el sexo de las plantas de *Dasyilirion cedrosanum* Trel., ubicadas en una población de la localidad de General Cepeda, Coahuila, México.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar la concentración de Giberelina A4 en hoja, piña y escapo de plantas hembra y macho de *Dasyilirion cedrosanum* Trel, durante diferentes etapas del desarrollo de la inflorescencia.
- Cuantificar la concentración de trans Zeatina Ribósido en hoja, piña y escapo de plantas hembra y macho de *Dasyilirion cedrosanum* Trel, durante diferentes etapas del desarrollo de la inflorescencia.

HIPÓTESIS

Una diferencia en la concentración individual o combinada de Giberelina A4 y/o Trans Zeatina Ribósido se asocia con el sexo de las plantas de *Dasyilirion cedrosanum* Trel.

JUSTIFICACIÓN

Para los habitantes de zonas áridas y semiáridas de México, *D. cedrosanum* representa un recurso natural de gran valor por sus distintos usos, donde destaca la elaboración de una bebida alcohólica llamada “sotol”. En los últimos años, a causa del aumento en la demanda de bebidas tradicionales producidas a partir de agaves como el tequila y el mezcal, ha surgido el interés por producir sotol a escala industrial; por consiguiente, se originó un aumento en el número de solicitudes para aprovechamiento de la especie, lo que contribuye en un aumento del uso de las poblaciones naturales.

Sin embargo, dicho aprovechamiento no es sustentable, por lo cual es necesario originar información que nos proporcione las bases para llevar a cabo plantaciones dirigidas al uso industrial, suscitando la necesidad de dar resolución a la interrogante del sexo en plantas de sotol a edad temprana, que complementarían en gran medida los inventarios poblacionales existentes.

Por lo anterior, y teniendo como antecedente que dentro de los distintos indicadores responsables de la diferenciación sexual en las plantas, la participación de las fitohormonas ha demostrado estar íntimamente relacionada con dicho proceso; se ha considerado la cuantificación de Giberelina A4 y trans Zeatina Ribósido en hoja, piña y escapo de plantas macho y hembras de *D. cedrosanum* como una alternativa para la identificación del sexo en esta planta.

REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. *Dasyllirion cedrosanum*

El tipo de vegetación más prominente del norte de México es el matorral desértico Chihuahuense, la cual incluye el matorral rosetófilo de *Dasyllirion cedrosanum*, cuya especie característica es sometida a una explotación intensa en sus comunidades nativas para distintos fines. Sin embargo, hay un gran desconocimiento en torno a los efectos de este aprovechamiento sobre la estructura de las comunidades silvestres (Encina *et al*, 2003).

5.1.1. Descripción botánica

El género *Dasyllirion*, conocido en México como “sotol”, y en los Estados Unidos de América como “desert spoon” (cuchara del desierto) (Gardea *et al*, 2011), comprende alrededor de 14 a 18 especies (Cano *et al*, 2005). Este género forma parte de la familia Nolinaceae, la cual comprende cerca de 200 géneros y 2500 especies ampliamente distribuidos (Arce *et al*, 2003). El **Cuadro 1** muestra la clasificación taxonómica de *D. cedrosanum*.

Cuadro 1. Clasificación Taxonómica del *Dasyllirion cedrosanum* Trel.

Reino:	Plantae
Phyllum:	Magnoliopsida
Clase:	Liliopsida
Suclase:	Lilidae
Orden:	Liliales
Familia:	Nolinaceae
Género:	<i>Dasyllirion</i>
Especie:	<i>cedrosanum</i> Trel.

5.1.2. Descripción morfológica

D. cedrosanum Trel., es una planta monocotiledonea, acaule y dioica, cuyas flores hembra y macho nacen en plantas separadas; este género cuenta con hojas lineares de color grisáceas pálidas a verde pálido, de un largo aproximado de 1m y 2cm de ancho, con una distribución lateral de espinas, y cuyo acomodo de las hojas forma una estructura conocida como roseta (Robles *et al*, 2008). *Dasyllirion* tiene una

estructura conocida como inflorescencia, la cual llega a medir hasta 5 m de alto (Benavides *et al.* 2010). De acuerdo a lo anterior en la **Fig. 1** se muestra la apariencia típica de la planta de Sotol.



Fig. 1. Apariencia típica de la planta de *Dasyliirion cedrosanum*.

5.1.3. Especies

El género *Dasyliirion* es resistente al frío y a la sequía (Mielke, 2010), éste tiene al menos 17 especies, de las cuales solo 4 o 6 de éstas se ven regularmente en el cultivo (Stein, 2008). El número de especies varía de acuerdo a los reportes de diferentes autores, de acuerdo con Bogler (1994), en México existen 14 especies de este género las cuales son: *Dasyliirion ecotrichum*, *D. glaucophyllum* (estado de México.), *D. graminifolium*, *D. inermis* (San Luis Potosí), *D. leiophyllum* (Chihuahua y oeste de Coahuila), *D. longissimum*, (México), *D. miquihuanense* (Tamaulipas), *D. parrianum* (San Luis Potosí), *D. serratifolium* (sureste de México), *D. simplex* (Durango, México), *D. texanum* (norte de Coahuila), *D. texanum* var. *Avernas* (México), *D. wheeleri* (Sonora, Chihuahua y Durang), *D. cedrosanum* (centro y sur de Coahuila), *D. heteroteca* (norte de Coahuila).

5.1.4. Distribución geográfica

La distribución geográfica de la planta de sotol es típica del matorral desértico rosetófilo, su área de distribución corresponde al Desierto Chihuahuense (**Fig. 2**), que incluye parte de los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, Zacatecas y San Luis Potosí (Benavides *et al.* 2010).



Fig. 2. Región del desierto Chihuahuense y sus tres subregiones. Az=Arizona, NM=Nuevo Mexico, TX=Texas, Chih=Chihuahua, Coah=Coahuila, NL=Nuevo Leon, Tamps=Tamaulipas, Dgo=Durango, Zac=Zacataecas, SLP=San Luis Potosi, Gto=Guanajuato, Qro=Queretaro, Hgo=Hidalgo.

5.1.5. Requerimientos climatológicos y geográficos

D. cedrosanum se desarrolla en diversos tipos de terreno, preferentemente en lomeríos de suelos someros y bien drenados, en donde convive con una gran variedad de formas de vida (Cano *et al*, 2005). El hábitat de esta planta es el matorral xerófilo de zonas secas, particularmente en los matorrales desértico rosetófilo y crasirrosulifolio espinoso (**Fig. 3**), es común encontrarlo sobre granito y piedra caliza formando a veces grandes áreas en terrenos calizos y en elevaciones moderadas y altas hasta de 3,000 msnm (Robles *et al*, 2008).



Fig. 3. Paisaje típico de área de distribución de *D. cedrosanum*.

5.2. Usos e importancia

En el norte de México las especies del género *Dasyliirion* pertenecientes a la familia *Nolinaceae* son conocidas como sotoles. Estas plantas son utilizadas como alimento, forraje, productos medicinales y material para elaborar diversos utensilios (Bogler, 1994). En el semidesierto, las plantas de este género forman parte de los productos forestales no maderables, debido a que tiene un alto valor por sus múltiples usos, los que van desde su utilización como ornamento, empleo en prácticas rituales, religiosas, y actividades festivas (Robles *et al*, 2008).

Otros de los usos dados a esta planta se centra en utilizar sus tallos denominados “piñas” para elaborar industrialmente una bebida alcohólica llamada “sotol” (**Fig. 4**). El sotol se caracteriza por ser una bebida con sabor auténtico que tradicionalmente se ha elaborado en la región desértica de Coahuila, por lo cual se le otorgó a esta entidad junto con los estados de Chihuahua y Durango la denominación de “origen” de la bebida alcohólica denominada sotol (Villavicencio *et al*, 2007).



Fig. 4. Bebida alcohólica llamada “Sotol” destilada a partir de *D. cedrosanum*.

5.3. Problemática y solución.

Debido al creciente interés comercial que ha surgido por la bebida de sotol, se ha desarrollado una sobreexplotación de la planta de manera asistemática, lo cual ha provocado una grave escasez de este recurso natural (Coria, 1999). Es por ello que para lograr un aprovechamiento sustentable de este recurso es importante conocer la biología de la planta, desde sus primeras etapas de crecimiento (Vega *et al*, 2006). Cabe destacar que dicho aprovechamiento se ve limitado debido a que las plantas de esta especie son dioicas; es decir son plantas que desarrollan flores unisexuales con un solo tipo de gametos; en palabras más claras, son plantas desarrollan flores con estambres (masculinas) y flores con pistilos (femeninas) en plantas separadas (Melgosa y Sierra, 2004); esto ocasiona una incertidumbre en su diferenciación ya que no posee dimorfismo sexual visible (Zarate, 2003), por lo cual el uso de las plantas de sotol se lleva a cabo sin respetar el sexo, lo que repercute en el equilibrio natural de la especie necesario para llevar con éxito la futuras reproducción de la especie.

5.4. Evolución sexual en plantas

Para la descripción adecuada de la diferenciación sexual en plantas, como en el caso de *D. cedrosanum*, primero mencionaremos que la sexualidad en el reino vegetal es muy versátil, y va desde especies con individuos que poseen flores de un solo sexo, hasta especies que poseen flores completas o hermafroditas en cada uno de sus individuos (Jimenez y Matias, 2010).

El estudio de la evolución de estos diferentes sistemas reproductivos en las plantas nos ha ayudado a entender los cambios que han ocurrido en las características florales que intervienen directa o indirectamente en la reproducción, y que repercusiones tienen estas características a nivel genético y ecológico en las especies (Cuevas y Abarca, 2006).

Los cambios a través del tiempo de diferentes tipos reproductivos quedan manifestados en la aparición de diferentes formas transitorias entre hermafroditas y las dioicas. (Ver **Fig. 5**) Como las del tipo bisexual en plantas monoicas (o intersexuales), que sugiere un camino evolutivo desde el monoicismo hacia la dioecia, que corrobora la creencia que las flores bisexuales (hermafroditas) son más primitivas que las unisexuales (Khryanin, 2007).

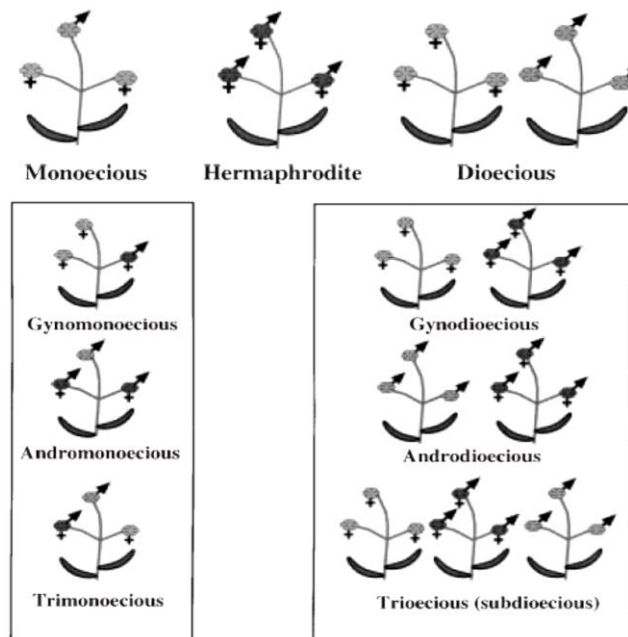


Fig. 5. Estrategias sexuales en plantas.

5.4.1. Plantas hermafroditas

Teniendo como antecedente que en las angiospermas, el hermafroditismo está considerado como la condición ancestral a partir de la cual ha evolucionado el repertorio de sistemas reproductivos que se conocen en la naturaleza (Cuevas y Abarca, 2006), puede explicarse de forma sintetizada que las especies cuyas flores contienen ambos sexos en una misma flor (**Fig. 6**) son las llamadas hermafroditas (Jimenez y Matias, 2010); es decir, que las plantas hermafroditas son aquellas que tienen estructuras reproductivas masculinas y femeninas en la misma flor (Cuevas y Abarca, 2006).

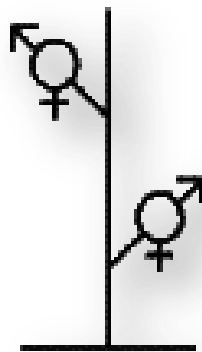


Fig. 6. Representación esquemática de una planta hermafrodita.

5.4.2. Plantas monoicas

Dentro de las formas unisexuales de floración a la que han evolucionado muchas especies, se encuentra la monoecia, que es una característica donde encontramos los órganos masculinos y femeninos en flores separadas pero en la misma planta (**Fig. 7**) (Ainsworth, 2000), es decir, en un individuo podemos encontrar flores de ambos sexos (Jiménez y Matías, 2010). Este sistema sexual ha evolucionado en el 7% de las angiospermas (Chávez y Vázquez, 2012).

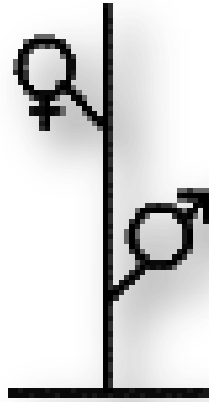


Fig. 7. Representación esquemática de una planta monoica.

5.4.3. Plantas dioicas

Otras de las formas unisexuales a las que han evolucionado muchos individuos, es la llamada dioecia. En las plantas hace referencia a la que la distribución de las flores masculinas y femeninas se encuentran en individuos separados, distinguiéndose las plantas macho por sus flores estaminadas y las plantas hembras por sus flores pistiladas (**Fig. 8**) (Ainsworth, 2000). Las plantas dioicas se diferencian de las hermafroditas y monoicas, en que las flores de un individuo son masculinas o femeninas (Cuevas y Abarca, 2006).

Se conoce que aproximadamente el 5% de las especies del reino vegetal son dioicas (Giraldo *et al*, 2004), donde solo las hembras producen semillas (Heilbuth, 2001). Y aunque es poco lo que se ha estudiado sobre los beneficios de esta estrategia evolutiva, existe la hipótesis de que la dioecia envuelve un mecanismo que reduce la autopolinización (Heilbuth, 2000).

