

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

PROGRAMA DOCENTE DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS



**Expresión génica de auxinas, giberelinas y citocininas en el cultivo de
tomate tratado con un producto de base natural**

Por:

ROSA MARÍA CORTÉS ARGANDA

TESIS

Presentada como requisito para obtener el título profesional de:

INGENIERA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila, México, Junio 2014.

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

Expresión génica de auxinas, giberelinas y citocininas en el cultivo de
tomate tratado con un producto de base natural

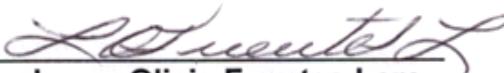
Presentado por:
ROSA MARÍA CORTÉS ARGANDA

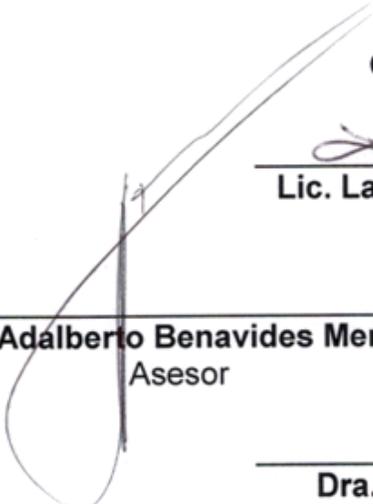
TESIS

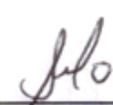
Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

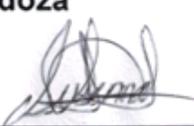
INGENIERA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

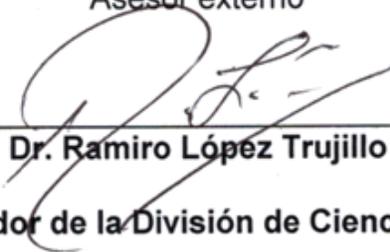
COMITÉ ASESOR


Lic. Laura Olivia Fuentes Lara
Asesor principal


Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Asesor


Dra. Susana González Morales
Asesor


Dra. Susana Solís Gaona
Asesor externo


Dr. Ramiro López Trujillo

Coordinador de la División de Ciencia Animal.



Saltillo, Coahuila, México, Junio 2014.

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

**Expresión génica de auxinas, giberelinas y citocininas en el cultivo de
tomate tratado con un producto de base natural**

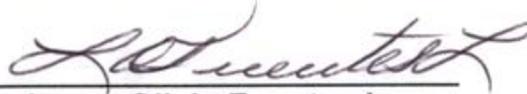
Presentado por:
ROSA MARÍA CORTÉS ARGANDA

T E S I S

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

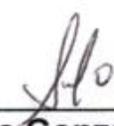
JURADO EXAMINADOR



Lic. Laura Olivia Fuentes Lara
Presidente



Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Vocal



Dra. Susana González Morales
Vocal



Dra. Susana Solís Gaona
Vocal externo

Saltillo, Coahuila, México, Junio 2014

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme la oportunidad de vivir y por permitirme estudiar en la universidad más bonita del mundo la **UAAAN**, también por terminar mi carrera profesional en compañía de mis seres queridos.

A mi **Alma Terra Mater la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** y a todas las instituciones en las que pase por brindarme la oportunidad de adentrarme a este bello mundo del saber.

Al **Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, también al **Departamento de Horticultura**.

A la empresa **Arysta Lifescience México** por el gran apoyo para la realización de este proyecto de tesis.

A la **Dra. Susana González Morales** por darme la oportunidad de realizar este trabajo de tesis, por su paciencia y colaboración sin su ayuda no habría sido nada de esto posible.

Al **Dr. Adalberto Benavides Mendoza** por sus excelentes y valiosas aportaciones en este proyecto.

A la **Lic. Laura Olivia Fuentes Lara** por sus observaciones y consejos.

A la **Dra. Susana Solís Gaona** por el apoyo para la culminación de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de generación **Juan López, Sandra Pedraza, Analí Martínez, Lorena Hernández, Benjamín González, Lourdes Vázquez**.

A mis amigos que conviví en varias ocasiones **Carmen Nerí, Liliana Fuentes, Miriam Peralta, Daniel Gonzales, Brenda Martínez, Humberto García** y a **Don Gustavo López y Doña Concepción**.

DEDICATORIAS

A mis padres

J. TRANSITO CORTÉS QUINTERO

BERTHA ARGANDAR YÁÑEZ

Con todo el amor y cariño, por todo su