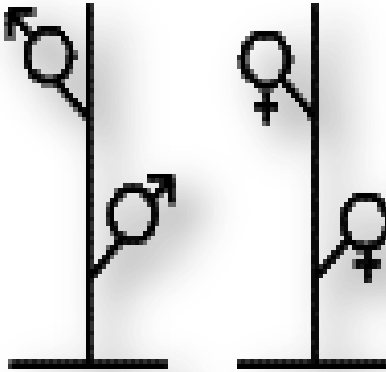


Fig. 8. Representación esquemática de una especie dioica.

5.5. Factores que intervienen en el sexo de las plantas

Refiriéndonos a especies dioicas, en muchas de estas el sexo del individuo solo es revelado hasta alcanzar la madures, cuando aparecen los órganos sexuales (flores), lo cual puede tomar de meses a años (Giraldo et al, 2004). Ahora bien, la diferenciación sexual en plantas superiores, implica tres campos de investigación, de acuerdo a estudios de tejidos, órganos y a los genéticos: la identificación de marcadores específicos para estambres o carpelos (programa de expresión); el análisis de las señales de inducción (tales como fitohormonas); y, finalmente, el conocimiento de los genes reguladores (genes de determinación sexual) (Durand y Durand, 1984).

Teniendo en consideración esos tres aspectos, la diferenciación sexual se manifiesta de acuerdo a la expresión genética tanto de genes sexuales específicos y de genes de expresión sexual, misma que se manifiesta en la regulación mediante fitohormonas para la inducción o inhibición del desarrollo de los órganos sexuales. Lo anterior implica una interrelación entre los tres aspectos que puede ser determinada de forma analítica mediante estudios bioquímicos y genéticos

5.5.1. Marcadores moleculares

Aunque en el caso del enfoque molecular aún no se ha identificado con éxito genes de determinación primaria del sexo de cualquier especie dioica, se han generado una serie de marcadores moleculares ligados al sexo, que han surgido tanto de los programas de mapeo genético o de la investigación orientada a la búsqueda de marcadores ligados al sexo de las especies dioicas agrónomicamente importantes (Ainsworth, 2000)

Hay que tener presente que además de las ventajas agronómicas existentes, las técnicas moleculares aportan métodos para la identificación de sexos, que sirven eficientemente como herramienta para la conservación y la gestión de especies amenazadas (Godoy, 2009).

Por ejemplo, Gilardo *et al* (2004) determinaron marcadores moleculares AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados) asociados al sexo de la planta *Borojoa patinoi* (Borojó).

5.5.2. Genes y cromosomas relacionados al sexo

A diferencia de los animales donde los cromosomas sexuales han evolucionado independientemente hasta presentar formas heteromórficas, solo unas pocas especies vegetales dioicas contiene este tipo de cromosomas heteromórficos (Giraldo *et al*, 2004), por lo que su identificación sexual mediante genes y cromosomas suele ser más difíciles que en los animales.

Los cromosomas sexuales se cree que han evolucionado a partir de un par autosómico a través de la acumulación de genes determinantes del sexo y la interrupción de la recombinación X-Y que en última instancia condujo a la formación de los cromosomas sexuales heteromórficos (Sola *et al*, 2012).

En el caso de algunas plantas monoicas, el proceso de determinación sexual se desarrolla y regula por genes determinantes del sexo. Esto se aprecia en el caso de genes mutantes que modifican la expresión sexual, abortando los estambres y cambiando el sexo inicial de flores estaminadas (machos) a flores pistiladas

(hembras), y aunque estas mutaciones tienen poco efecto sobre el desarrollo vegetativo de la planta, afectan específicamente a sus caracteres sexuales (Dellaporta y Calderón, 2003)

Un ejemplo de una especie dioica heteromorfa es *Silene latifolia*, la cual presenta genes $2n=22,XX$ en hembras y $2n=22,XY$ en machos (Scutt *et al*, 1997) aunque esto es relativamente raro en especies vegetales debido a que las diferencias no son tan pronunciadas como en animales (Khryanin, 2007).

5.5.3. Análisis de Fitohormonas

La diferenciación de los órganos sexuales de las plantas (estambre y pistilo) está influenciada por varios los factores ambientales debido a que el medio ambiente a su vez influyen en el nivel de las fitohormonas endógenas importantes en la diferenciación sexual, independientemente de los programas genéticos de la planta (Bracali *et al*, 1990). Un ejemplo de lo anterior es el cambio de sexo mediante la aplicación de hormonas, que indica que en algunas plantas, los genes necesarios para el desarrollo del androceo y gineceo son funcionales en ambos sexos, pero contenidos debido a otros factores.

La acción de las hormonas particulares en feminización o masculinización de las flores parece ser dependiente de la especie. Esta variación que se observa en las plantas puede reflejar diferencias subyacentes en mecanismos de determinación del sexo (Dellaporta y Calderon, 1993).

Este grupo de compuestos químicamente variados, llamadas fitohormonas, los cuales regulan algunos procesos fisiológicos en las plantas se describen con mayor amplitud a continuación.

5.6. Fitohormonas

Las hormonas vegetales también conocidas como fitohormonas son reguladores químicos producidos por las mismas plantas, que en bajas concentraciones regulan diversos procesos fisiológicos (estimulando, inhibiendo o modificando el desarrollo) (Weaver, 1996; Vaclav *et al*, 2009). Se sintetizan en una parte u órgano de la planta

a concentraciones muy bajas (<1 ppm) (Liu *et al*, 2012) y actúan en ese sitio o se traslocan. Quedando fuera de esa definición los nutrimentos porque las plantas no los producen, así mismo los aminoácidos y enzimas por encontrarse en mayores concentraciones en la planta. (Díaz, 2014) De hecho, las aplicaciones prácticas de estos compuestos son muy diversas y su utilización actual en agricultura es frecuente y en continuo aumento (Castillo *et al*, 2005).

5.6.1. Clasificación

Para su clasificación se consideran principalmente cinco tipos de fitohormonas: (1) auxinas, (2) gibelinas, (3) citocininas, (4) etileno y (5) ácido abscísico (**Fig. 9**). Aunque existen otros tipos de fitohormonas estas cinco clases son las que mejor se conocen y por tanto son las más estudiadas (Audesik *et al*, 2003).

- (1) Auxinas: son hormonas que se producen en los meristemos apicales de brotes y en los ápices de los coleoptilos (Raven *et al*, 1992). Por lo general, estos compuestos son ácidos de núcleo cíclico insaturado o derivados de estos ácidos (Weaver, 1996).
- (2) Giberelinas: Esta hormona ha sido aislada a partir de un hongo parásito que causa un crecimiento anormal de las plántulas de arroz, sin embargo, son hormonas naturales del crecimiento de muchas plantas (Raven *et al*, 1992). Químicamente constituyen una familia de diterpenos tetracíclicos ácidos, cuya estructura básica está constituida por un anillo de *ent*-giberelano (Azcón y Talón, 2008).
- (3) Citocininas: estas forman un segundo grupo de hormonas del crecimiento, químicamente están relacionadas con los ácidos nucleicos (Raven *et al*, 1992). Muchas citocininas exógenas y todas las endógenas derivan probablemente de la adenina, una base nitrogenada de la purina (Weaver, 1996). Todas ellas poseen un sustituyente, de naturaleza isoprenoide o aromática, en el nitrógeno amínico 6 del anillo de purina, y suelen encontrarse

en las plantas como bases libres o formando conjugados con diversos compuestos (Azcón y Talón, 2008).

- (4) Etileno: es un gas producido por la combustión incompleta de los hidrocarburos, aunque también es un regulador natural del crecimiento vegetal (Raven *et al*, 1992). Es la molécula con actividad reguladora del desarrollo, de estructura química más simple con actividad en forma gaseosa (Azcón y Talón, 2008).
- (5) Ácido Abscísico ($C_{15}H_{20}O_4$): ha demostrado tener efectos opuestos a las hormonas estimuladoras de crecimiento (Raven *et al*, 1992). Es un sesquiterpeno apocarotenoide que se sintetiza en los cloroplastos y otros plastidios (Azcón y Talón, 2008).

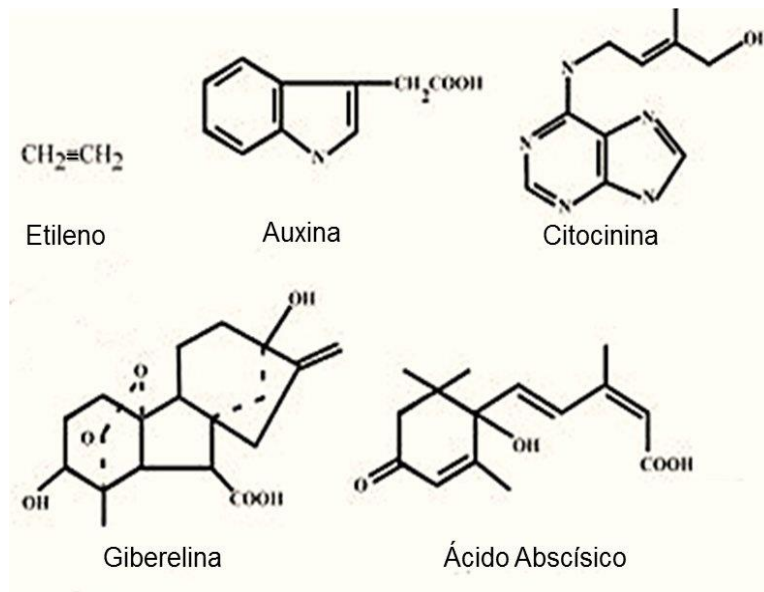


Fig. 9. Estructuras químicas de las principales fitohormonas.

Con respecto a la función específica de cada grupo en la planta, estas se describen en el apartado siguiente.

5.6.2. Funciones e importancia

Cada hormona puede suscitar diversas respuestas de las células de la planta, dependiendo de factores como el tipo de célula blanco, la especie, la etapa de desarrollo de la planta, la concentración de la hormona y la presencia de otras hormonas (Audesik *et al*, 2003)

Cuadro 2. Funciones de los principales tipos de fitohormonas.

Fitohormona	Funciones Típicas
Ácido Abscísico	Mantiene la dormancia en semillas y, en particular, la dormancia de invierno (Purves y Sadava, 2009). Induce al cierre de los estomas (Azcón y Talón, 2008).
Auxinas	Promueve la elongación del tallo y el crecimiento del fruto (Vaclav et al, 2009). Induce la elongación de las células de los brotes (Weaver, 1996). Inhibe el crecimiento de las yemas axilares y la abscisión foliar (Purves y Sadava, 2009). Regulan la proliferación de raíces y su elongación, tanto como la dominancia apical (Burgos et al, 2009)
Citocininas	Inhibe la senescencia foliar; promueve la división celular (Weaver, 1996), la morfogénesis (Vaclav et al, 2009) y el crecimiento de la yema axilar al reducir la dominancia apical (Azcón y Talón, 2008), Afecta el crecimiento de la raíz (Purves y Sadava, 2009).
Etileno	Promueve la maduración del fruto (Weaver, 1996) y la abscisión de la hoja (Purves y Sadava, 2009). Inhibe la elongación del tallo y el gravitropismo al inducir a la formación de raíces laterales, adventicias y pelos radiculares (Azcón y Talón, 2008).
Giberelina	Promueve la germinación de la semilla, el crecimiento del tallo, así como el desarrollo del fruto (Azcón y Talón, 2008), Interrumpe la dormancia invernal, Moviliza nutrientes de reserva en las semillas de los pastos (Purves y Sadava, 2009).

5.6.2.1. Función en la diferenciación sexual

Una de las diversas funciones desempeñadas por las fitohormonas, es su participación en la diferenciación de órganos florales, o sea, en la expresión de diferenciación sexual de las plantas.

Dentro de estos compuestos de regulación hormonal, las Giberelinas inducen la formación de elementos florales y adicionalmente pueden afectar la determinación sexual (Jordan y Casaretto, 2006) al intervenir en la regulación del desarrollo de la flor y promover la expresión de genes homeóticos florales que antagonizan los efectos de las proteínas DELLA, permitiendo de ese modo el continuo desarrollo de la flor (Yu *et al*, 2004). Además de que éstas han demostrado tener un papel importante en la estimulación de flores y en la diferenciación sexual, como se ha visto, en plantas de la familia *Pinaceae* (Pharis y Kou, 1988)

También el etileno ha demostrado desempeñar un papel muy importante en la determinación del sexo de las flores en las plantas monoicas. En cucurbitáceas, por ejemplo, los niveles altos de giberelinas se asocian a la masculinización, pero un tratamiento con etileno cambia la expresión sexual a favor de la feminización de la flor (Papadopoulou y Grumet, 2005). En el pepino (*Cucumis sativus*) se encontró que las yemas florales femeninas contenían más etileno que las yemas florales masculinas. Además, los pepinos que estaban en condiciones lumínicas de día corto, que provoca feminización, liberaban mucho más etileno que los que estaban en condiciones de día largo (Norato y Espejo, 1985). Lo anterior demuestra que en las cucurbitáceas el etileno está relacionado con la regulación de la expresión sexual provocando la feminización de las flores (Raven *et al*, 1992).

El Ácido Abscísico en cambio no se puede considerar de forma aislada, y su participación en varios procesos depende de antagonismo con otras fitohormonas. Por ejemplo, se ha propuesto que las concentraciones opuestas entre Ácido Abscísico y Acido Indolacetico aceleran el desarrollo floral de *Solidaster luteus* (Flórez y Alexio, 2009).

5.7. Técnicas para cuantificar fitohormonas

Muchos de los procedimientos utilizados en la determinación de hormonas vegetales han sido establecidos para la cuantificación de las mismas en una amplia variedad de tejidos, sin embargo, estos en su mayoría están pigmentados y contienen muchos compuestos que se copurifican junto con las hormonas (Olivella *et al*, 2001).

A dentro de las metodologías más utilizadas en la separación, identificación y cuantificación de las fitohormonas encontramos las siguientes:

5.7.1. Técnicas cromatografías

Aunque la cromatografía es uno de los métodos de separación por excelencia, también es posible su empleo en análisis cualitativo (aplicando sistemas de detección específicos como espectrómetros de masas, infrarrojos o resonancia magnética nuclear, entre otros) y, sobre todo, cuantitativo (Legaz *et al*, 2011).

La cromatografía es un método muy empleado para la separación, identificación y determinación de los componentes químicos presentes en mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan poderoso y tiene tantas aplicaciones como la cromatografía (Skoog *et al*, 2001). Las técnicas cromatográficas se basan en la separación de los solutos a lo largo de una columna que contiene un relleno que es el encargado de la separación química de los compuestos con base a su afinidad por algunos compuestos polares o apolares, o en algunos casos por grupos funcionales específicos y, por supuesto, la separación de estos compuestos depende de las diferentes velocidades de migración de cada uno de los solutos (Day y Underwood, 1989).

5.7.1.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

Una de las técnicas utilizadas para la cuantificación de compuestos químicos en componentes biológicos es la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Esta se puede utilizar como técnica preparativa y como técnica analítica, permitiendo la purificación, identificación y cuantificación del analito deseado (Hernández, 2005).

Es incuestionable que esta técnica ha ganado popularidad debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, campos de la

ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos esteroides, especies organometálicas y una cierta variedad de sustancias inorgánicas (Gomis, 2008).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es la técnica más versátil y utilizada a comparación de las otras técnicas de cromatografía de elución. Se utiliza para separar y determinar las especies presentes en muestras de materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos, donde la fase móvil es un disolvente líquido que contiene a la muestra como mezcla de solutos (Skoog *et al*, 2001).

Un equipo de CLAR se compone de varios módulos con funciones definidas donde la circulación de la fase móvil se hace a través de conductos tubulares cortos de pequeño diámetro interno: incluyendo además una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través de la columna (Rouessac y Rouessac, 2000). En la **Fig. 10** se muestra un diagrama con los componentes de un instrumento CLAR.

En la CLAR no existe un sistema de detección universal de alta sensibilidad, así que el sistema de detección usado depende de la naturaleza de la muestra (Skoog *et al*, 2001). Sin embargo, cualquier detector empleado debe reunir un cierto número de cualidades, entre las que se encuentran las siguientes: dar a cada compuesto detectado una respuesta proporcional a su concentración instantánea, ser sensible y tener poco ruido de fondo (Rouessac y Rouessac, 2000). A continuación se describen los detectores más comunes:

Detector UV-VIS. Los detectores más generalizados en cromatografía de líquidos están basados en la absorción de la radiación ultravioleta/visible. Se encuentran en el comercio tanto fotómetros como espectrofotómetros diseñados específicamente para adaptarlos a columnas cromatográficas (Skoog *et al*, 2001). Se utiliza mucho la detección espectrofotométrica, por lo general en la región ultravioleta, aunque lo ideal es que un espectrofotómetro con una gama completa de longitudes de onda pueda proporcionar una flexibilidad máxima para detectar diferentes clases de solutos con mayor sensibilidad (Day y Underwood, 1989).

Detector Fluorescencia. Los detectores que se basan en la fluorescencia son cada vez más comunes, su principio se base en proporcionar una excitación variable continua en un amplio rango de longitud de onda, y transmitir la emisión fluorescente a un fotodetector (Day y Underwood, 1989). Los compuestos fluorescentes reemiten en forma de luz todo o parte de la radiación de la fuente luminosa a la que están sometidos, así que la intensidad de fluorescencia emitida es proporcional a la concentración de la sustancia evaluada (Rouessac y Rouessac, 2000).

Detector de arreglo de Diodos. El detector de diodos permite no solamente obtener un cromatograma, sino también proporcionar informaciones espectrales que puedan servir para asegurar la identidad de los compuestos separados (Rouessac y Rouessac, 2000). Los fotodiodos de silicio se fabrican en pequeños chips, que contienen más de mil fotodiodos uno junto a otro, formando detectores que pueden medir simultáneamente todas las longitudes de onda, permitiendo una espectroscopia muy rápida (Skoog et al, 2001).

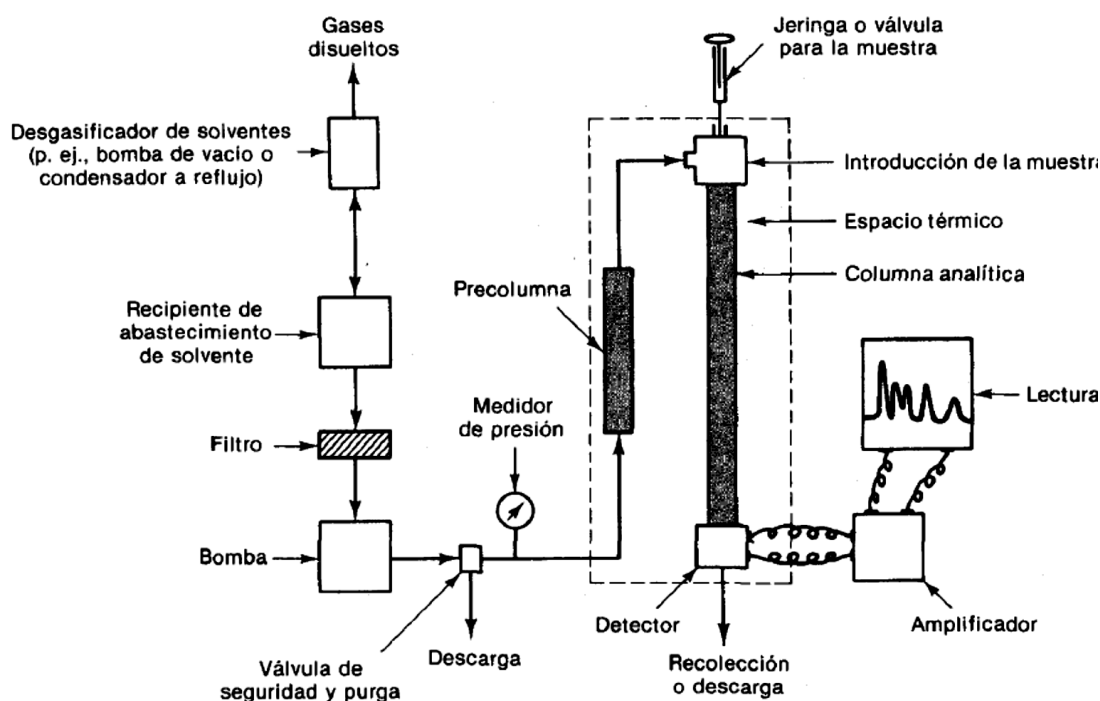


Fig. 10. Diagrama que muestra los componentes de un instrumento CLAR.

5.7.1.2. Cromatografía de gases con detector de ionización de flama

La cromatografía gas-liquido (GC) permite separar los componentes de una muestra vaporizada en virtud de que estos se distribuyen entre una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria liquida contenida en la columna. Básicamente, es una técnica que se aplica para separar especies que tienen una volatilidad apreciable y se mantienen estables a temperaturas superiores a los 100 grados centígrados (Skoog *et al*, 2001).

El detector por excelencia de la cromatografía de gases es el detector por ionización de flama (FID), y es prácticamente considerado un detector universal para compuestos orgánicos (Rouessac y Rouessac, 2000), ya que es el detector que presenta mayores aplicaciones. En la **Fig. 11** se aprecia el esquema del detector por ionización de flama y el circuito asociado.

Aunque el principio general del GC consiste en que el gas que sale de la columna se mezcla con hidrogeno y se quema en la punta de un mechero metálico, para después aplicar un potencial entre el mechero y un electrodo. El gas aumenta su capacidad de conductor mientras una corriente fluye en el circuito que pasa a través de una resistencia y el voltaje que se origina es registrado. En este caso la concentración de iones y la magnitud de la corriente, dependen de la velocidad con la que llegan las moléculas de soluto a la flama (Day y Underwood, 1989).

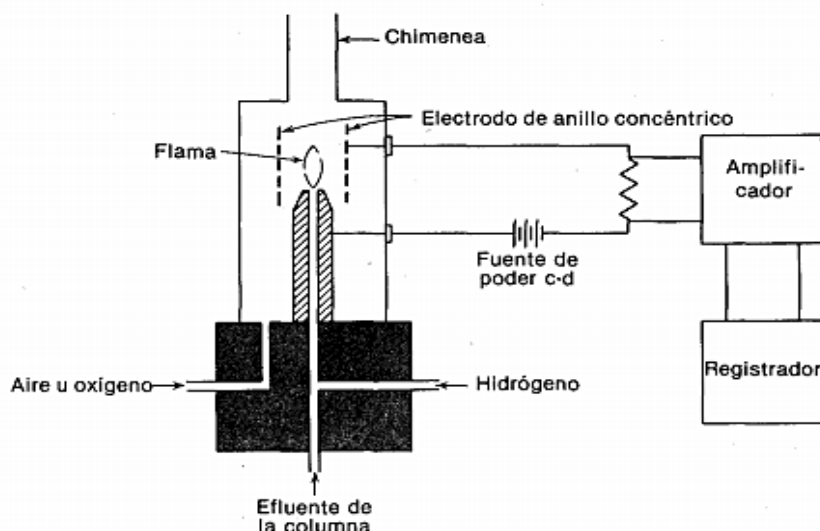


Fig. 11. Diagrama esquemático del detector por ionización de flama y el circuito asociado.

5.7.1.3. CLAR con detector de masas

Para el análisis de muestras complejas es frecuente separar previamente los constituyentes por medio de una técnica cromatografía en interface con el espectrofotómetro de masas. Debido a que el acoplamiento CLAR/MS es complejo como consecuencia de la presencia de disolventes de elución que a menudo contienen agua, debe usarse un separador de haces de partículas. De forma más o menos directa, las mejoras técnicas derivadas del acoplamiento CLAR/MS ha hecho progresar la cromatografía líquida hasta la miniaturización (Rouessac y Rouessac, 2000).

5.7.1.4. Cromatografía de gases con detector de masas

La CG a menudo va acoplada con técnicas selectivas de espectroscopia y electroquímica, donde los métodos resultantes son llamados métodos acoplados, y constituyen herramientas potentes para identificar los componentes de mezclas complejas (Skoog et al, 2003). La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles (Gutiérrez y Droguet, 2002). El acoplamiento CG/MS es sencillo: se hace desembocar la columna capilar en la cámara de ionización; los compuestos puros llegan, por lo tanto, en forma gaseosa y son analizados uno detrás de otro; por lo que al adaptar un detector de masas, se obtiene el espectro de fragmentación de cada uno de los compuestos eluidos (Rouessac y Rouessac, 2000). Como método de cuantificación para análisis de fitohormonas mediante el uso de marcadores estables esta técnica se vuelve específica, sensible y precisa (Flórez, 1997).

5.7.1.5. Cuantificación de fitohormonas por cromatografía

Los métodos cromatógrafos son utilizados en sus diferentes versiones para la identificación y cuantificación de fitohormonas por su gran fiabilidad, como en el caso Ulger *et al* (2007) que utilizó la cromatografía de gases con detector FID para la

cuantificación de Ácido Abscísico, Ácido Indolacético, Giberelina A3, Giberelina A4 y Zeatina en olivo (*Olea europea*).

Además de que se ha demostrado la rápida separación y determinación de gran grupo de fitohormonas, como lo demostraron Vaclav *et al* (2009) al utilizar la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detector UV-VIS para la determinación de fitohormonas y metabolitos de forma simultánea.

5.7.2. Técnicas Inmunológicas

Para llevar a cabo la realización de técnicas inmunológicas se utilizan enzimas para la marcación de anticuerpos. Las enzimas, en contacto con el sustrato adecuado lo transforman (hidrolizan) químicamente y forman un producto coloreado que permite la cuantificación de la reacción por colorimetría (Florez, 1997). En otras palabras, las técnicas inmunológicas se fundamentan en la formación de un complejo antígeno-anticuerpo (Villa, 1994).

Los métodos inmunoenzimáticos están siendo ampliamente utilizados en la determinación de las hormonas vegetales, debido a su bajo costo y a su sencillez. Aunque se pueden utilizar directamente sobre el extracto vegetal, se recomienda la inclusión de una o varias etapas previas de purificación del mismo (Olivella *et al*, 2001).

De los métodos inmunológicos o inmunoenzimáticos más utilizados están el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) y el Radioinmunoensayo (RIA), los cuales están descritos en los apartados siguientes.

5.7.2.1. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

El Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (por sus siglas en inglés ELISA) es un inmunoensayo que permite determinar la concentración de un antígeno o de un anticuerpo mediante el anclaje de uno de ellos a una fase sólida mientras el otro

queda en solución, detectándose mediante una enzima marcadora del complejo antígeno-anticuerpo formado (Villa, 1994).

El ELISA es una técnica menos dispendiosa y más segura debido a la naturaleza poco peligrosa de las sustancias químicas utilizadas, haciéndola muy apropiada para la cuantificación de fitohormonas (Florez, 1997).

5.7.2.2. Radioinmunoensayo (RIA)

Al Radioinmunoensayo (RIA), también se le ha denominado ensayo de saturación, análisis de desplazamiento, análisis de enlace insaturado, análisis de fracción no enlazada, radioensayo de dilución, análisis competitivo, radioensayo de enlace competitivo y ensayo inmunoradiométrico. Se caracteriza por estar constituidos por tres componentes básicos, la molécula enlazadora (ligador), la molécula que se desea enlazar (analito o ligando) y otro ligando marcado (trazador). La molécula ligadora debe ser capaz de unirse únicamente con aquella que interesa medir, es decir, debe ser específica; esto permite al unidor enlazarse con un tipo de molécula a pesar de existir varias moléculas estereoquímicamente semejantes (Montes, 1995).

El efecto anterior se resume, en que la base del RIA consiste: en la inhibición competitiva de la unión de un antígeno con marca radioactiva a su anticuerpo específico por parte del antígeno no marcado (Villa, 1994). Así, en las técnicas de Radioinmunoensayo, además de sensibilidad y la rapidez de los análisis, se tiene una alta capacidad de procesamiento de la muestra (Florez, 1997).

5.7.2.3. Cuantificación de fitohormonas por técnicas inmunológicas

Los métodos inmunológicos son muchas veces usados como método previo de cuantificación antes de utilizar métodos sofisticados (como son los distintos sistemas cromatograficos) debido a su uso poco complejo y más accesible económicamente, como lo realizado por Genkov *et al* (2006) que probaron la fiabilidad del ELISA al analizar diversas citocininas (zeatina, isopenteniladenina y dihidrozeatina) en cultivos *in vitro* de clavel (*Dianthus caryophyllus*).

Aunque también pueden usarse como método único, como en el caso de Marziani et al (1990) que cuantificaron los niveles de auxinas, ácido abscísico y tres citocininas (trans zeatina ribosido, dihidrozeatina ribosido e isopentiladenosina) en flores hembra y macho de *Asparagus officinalis* L. mediante métodos inmunológicos de ELISA. Igualmente mediante por este mismo método, Flórez y Alexio (2009) determinaron Ácido Abscísico en *Solidaster luteus*, para demostrar la relación de esta hormona con la inducción floral.

5.7.3. Técnicas colorimétricas

El fundamento de las técnicas colorimétricas se basa en la comparación de diluciones coloreadas por lo que la precisión con que pueden compararse depende de la concentración absoluta de las mismas. Es por ello que deben cuantificarse mediante diferentes formas de comparación, tales como: colorímetros, patrones y espectrofotómetros (Pérez y Pino, 1983).

La técnica colorimétrica más utilizada en la actualidad por su fiabilidad y sus diferentes formas de aplicación en detectores y sensores es la Espectrofotometría UV-VIS descrita a continuación.

5.7.3.1. Espectrofotometría UV-VIS

La base de la espectroscopia Visible y Ultravioleta consiste en medir la intensidad del color (o de la radiación absorbida en UV) a una longitud de onda específica comparándola con otras soluciones de concentración conocida (soluciones estándar) que contengan la misma especie absorbente (Skoog *et al*, 1998).

Por lo consiguiente, los espectrofotómetros UV-Vis permiten obtener el espectro de compuestos a modo de curva que representa la transmitancia o la absorbancia en función de las longitudes de onda, expresadas en nanómetros (Rouessac y Rouessac, 2000). Se pueden identificar y cuantificar biomoléculas en solución y en muestras biológicas, induciendo a la formación de un complejo colorido que absorba en el visible, y que sea específico para el elemento o compuesto que se desea cuantificar colorimétricamente (Skoog *et al*, 1998).

5.7.3.2. Cuantificación de fitohormonas por técnicas colorimétricas

Aunque fiabilidad de la cuantificación por métodos colorimétricos depende mucho de la pureza del extracto, se ha demostrado que es una importante herramienta en cuantificación de fitohormonas, además que muchas veces los métodos cromatográficos cuentan con sistemas de detección espectrofotométricos. De acuerdo con Unyayar *et al* (1996) es posible identificar mediante espectrofotometría UV-VIS al Ácido Indolacético, Ácido Absísico, Ácido Giberélico y Zeatina obtenidos del micelio de *Phanerochaete chrysosporium*.

5.7.4. Técnicas de biología molecular

Hay interés por desarrollar estrategias de identificación del sexo en plantas a través de marcadores moleculares donde las técnicas basadas en PCR han sido de gran utilidad y se han explotado para detectar diferencias entre plantas masculinas y femeninas a nivel molecular (Giraldo *et al*, 2004).

Aunque hay gran diversidad de técnicas de biología molecular, y las existentes son reformadas para ser más exactas y prácticas, las técnicas moleculares de uso muy extendido son las siguientes:

5.7.4.1. PCR- Tiempo real

Esta es una variante de la PCR en la que se cuantifica de forma absoluta o relativa (comparando con un gen normalizador) el producto de la amplificación de ADN (López *et al*, 2010). Los sistemas de PCR en tiempo real se caracterizan por detectar la amplificación de la secuencia diana a medida que se produce, en lugar de medir la cantidad de producto de PCR generado tras un número determinado de ciclos. De esta forma es posible realizar la cuantificación del ADN de una forma más exacta y reproducible (Marin *et al*, 2007).

5.7.4.2. Western-Blot

En el caso de la Western-Blot, esta es una electroforesis en gel que separa las proteínas según su peso molecular y las detecta mediante anticuerpos específicos (Durand *et al*, 2010). Este método de múltiples etapas determina la presencia o ausencia, el tamaño, y la modificación o degradación de los estados de las proteínas diana, así permite la cuantificación de proteínas a partir de mezclas complejas de proteínas o homogeneizados (Taylor *et al*, 2013).

5.7.4.3. Northest-Blot

Aunque es parecida a la anterior, la técnica de Northest-Blot se basa en una electroforesis e hibridación para secuencias específicas de ARNm (Durand *et al*, 2010). El ADN es digerido con una enzima de restricción y los fragmentos son separados por tamaños mediante una electroforesis en gel. Las moléculas de ácido nucleico de la muestra, en este caso de ARN (total, mensajero, vírico, etc.), se separan por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (en presencia de formaldehído, que forma parte de la composición del gel). Las condiciones desnaturalizantes son utilizadas debido a que a pesar de que la molécula de ARN consiste en una sola cadena, es capaz de formar complejas estructuras secundarias que dificultan la migración (Fernández, 2008).

5.7.4.4. Cuantificación de fitohormonas por técnicas de biología molecular

A pesar de que las técnicas moleculares representan el método más fiable para la determinación de diferentes compuestos mediante señalización de genes específicos, su uso masivo se ve restringido por su alto costo y la alta tecnificación necesaria para su empleo. Dentro de los ejemplos en que podemos encontrar análisis exitosos realizados mediante las técnicas antes mencionadas están los siguientes:

Chaves *et al* (2009) usó la amplificación PCR de marcadores RAPD (amplificación aleatoria de polimorfismos del ADN) para identificación sexual de papaya (*Carica papaya L.*). Esta técnica de amplificación de PCR también fue utilizada por Cruz *et al* (2013) pero con marcadores AFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados) para determinar diferencias entre plantas hembra y macho de *Dasyvirion cedrosanum* (sotol).

Es importante mencionar que en la mayoría de los casos es importante hacer uso de dos o más de estas técnicas para corroborar la presencia o ausencia de características específicas que puedan servir como patrones de distinción entre plantas machos o hembras de alguna especie en específico.

De acuerdo a la revisión de literatura realizada, en el presente trabajo se eligió la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución debido a su alta precisión, confiabilidad de resultados y rapidez, en comparación de los métodos ya descritos.

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Localización Geográfica del Área de Muestreo

La localidad de General Cepeda fue elegida para el muestreo de *Dasyilirion cedrosanum* debido a su abundancia en las poblaciones de sotol. La comunidad se encuentra localizada en el sureste del estado de Coahuila a una distancia aproximada de 70 kilómetros de la capital del estado, correspondiendo a las coordenadas 25°18'41"N, 101°45'27"O a una altura de 1986 msnm.

General Cepeda es un valle rodeado de serranías y predominantemente desértico; clima según Köppen *BSh* (Semiárido cálido), con una temperatura media anual de 18 a 20°C y con una precipitación media anual entre los 300 a 400 milímetros. Este municipio tiene su régimen de lluvias en los meses de enero, mayo, junio, julio, noviembre y diciembre.

6.2. Muestreo Dirigido

El muestreo las plantas de *D. cedrosanum* se llevó a cabo bajo un esquema de muestreo sistemático en donde las plantas seleccionadas tenían como característica la aparición de la inflorescencia.

6.2.1. Identificación y Muestreo de plantas de *Dasyilirion cedrosanum*

El muestreo de las plantas de *D. cedrosanum* seleccionadas para el análisis de fitohormonas, consistió en obtener mediante un sacabocados aproximadamente 5g del tejido de la corona a una altura media de este órgano, en el caso de las hojas fueron cortadas 2 de las hojas más jóvenes cercanas a la inflorescencia, finalmente, el tejido del escapo fue tomado de la parte basal con ayuda de un sacabocados sin traspasar más de 1/3 del órgano, tratando de obtener la mayor cantidad de muestra posible. La muestra obtenida de cada órgano fue inmediatamente introducida a su frasco correspondiente, el cual fue previamente etiquetado con el número de planta, sexo, tipo de órgano y fecha de muestreo (**Fig. 12**), consecutivamente las muestras

fueron almacenadas en nitrógeno líquido hasta su posterior almacenamiento en un ultracongelador a -82°C , en el que permaneció hasta el momento del análisis.

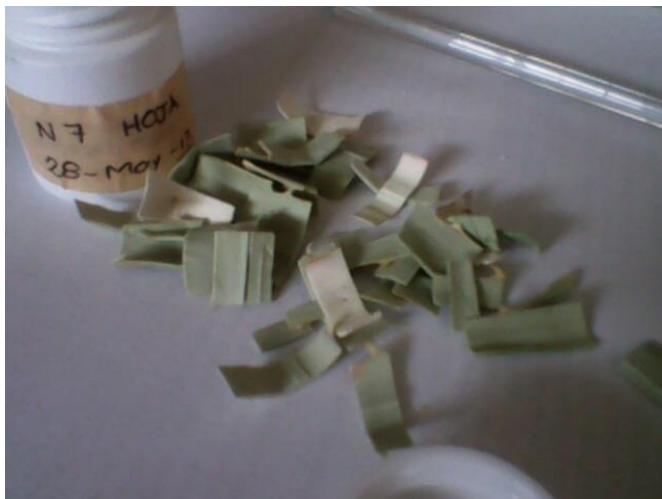


Fig.12. Muestra de tejido de hoja con su respectivo envase y etiqueta.

6.3. Procesamiento de la muestra

Para llevar a cabo la extracción y cuantificación de hormonas, se procedió a pesar cada muestra antes y después de someterla al proceso de liofilización, posteriormente se calculó el porcentaje de humedad por diferencia de peso.

6.3.1. Liofilización y almacenamiento

Para llevar a cabo la liofilización cada una de las muestras fueron sometidas a un congelamiento previo a -82°C , una vez congeladas las muestras fueron colocadas dentro de un liofilizador (Marca LABCONCO de 2.5L) y sometidas a una presión de 0.3mBares y a una temperatura de -40°C por 48 horas (**Fig. 13**) con el objetivo de eliminar el agua presente en los tejidos. Al término de la liofilización las muestras fueron maceradas en un mortero con nitrógeno líquido y almacenadas en sus frascos correspondientes, finalmente los frascos se colocaron en bolsa con cierre hermético que contenían silica gel como desecante, en la cual permanecieron hasta que se llevo a cabo la extracción de las hormonas.



Fig.13. Liofilización de las muestras.

6.3.2. Extracción de hormonas

La metodología referente a la extracción de las fitohormonas a partir del tejido vegetal consistió en el mismo procedimiento para los tres órganos analizados. Primero se pesaron 50mg de muestra liofilizada y se pasaron a un microtubo para centrifuga de 2mL, posteriormente se añadió 1000 μ L (1mL) de una solución de metanol al 20% disuelto en ácido acético 0.1M, y fue sometido a vortex por 10 segundos; se procedió a sonicar por 10 minutos, y consecuentemente se centrifugo a 12000rpm a 4°C durante 10 minutos. Por último, el tubo se mezcló con ayuda del vortex y se procedió a incubar a -20°C por 24h. Trascurrido las 24h se procedió nuevamente a someter a vortex por 10 segundos, se sónico por 10 minutos y finalmente se volvió a centrifugar a 12000rpm a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se extrajo con una jeringa y se filtró mediante un filtro pirinola de 0.45micras de diámetro de poro hacia un nuevo microtubo para centrifuga de 2mL. El extracto obtenido se vertió en los viales y fue usado para la cuantificación de Giberelina A4 y trans Zeatina Ribósido mediante los correspondientes métodos de

CLAR para cada fitohormona. En el diagrama siguiente se aprecia de forma sintetizada el proceso de extracción (**Fig. 14**):

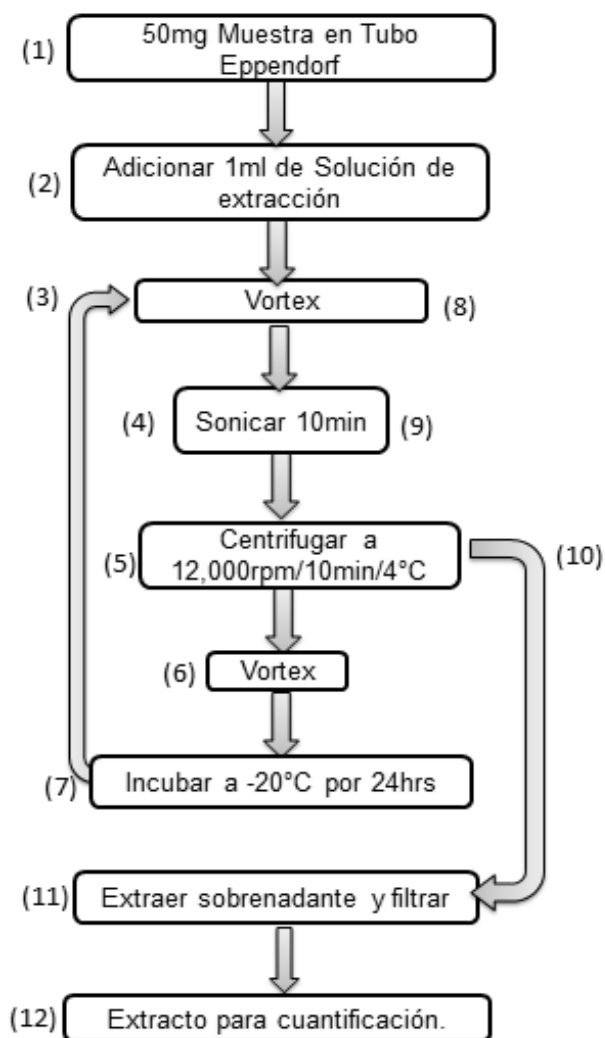


Fig. 14. Metodología de extracción de hormonas para su cuantificación en CLAR.

6.4. Cuantificación de Giberelina A4 por CLAR

La cuantificación de Giberelina se realizó en cromatógrafo de líquidos (Marca VARIAN, Modelo LC-920) utilizando una Columna Polaris 5 C18 (250mm de largo x 4.6mm de diámetro interno y 5µm de tamaño de poro). La elución se realizó con una mezcla isocrática de Agua acidificada (Ácido acético al 0.1M) como **Fase 1 (Anexo 2.1)** y Acetonitrilo 100% como **Fase 2 (Anexo 2.2)** en una proporción de 50:50 (Fase

A:Fase B), la velocidad de flujo de la mezcla isocrática fue de flujo de 0.8 ml/min y el volumen de inyección de la muestra fue de 50µL. La identificación y cuantificación de GA4 se realizó a una longitud de onda de 205 nm. El tiempo de retención para Giberelina A4 fue de 7.8±0.2min.

Para la identificación y cuantificación de GA4 en los extractos de las plantas de *D. Cedrosanum* se realizó una curva patrón con un estándar de Giberelina A4 (Marca SIGMA, 90% de pureza) disuelto en una solución de metanol al 20% preparada con ácido fórmico al 0.1%. La curva patrón se realizó con diluciones de 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10.0 ppm de GA4, de la cual se obtuvo como la ecuación de la recta **y=0.132x-0.020** con una **R²=0.997** (Anexo 1.1).

6.5. Cuantificación de trans Zeatina Ribosido por CLAR.

La identificación y cuantificación de la trans Zeatina Ribósido se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos (Marca Varian, Modelo LC-920) con el uso de una Columna AQUASIL C18 (250mm de largo x 4.6mm de diámetro interno y 5µm de tamaño de poro). La elución se realizó con una mezcla isocrática de Agua acidificada (Ácido acético al 0.1M) como **Fase 1** y Acetonitrilo 100% como **Fase 2** en una proporción 80:20 (Fase A:Fase B), la velocidad de flujo de la mezcla isocrática fue de flujo de 0.3 ml/min y el volumen de inyección de la muestra fue de 50µL. La identificación y cuantificación de tZR se realizó a una longitud de onda de 268 nm. El tiempo de retención para trans Zeatina Ribósido fue de 15.4±0.25min.

Para la identificación y cuantificación de tZR en los extractos de las plantas de *D. Cedrosanum* se realizó una curva patrón con un estándar de trans Zeatina Ribósido (Marca SIGMA, 95% de pureza) disuelto en una solución de metanol al 20% preparada con ácido fórmico al 0.1%. La curva patrón se realizó con diluciones de 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10.0 ppm de tZR, de la cual se obtuvo como la ecuación de la recta **y=7.427x-0.063** y una **R²=0.999** (Anexo 1.2.).

6.6. Análisis Estadístico

El análisis de los datos de Giberelina A4 y trans Zeatina Ribósido se realizó mediante un ANOVA con mediciones repetidas, con el apoyo del Software IBM SPSS STATISTICS Versión 22. Se utilizó una prueba DMS para la comparación de medias de órganos*sexo, así como, para evaluar el efecto del tiempo sobre la concentración de las fitohormonas con un nivel de significancia estadística de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración de GA4 y tZR en plantas hembra y macho de *Dasyllirion cedrosanum*.

Los resultados del análisis de varianza, así como, los de la prueba de DMS ($\alpha=0.05$) usada para evaluar las diferencias de las medias de GA4 y tZR obtenidas del análisis de los diferentes órganos de plantas hembra y macho de *D. cedrosanum* evaluados durante un período de tiempo, mostraron que no existe una diferencia significativa al comparar los niveles de GA4 entre cada uno de los órganos de una planta del mismo sexo, así como, tampoco se presenta una diferencia significativa al comparar la concentración de esta hormona en un mismo órgano de plantas de sexo diferente durante las cinco fechas de muestreo (18-may; 25-may; 01-jun; 9-jun y 15-jun de 2013). Los resultados obtenidos al evaluar los niveles de tZR son los mismos que se describieron para GA4.

En los anexos **3.1** y **3.2** se muestran los valores promedio para GA4 y tZR en hoja, piña y escapo durante los diferentes muestreos realizados en una plantas hembra y macho de sotol.

En las gráficas mostradas en la **Figura 15** se visualiza de forma desglosada las similitudes en la concentración de GA4 y tZR presentes en los diferentes órganos de plantas hembra y macho de sotol. Los solapamientos del error estándar concluyen que no existe una diferencia estadística entre niveles de fitohormonas.

En la **Figura 15** se puede observar que la mayor concentración de GA4 se encuentra en el tejido de la hoja de las plantas macho muestreadas durante la tercera semana de la emergencia de la inflorescencia, donde el valor promedio fue de 0.2660 mgGA4/mg de peso seco de hoja, mientras la mayor concentración de tZR se mostró piñas de plantas hembras muestreadas durante la quinta semana y cuyo valor promedio fue de 0.1285 mg tZR/mg de peso seco de hoja.

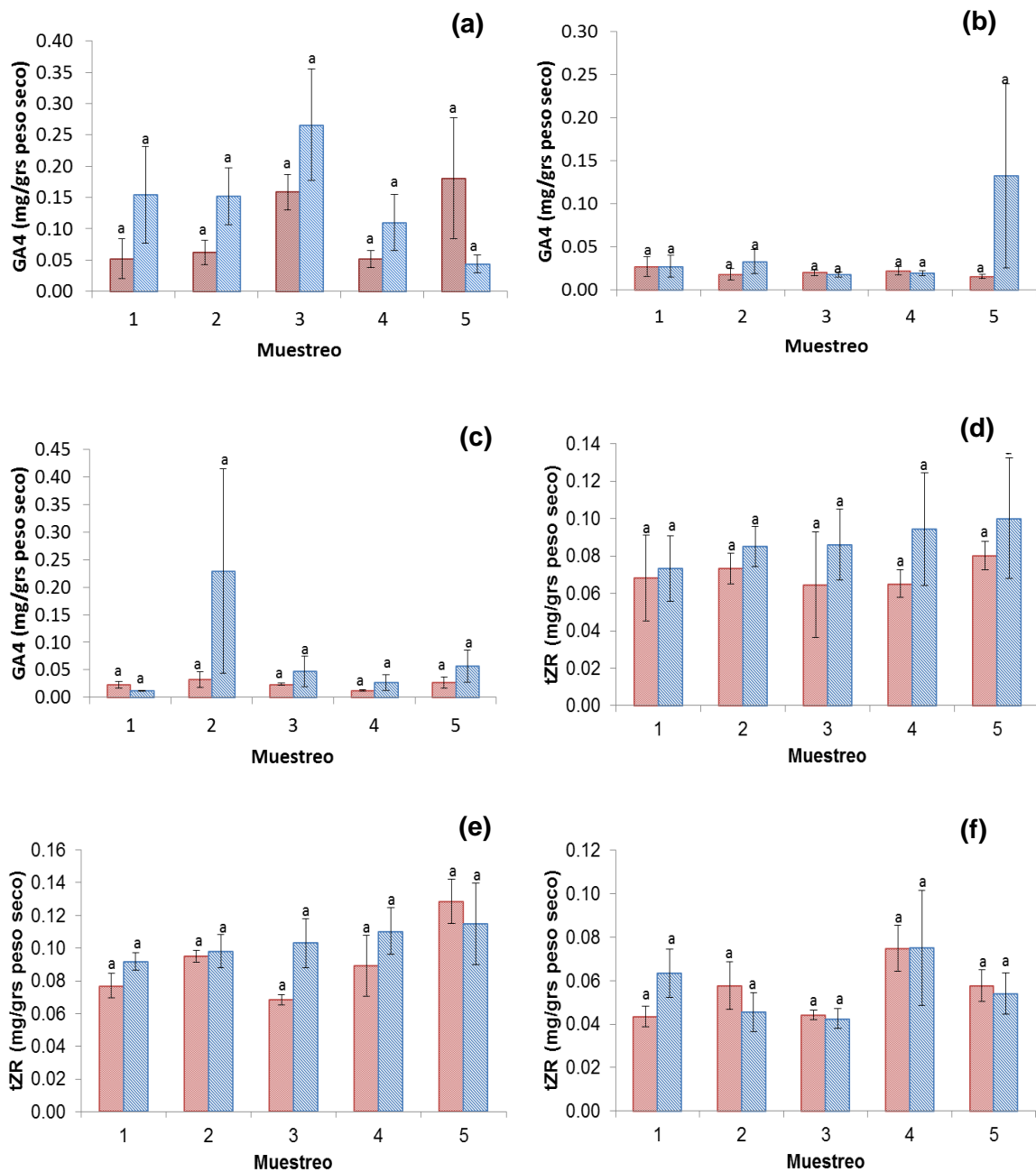


Figura 15. Concentración de GA4 (a, b, c: hoja, piña y escapo) y tZR (d, e, f: hoja, piña y escapo) en plantas hembras (■) y macho (▨) de *Dasylium cedrosanum*.

Estas similitudes en la cuantificación de fitohormonas entre plantas hembras y machos durante todo el periodo de desarrollo de la inflorescencia puede deberse, de acuerdo con Reyes *et al.* (2014) a que tanto en plantas con flores masculinas, así como, en plantas con flores femeninas, se encuentran presentan estructuras sexuales de su contraparte; es decir que en ambos casos se mantiene la formación de reminiscencias de pistilo en machos y de anteras en hembras.

La característica que presenta *D. cedrosanum* referente a que en una misma flor podemos encontrar latentes ambos aparatos reproductivos (pistilo y estambres) hasta que en cierta etapa del crecimiento de la planta uno de los dos órganos deja de desarrollarse para dar origen a la diferenciación entre hembra o macho; ha sido estudiada en plantas como el *Asparagus officinalis*, donde Bracale *et al.* (1990) encontraron que se lleva a cabo un proceso similar al de la planta del sotol.

Monitoreo de la concentración de GA4 y tZR durante el período de floración de plantas hembra y macho de *D. cedrosanum*.

Los análisis estadísticos ($\alpha=0.05$) realizados para evaluar el comportamiento de las fitohormonas durante el periodo del floración de la planta de sotol mostraron que existe una diferencia estadística significativa en la media obtenida como resultado del comportamiento de GA4 y tZR en cada órgano evaluado durante las cinco fechas de muestreo (18-may; 25-may; 01-jun; 9-jun y 15-jun de 2013), en ambos sexos. Las concentraciones más altas de GA4 se mostraron en hoja durante la tercera semana de muestreo (**Fig. 16**).

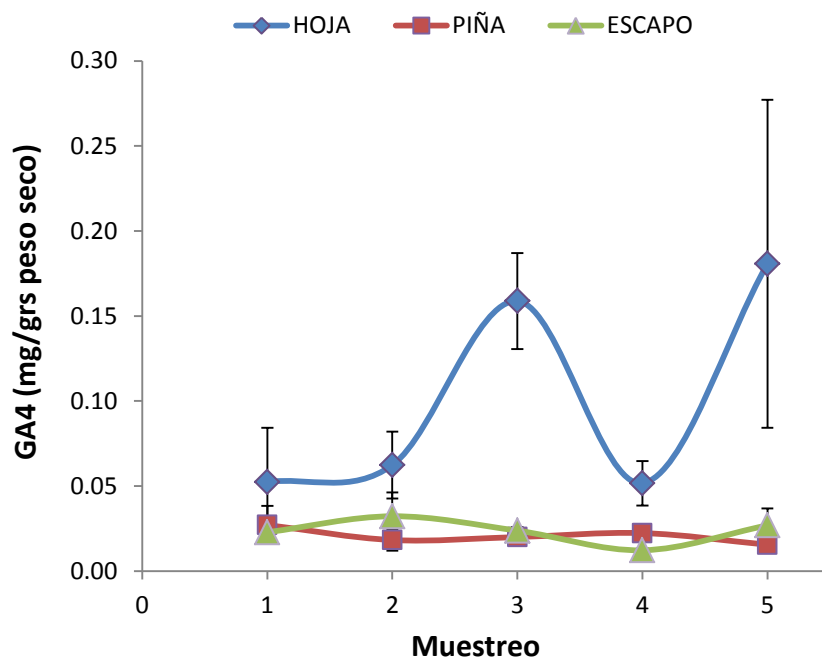


Fig. 16. Comportamiento del GA4 en distintos órganos de plantas hembra de *D. cedrosanum* durante muestreos semanales.

La comparación de las concentraciones de GA4 entre los órganos obtenidos de plantas macho de *D. cedrosanum* presentan variaciones durante los diferentes muestreos (**Fig.17**). El comportamiento de esta fitohormona en la hoja en plantas macho es similar al que muestra el mismo órgano de las plantas hembras durante el tercer muestreo. Por otra parte, los valores cuantificados en Escapo y Piña mantienen un comportamiento similar durante todos los muestreos (esto considerando que el error estándar para el escapo en la 2da semana es muy grande), se destaca que en ambos órganos hay solo un pequeño incremento de la fitohormona durante el quinto muestreo.

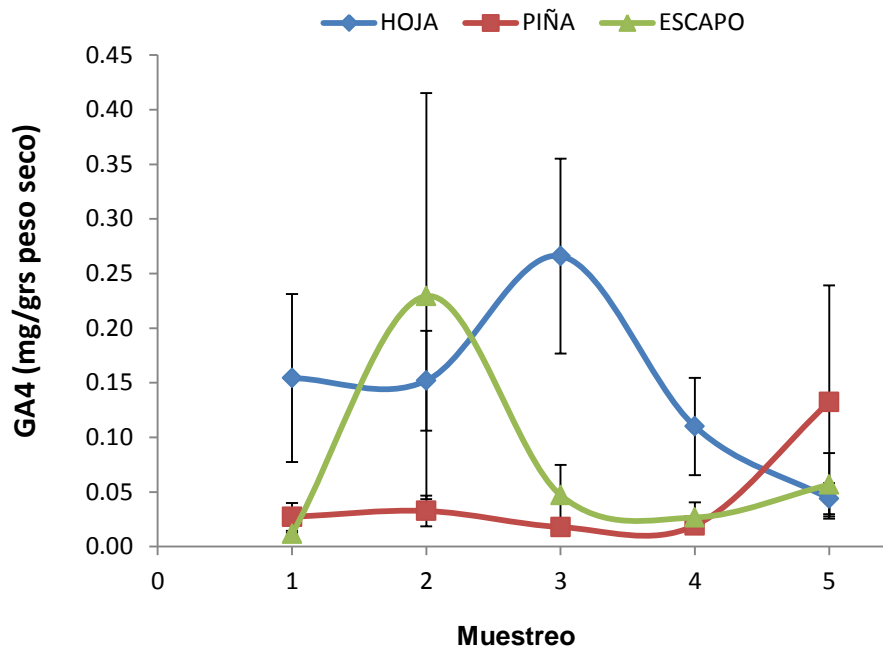


Fig. 17. Comportamiento del GA4 en distintos órganos de plantas macho de *D. cedrosanum* durante muestreos semanales.

En la **Fig. 18** podemos observar que en el tejido de la piña existe una tendencia al incremento de tZR a partir del tercer muestreo; dicho comportamiento difiere en el escapo, el cual, solo muestra un aumento de esta fitohormona durante la cuarta semana de floración. En la hoja se presenta una conducta opuesta a los dos órganos anteriores, debido a que no hay variaciones en la concentración de tZR durante todo el período de evaluación.

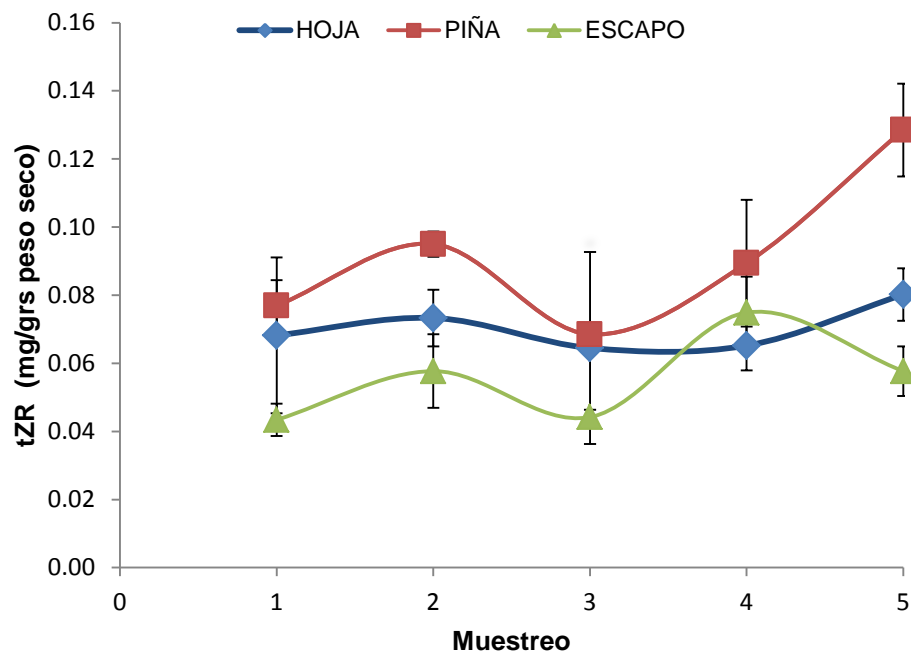


Fig. 18. Comportamiento del tZR en distintos órganos de plantas hembra de *D. cedrosanum* durante muestreos semanales.

En los resultados de tZR observados en las plantas hembra, la **Fig. 19** no muestra incrementos importantes en la tZR en plantas macho de *D. cedrosanum*, destacándose un pequeño y paulatino aumento de los niveles de esta fitohormona en hoja y piña durante el transcurso de la floración. En el caso del escapo, los valores de tZR tienden a disminuir desde la emergencia de la inflorescencia (primer muestreo) hasta la aparición del polen en las flores (tercer muestreo), posterior a esto ocurre un incremento en el siguiente muestreo que termina con un decremento al final de la floración.

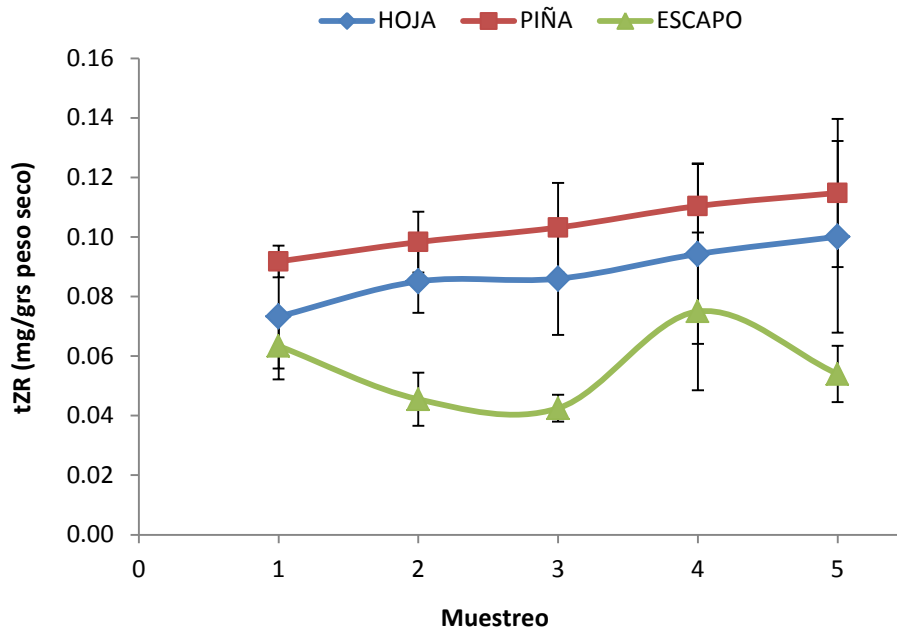


Fig. 19. Comportamiento del tZR en distintos órganos de plantas macho de *D. cedrosanum* durante muestreos semanales

Es importante destacar que en la mayoría de los casos tanto en plantas macho, como en plantas hembra, las concentraciones de GA4 cuantificadas en el tejido de la hoja tienden a tener variaciones importantes en la tercera semana de muestreo, por lo cual es importante marcar esta fecha como un periodo crítico en el que probablemente se lleve a cabo el proceso de diferenciación sexual de la planta. El comportamiento de GA4 semejante en ambos sexos pudiera explicarse con lo reportado por Dellaporta y Calderón (1993), quién indica que los primordios florales son sexualmente bipotentes, es decir, que en una misma flor se encuentran órganos tanto de flores estaminadas como de flores pistiladas, siendo los genes de determinación del sexo los que definen el órgano que será funcional, y por lo tanto, de esta manera se verán afectados los programas de expresión sexual, principalmente los sistemas de regulación hormonal. Khryanin (2007), establece que dicha regulación sexual depende en su totalidad de la producción de fitohormonas presentes en la planta entera, y no, de la producción aislada en un solo órgano; debido a que la síntesis y el equilibrio entre fitohormonas se rigen por el metabolismo completo de la planta, lo que contribuye a que los cambios específicos en el

equilibrio hormonal interno den como resultado la realización de un programa sexual u otro.

Lo anterior es también explicado por Milewicz y Sawicki (2012) quiénes manifiestan que pesar de una gran cantidad de investigaciones en diferentes especies, los mecanismos moleculares de determinación del sexo en plantas siguen siendo relativamente desconocidos, sin embargo, muchas veces se ha propuesto una hipótesis generalizada con la finalidad de explicar los orígenes genéticos de los procesos metabólicos y la vía de determinación sexual.

De acuerdo con la literatura, se cree que el equilibrio hormonal interno esta principalmente influenciado por actividad genética, lo que da como resultado la diferenciación sexual en determinado momento, donde en el caso de *D. cedrosanum* es probable que esta etapa se encuentre alrededor de la tercera semana de la floración.

CONCLUSIONES

No existe una diferencia significativa en las concentraciones de GA4 ni de tZR evaluadas en un mismo órgano de plantas de ambos sexos.

La mayor concentración de GA4 se presentó durante la tercera semana de floración en hojas de plantas macho. Estos resultados coinciden con la aparición de características morfológicas específicas de plantas con flores estaminadas y flores pistiladas; por lo que experimentalmente no sería posible determinar el sexo antes de este periodo mediante la cuantificación de estas dos fitohormonas.

Mientras que en el caso de tZR el valor más alto se observó en la quinta semana del periodo de floración en los tejidos de la piña de plantas hembra; etapa donde la inflorescencia es visualmente distinguible entre géneros.

RECOMENDACIONES

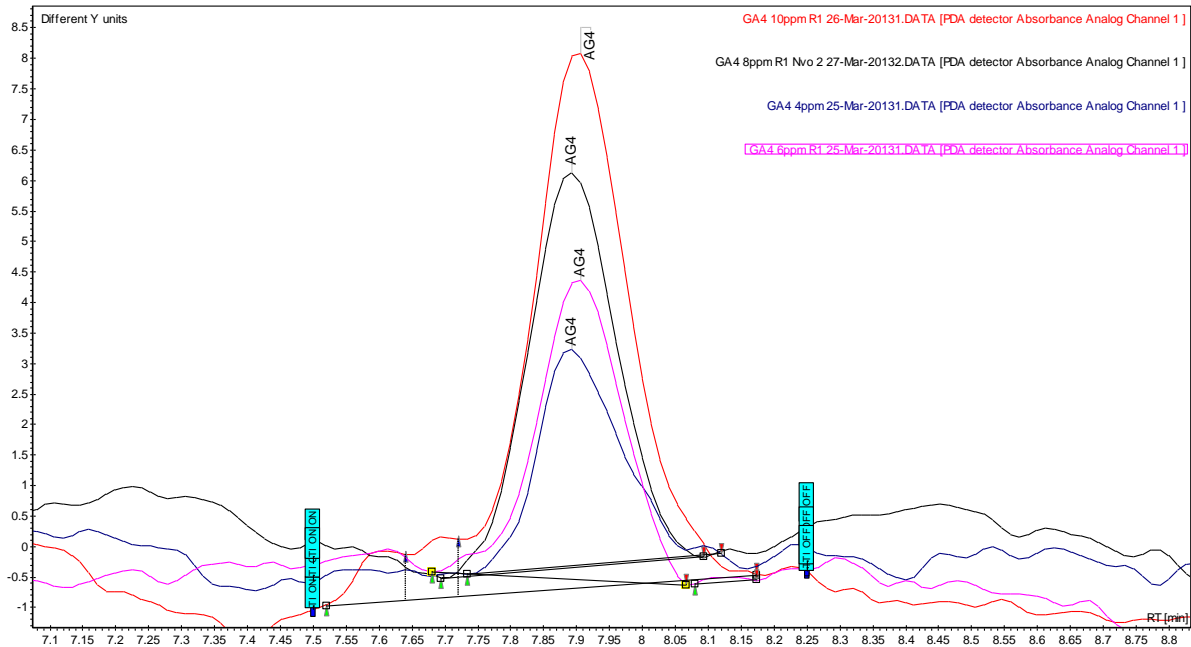
Conforme a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se ha concluido que es necesario el análisis no solo de las fitohormonas GA4 y tZr, sino también de sus variantes estructurales, isómeros y derivados glucosilados, al igual deben incluirse otras fitohormonas vinculadas con la sexualización en plantas, tales como; Ácido Indolacético, Ácido Abscísico y Etileno.

Un análisis a considerar consiste en evaluar el efecto que pudiera tener la aplicación exógena de las fitohormonas (GA4 y tZr) previa a la tercera semana del proceso de floración, esto con la finalidad de establecer si dicha aplicación puede inducir o cambiar el proceso de feminización o masculinización en flores de plantas de *D.cedrosanum* previamente identificadas como hembras o machos.

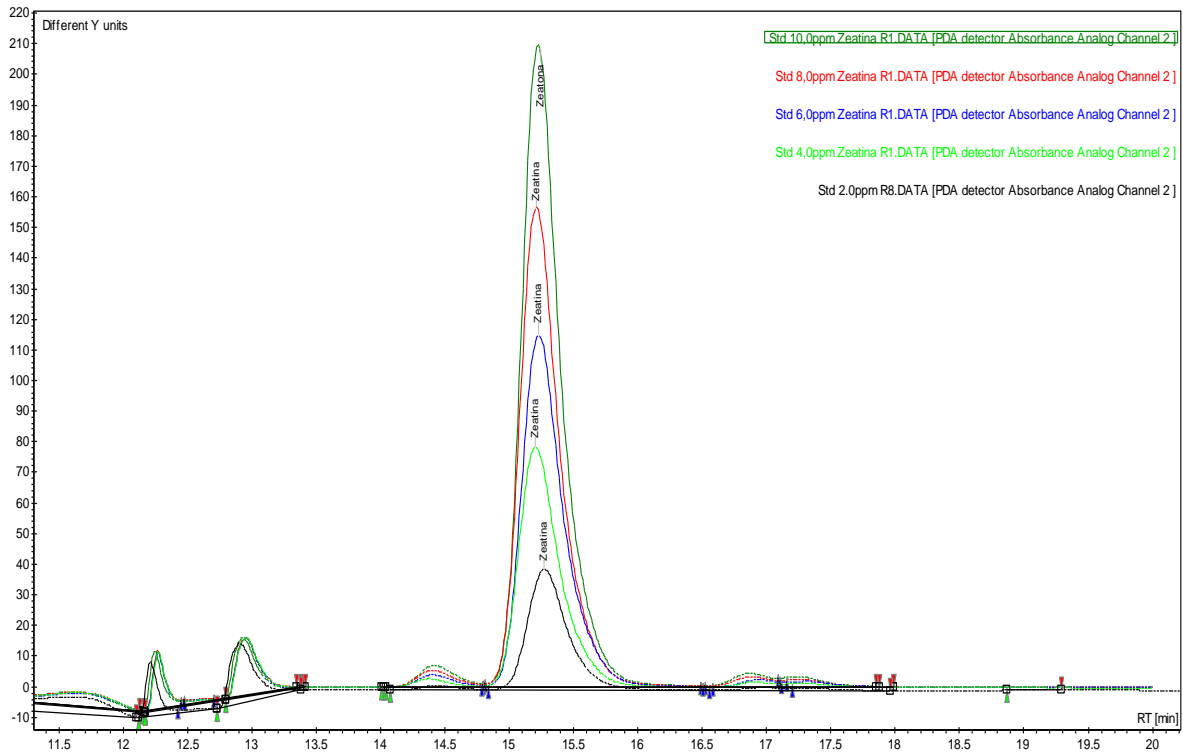
Finalmente, después de una amplia búsqueda de información sobre el género *Dasyllirion* se sabe que no existe datos genéticos de esta planta en los bancos de genes existentes, por lo cual sería muy importante iniciar con un proceso de secuenciación de los principales genes de importancia comercial y bioquímica presentes en este género; ya que una vez obtenida dicha información, se podría hacer uso de los técnicas moleculares para la investigación de los procesos genéticos involucrados en la diferenciación sexual.

ANEXOS

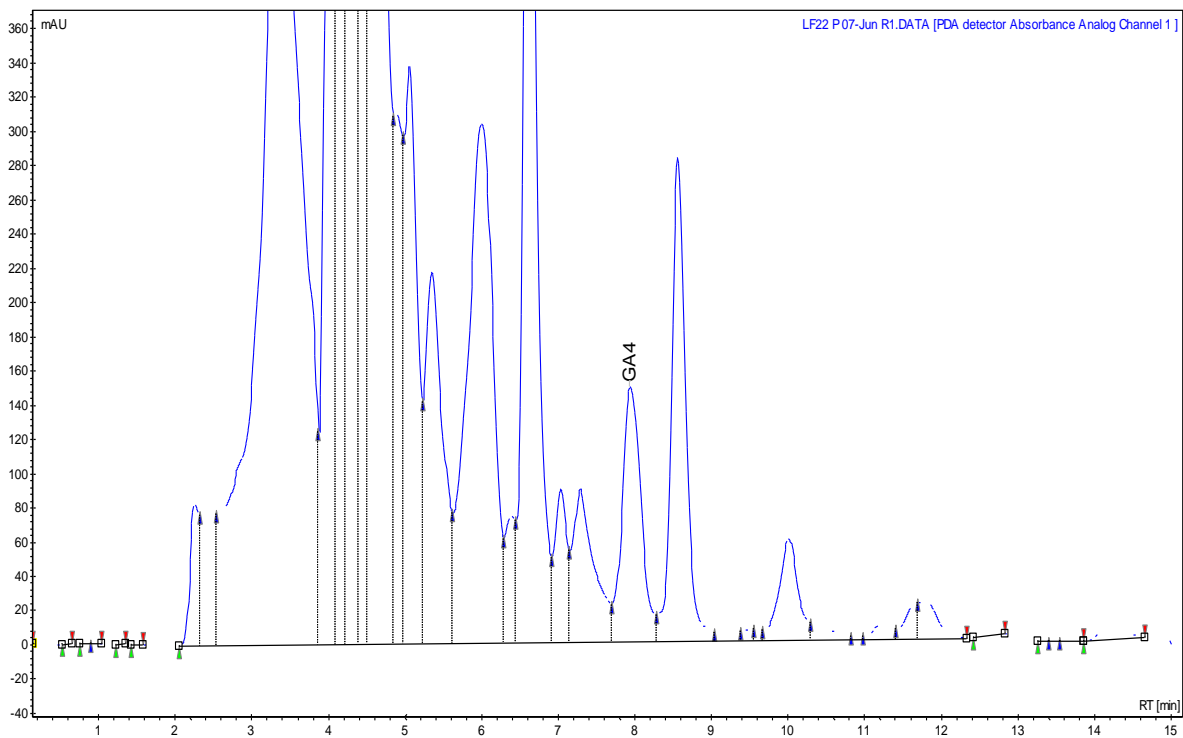
Anexo 1. Cromatogramas



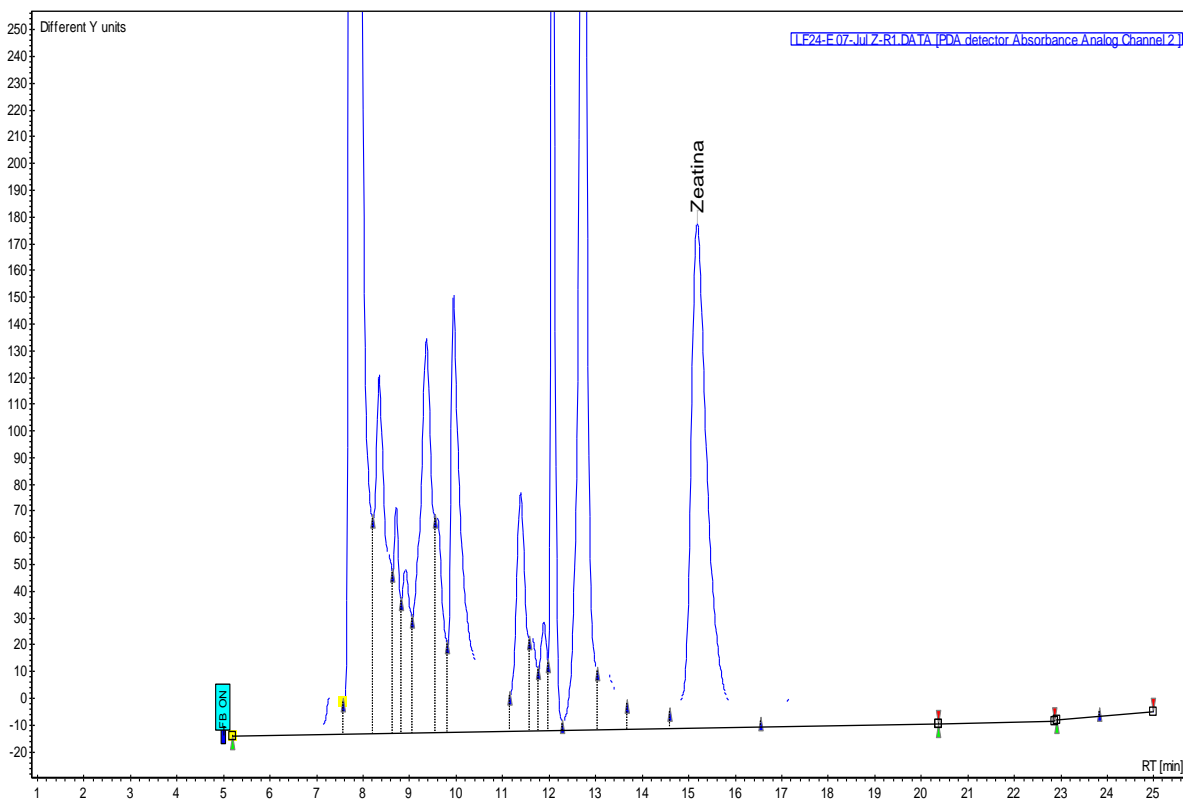
Anexo 1.1. Cromatogramas de curva patrón de Giberelina A4.



Anexo 1.2. Cromatograma de curva patrón de trans Zeatina Ribosido.



Anexo 1.3. Cromatograma de Giberelina A4 en extracto de *D. cedrosanum*



Anexo 1.4. Cromatograma de trans Zeatina Ribosido en extracto de *D. cedrosanum*

Anexo 2. Preparación de las fases móviles

Anexo 2.1. Fase 1: Agua acidificada (Ácido acético al 0.1M)

<p>Materiales y Equipos:</p> <ul style="list-style-type: none">- Matraz de aforación de 1L- Pipeta graduada de 10mL- Sonificador (desgasificador)- Bomba de vacío con sistema de filtración para fase móvil- Matraz Kitasato de 1L	<p>Reactivos:</p> <ul style="list-style-type: none">- Ácido acético glacial (100%)- Agua grado HPLC
<p>Procedimiento:</p> <ol style="list-style-type: none">1) Con ayuda de la pipeta se vierten 5.7 mL de ácido acético glacial (100%) en el matraz de aforación.2) Se afora el matraz a 1L con el agua grado HPLC, y se agita.3) El matraz Kitasato se monta al sistema de filtración con bomba de vacío.4) La disolución de ácido acético 0.1M preparada anteriormente se vierte en el embudo del sistema de filtración para que la disolución ya filtrada sea contenida en el matraz Kitasato.5) La disolución filtrada se vierte en el recipiente para fase móvil del cromatógrafo de líquidos y se desgasifica durante 10min.6) El frasco de fase móvil se acopla al cromatógrafo.	

Anexo 2.2. Fase 2: Acetonitrilo 100%

No se hace disolución con ningún otro reactivo. Se lleva a cabo el mismo proceso de filtración y desgasificación de la **Fase 1**.

Anexo 3. Valores promedio para GA4 y tZR.

Anexo 3.1. Valores de ambas fitohormonas y en diferentes órganos de hembras de *D. cedrosanum* durante diferentes muestreos.

<i>Muestreo</i>	HEMBRA							
	<i>HOJA</i>		<i>PIÑA</i>		<i>ESCAPO</i>			
	<i>GA4</i>	<i>tZR</i>	<i>GA4</i>	<i>tZR</i>	<i>GA4</i>	<i>tZR</i>		
1	0.0523 a	0.0682 a	0.0270 a	0.0769 b	0.0228 a	0.0434 b		
2	0.0623 a	0.0733 a	0.0182 a	0.0950 ab	0.0322 a	0.0577 ab		
3	0.1588 a	0.0645 a	0.0200 a	0.0685 b	0.0237 a	0.0442 b		
4	0.0516 a	0.0652 a	0.0223 a	0.0894 b	0.0122 a	0.0749 a		
5	0.1807 a	0.0802 a	0.0155 a	0.1285 a	0.0268 a	0.0577 ab		

Valores en unidades de mg de fitohormona por gramo de peso seco.

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Anexo 3.2. Valores de ambas fitohormonas y en diferentes órganos de macho de *D. cedrosanum* durante diferentes muestreos.

<i>Muestreo</i>	MACHO					
	<i>HOJA</i>		<i>PIÑA</i>		<i>ESCAPO</i>	
	<i>GA4</i>	<i>tZR</i>	<i>GA4</i>	<i>tZR</i>	<i>GA4</i>	<i>tZR</i>
1	0.1543 ab	0.0733 a	0.0272 a	0.0918 a	0.0116 a	0.0634 a
2	0.1519 ab	0.0851 a	0.0327 a	0.0983 a	0.2293 a	0.0455 a
3	0.2660 a	0.0860 a	0.0179 a	0.1032 a	0.0471 a	0.0425 a
4	0.1100 ab	0.0943 a	0.0193 a	0.1104 a	0.0267 a	0.0750 a
5	0.0440 b	0.1001 a	0.1324 a	0.1148 a	0.0567 a	0.0540 a

Valores en unidades de mg de fitohormona por gramo de peso seco.

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Anexo 4. Glosario

Analito: es el componente (elemento, compuesto o ion) de interés analítico de una muestra. Son especies químicas cuya presencia o concentración se desea conocer. Es una especie química que puede ser identificado y cuantificado, es decir, determinar su cantidad y concentración en un proceso de medición química.

Antesis: es el periodo de florecencia o floración de las plantas con flores; estrictamente, es el tiempo de expansión de una flor hasta que está completamente desarrollada y en estado funcional.

Basal: situado en la base de una formación orgánica o de una construcción.

Copurifican: Que viene unido a pesar del proceso de limpieza de otras sustancias extrañas.

Cromatografía: es un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas, la cual está basada en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes.

Dioica: es aquella en la que hay individuos machos e individuos hembras

Elución isocrática: composición constante de la fase móvil.

Elución: extracción de una sustancia absorbida desde un lecho poroso o columna de cromatografía mediante un chorro de líquido o gas, o mediante la aplicación de calor.

Genes Homeóticos: son los que participan en el desarrollo de los organismos y que determinan la identidad de los segmentos o partes individuales del embrión en sus etapas iniciales.

Heteromorfo: que presenta o afecta de dos o más formas distintas.

HPLC: la Cromatografía Líquida de Alta Resolución o *High performance liquid chromatography* (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Liofilización: proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. Deshidratación en frío.

Policárpica: planta que florece varias veces y que no muere después de fructificar, como ocurre con las monocárpicas.

Proteínas DELLA: son las que tienen la función de inhibir la elongación celular y el crecimiento del tallo.

Sobrenadante: parte superior clara de cualquier mezcla después de ser centrifugada.

Termolábil: sustancia que se descompone o se desnaturaliza por el calor, perdiendo, generalmente, su actividad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsworth, C. 2000. Boys and Girls Come Out to Play: The Molecular Biology of Dioecious Plants. *Annals of Botany*, 86:211-221
- Arce-González, L; Valdés-Reyna, J; Valdés-Oyervides, A; Gallegos-Del Trejo, A; Calderon-Gomez, E.R. 2003. Rompimiento de latencia en semillas de Sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.) mediante escarificación física y ácido sulfúrico. En: Resultados de Proyectos de Investigación 2003. Dirección de Investigación, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México pp 496-500
- Audesirk, T; Audesirk, G; Bryes, B.E. 2003. *Biología: La vida en la Tierra*. Ed Pearson Educación a Mexico. Estado de Mexico. 889pp
- Azcón B., J; Talón, M. 2008. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. 2da Edición. Ed McGraw Hill. Madrid, España. 651pp
- Benavides-Mendoza, A; Hernández-Valencia, R.E.M.; Ramirez-Rodriguez, H; Sandoval-Rangel, A. 2010. *Tratado de Botánica Económica Moderna*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México. 332pp
- Bogler D. J. 1994. *Taxonomy and Phylogeny of Dasyllirion (Nolinaceae)*. Ph. D. Dissertation. University of Texas at Austin. USA. 582 pp.
- Bracale, M ; Galli, M.G ; Falarigna, A; Soave, C. 1990. Sexual differentiation in *Asparagus officinalis* L. II. Total and newly synthesized proteins in male and female flowers. *Sexual Plant Reproduction*. 3:23-30
- Burgos, A.M ; Cenóz, P.J ; Prause, J. 2009. Efecto de la aplicación de auxinas sobre el proceso de enraizamiento de estacas de dos cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista UDO Agrícola*. 9(3):539-546
- Cano P, A ; Berlanga R., C. A; Castillo Q., D ; Martínez B , O. y Zarate L , A. 2005. Análisis dimensional y tablas de producción de sotol (*Dasyllirion cedrosanum*

- Trel.) para el estado de Coahuila. INIFAP-CIRNE. Campo experimental Saltillo, Coahuila, México. Folleto técnico Núm. 18, 24pp
- Castillo, G.; Altuna, B.; Michelena G., Sánchez-Bravo, J.; Acosta M. 2005. Cuantificación de contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología*. 27:137-142
- Chaves-Bedoya, G.; Pulido, M.; Sánchez-Betancourt, E.; Núñez, V. 2009. Marcadores RAPD para la identificación del sexo en papayo (*Carica papaya L.*) en Colombia. *Agronomía Colombiana*. 27(3):145-149
- Chávez G., E. y Vázquez S., S. 2012. Morfología floral y embriología de *Begonia gracillis* (*Begoniaceae*): Su relevancia en la monoecia. *Botanical Sciences* 90(4):367-380
- Contreras-Delgado C.; Ortega-Ridaura I. 2005. Bebidas y regiones: historia e impacto de la cultura etílica en Mexico. Plaza y Valdez. Mexico. 200 pp.
- Coria-Rivas, C. 1999. En riesgo de desaparecer el sotol. *El Universal: Estados*. Septiembre 2012. Disponible en: <http://www.eluniversal.com.mx/estados/5104.html>
- Cruz-Requena, M.; De la Garza-Toledo, H.; Aguilar-González, C.N.; Aguilera-Garbó, A.; Reyes-Valdes, H.; Rutiaga, M.; Rodriguez-Herrera, R. 2013. Chemical and Molecular properties of Sotol Plants (*Dasyliirion cedrusanum*) of different sex and its fermentation products. *International Journal of Basic and Applied Chemical Sciences*. 3(1):41-49
- Cuevas G., E. y Abarca G., C. A. 2006. Origen, mantenimiento y evolución del ginodioicismo. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 78:33-42
- Day, R.A.; Underwood, A.L. 1989. *Química Analítica Cuantitativa*. 5ta Edición. Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. Estado de México. México. 841pp
- Dellaporta, S.L. y Calderon-Urrea, A. 1993. Sex determination in flowering plants. *The Plant Cell*. 5: 1241-1251

- Díaz-Montenegro, D. 2014. Hormonas Vegetales y Biorreguladores Para la Agricultura. Hojas técnicas de FERTILAB. México. 4pp
- Durand, R. y Durand, B. 1984. Sexual differentiation in higher plants. *Physiol. Plant.* 60: 267-274
- Encina D., J. A.; Meave, J.A. y Zarate L., A. 2013. Structure and woody species diversity of the *Dasyllirion cedrosanum* (Nolinaceae) rosette scrub of central and southern Coahuila State, Mexico. *Botanical Sciences* 91(3):335-347
- Fernández-Ruíz, P.L. 2008. Hibridación de ácidos nucleicos: Fundamento teórico. Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer. Barcelona, España. 8pp
- Flórez R., V.J. 1997. Análisis hormonal en plantas: Tendencias Actuales. *Agronomía Colombiana* 14(2):144-148
- Flórez-Roncacio, V.J.; Alexio-Pereira, M.F. 2009. El Ácido Abscísico acelera el desarrollo floral de Solidago en días cortos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín.* 62(1):4835-4841
- Gardea, A. A.; Findley, L. T.; Orozco A., J.A.; Bañuelos, N.; Esqueda, M.; Huxman, T. H. 2012. Bacanora and Sotol: So far, So close. *Coordinación de Desarrollo Regional, Hermosillo, Mexico. Estudios Sociales* 2:153-168
- Genkov, T.; Ivanov, I.; Ivanova, I. 1996. Analysis of cytokinins by Immunoassay and High Performance Liquid Chromatography of *in vitro* cultivated *Dianthus caryophyllus*. *Bulgarian Journal of Plant Physiology.* 22(3-4): 95-104
- Giraldo, C.I.; Rengifo, L.; Aguilar, E.; Gaviria, D. y Alegría, A. H. 2004. Determinación del sexo en borjón (*Borjoia patinoi*, Cuatrecasas) mediante marcadores moleculares. *Revista Colombiana de Biotecnología* 6(2):9-14
- Godoy, J. A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas* 18(1):23-33

- Gomis, Y. V. 2008. Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución. Universidad de Alicante. Departamento de Ingeniería Química. Septiembre 2012. Disponible en: <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf>
- Gutiérrez, M.C. y Droguet M. 2002. La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas: Identificación de Compuestos causantes de mal olor. Boletín Intexter (U.P.C.) 122:35-41
- Heilburth, J.C. 2000. Lower Species Richness in Dioecious Clades. *The American Naturalist*. 156(3):221-224
- Heilburth, J.C.; Ilves, K.L.; Otto, S.P. 2001. The Consequences of Dioecy for seed dispersal: Modeling The Seeds-Shadows Handicap. *Evolution*. 55(5):880-888
- Hernández, P. J. M. 2005. Cromatografía líquida de alta eficacia. Educación continuada en el laboratorio clínico. 8:49-62
- Jiménez-Sierra, C. L. y Matías-Palafox, L. 2010. La sexualidad en las plantas. *Revista Digital Universitaria UNAM*. 11(8): 1067-6079
- Jordán, M. y Casaretto, J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas, giberelinas y citocininas. *Fisiología Vegetal*, Ediciones Universidad de La Serena, Chile. Vol. 15
- Khryanin V. N. 2007. Evolution of the Pathways of Sex Differentiation in Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 54 (6): 945-952.
- Legaz-González, M.E.; San Cristobal, M.S., Dáz-Peña, E.M.; Alarcón-Aguareles, B.; Vicente-Córdoba, C. 2011. Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). *Reduca (Biología)*; Serie Técnicas y Métodos. 4(3):1-32
- Liu, H.; Li, X.; Xiao, J.; Wang, S. 2012. A convenient method for simultaneous quantification of multiple phytohormones and metabolites: application in study of rice-bacterium interaction. *Plant Method*. 8:2

- López D., M.; Campo T., J.; Cano S. J.; Diez P., R.; Boscones M., A. 2010. Aplicación de las técnicas de biología molecular en oncología oral. *Avances en Odontoestomatología*. 26(4):189-196
- Marín-De la Torre, I. 2007. PCR en tiempo real para la detección cuantitativa de ADN bovino en piensos vegetales. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 1(2):237-245
- Marziani-Longo, G.P.; Rossi, G.; Scaglione, G.; Longo, C.P.; Soave, C. 1990. Sexual differentiation in *Asparagus officinalis* L. III. Hormonal content and peroxidase isoenzymes in female and male plants. *Sex Plant Reproduction*.3:236-243.
- Melgosa C., A.; J. Sierra S. T. 2004. Contribución al conocimiento y distribución de las especies de *Dasyllirion* spp. (Sotol) en Chihuahua México. *Revista Ciencia Forestal*. 29(95):25-40.
- Mielke, J. 2010. *Native Plants of Southwestern Landscapes*. University of Texas Press. Austin, Texas. 313pp
- Milewicz, M and Sawicki, J. 2012. Mechanisms of Sex Determination in Plants. *Časopis Slezského zemského muzea, série (A)* 61: 123-129
- Montes-Pérez, R.C. 1995. Las técnicas de unión para medir hormonas. *Revista Biomédica*. 6:33-46
- Norato-Rodriguez, J y Espejo, N. 1985. Efectos del AG3, Ethrel y ANA en la Expresión Sexual de *Luffa cylindrica* L. *Acta Biológica Colombiana*. 1(2): 91-97
- Olivella, C.; Vendrell, M.; Savé, R. 2001. Determinación de ácido abscísico, ácido indolacético, zeatina y ribosido de zeatina en hojas desarrolladas de *Gerbera jamesonii* cv Bolus y su variación con la edad. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetal*. 16(3): 333-342
- Papadopoulou, E. and Grumet, R. 2005. Brassinosteroid-induced Femaleness in Cucumber and Relationship to Ethylene Production. *HoertSciencie*. 40(6): 1763-1767

- Pérez-Bendito, D.; Pino-Pérez, F. 1983. Análisis de elementos traza por espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible. Publicaciones de la Universidad de Sevilla. Sevilla, España. 477pp
- Pharis, R. P., Kou, C. G. 1977. Physiology of gibberellins in conifers. Can. J. For. Res. 7(2):299-325.
- Purves, D.S. 2009. Vida: La ciencia de la Biología. 8va Edición. Buenos Aires Argentina. 1376pp
- Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. 1992. Biología de las Plantas. Volumen 2. 4ta Edición. Ed Reverte. Barcelona, España. 402pp
- Reyes-Valdés, M.H.; Benavides-Mendoza, A.; Ramírez-Rodríguez, H.; Villarreal-Quintanilla, J.A. 2012. Biología e Importancia del Sotol (*Dasyliirion spp*) Parte I: Sistemática, Genética y Reproducción. PLANTA. 7(14):11-13
- Robles-Esparza, A.; España-Montoya, J.L. 2008. Biomasa y forraje, distribución espacial y abundancia de la planta de sotol (*Dasyliirion spp*) En el ejido El Jazmín, Mazapil, Zacatecas, México. Revista de Investigación Científica. 4(2):1-9
- Rouessac, F.; Rouessac, A. 2000. Análisis Químico: Técnicas Instrumentales Modernas. Ed MacGraw Hill. Madrid, España. 441pp
- Scutt, C.P; Li, Y.; Robertson, S.E.; Willis, M.E.; Gilmartin, P.M. 1997. Sex Determination in Dioecious *Silene latifolia*. Plant Physiology. 114:969-979
- Skoog, D.A.; West, D. M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. 2001. Química Analítica. 7ma Edición. Ed MacGraw Hill. Distrito Federal, Mexico. 795pp
- Sola-Campoy, P.S.; Ruíz-Rejón, C.; De la Herrán, R.; Navajas-Pérez, R. Plant Sex-Chromosome Evolution. In: New Insights on Plant Sex Chromosomes. Nova Science Publishers Inc. 20pp

- Soldatova N.A.; Khryanin V.N. 2010. The effects of heavy metal salts on the phytohormonal status and sex expression in marijuana. *Russ. J. Plant Physiol.* 57:96–100.
- Stein, G. 2008. Introduction to Dasyllirion (Sotols). Dave´s Garden. Septiembre 2014. Disponible en: <http://davesgarden.com/guides/articles/view/1367/#b>
- Taylor, S. C.; Berkelman, T.; Yadav, G; Hammond, M. 2013. A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data. *Molecular Biotechnology* 55:217-226.
- Ulger, S.; Sonmez, S.; Karkacier, M.; Ertoy, N.; Akdesir, D.; Aksu, M. 2004. Determination of endogenous hormones, sugars and mineral nutrition levels during the induction, initiation and diferentation stage and their effects on flower formation in olive. *Plant Growth Regulation.* 42:89-95
- Unyayar,S.; Topcoughlu,S.F.; Unyayar, A. 1996. A modified method for extraction and identification of Indole-3-acetic acid (IAA), Gibberellic acid (GA3), Abscisic acid (ABA) and Zeatin produced by *Phanerochaete chysosporium*. *Bulgarian Journal of Plant Physiology.* 22(3-4):105-110
- Vaclav, D.; Adam, V.; Havel, L.; Kizek, R. 2009. Phytohormones as important biologically active molecules-their simple simultaneous detection. *Molecules.* 14:1825-1839
- Vega-Cruz, J.; Melgoza-Castillo, A.; Sierra-Tristan, J.S. 2006. Caracterizacion Del crecimiento de dos especies de sotol (*Dasyllirion leiophyllum* Engelm. Ex Trelease y *D. sereke* Bogler) fertilizadas con nitrógeno y fosforo. *Revista Ciencia Forestal en Mexico.* 31: 55-71
- Villa-Marín, H. 1994. Métodos Inmunoquimicos aplicados al análisis de Micotoxinas. *Revista de la facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Colombiana de Medellín.* 4(2):105-118

- Villavicencio G., E. E.; A. Cano P. y A. Juárez S. 2007. Guía para la micropropagación y producción *in vitro* de plantas de sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.). INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Saltillo. Folleto Técnico Núm. 37 Coahuila, México. 29 p.
- Weaver, R. J. 1996. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Ed Trillas. Distrito Federal, Mexico. 622pp
- Yu, H.; Ito, T.; Zhao, Y.; Jinrong, P.; Kumar, P.; Meyerowitz, E. M. 2004. Floral homeopatic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. Proc Natl Acad Sci USA. 101(20): 7827-7832
- Zarate L. A. 2003. Inventario de las poblaciones de sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.) en el estado de Coahuila. Secretaria de Fomento Agropecuario del estado de Coahuila. Saltillo, Coahuila. México. 29 pp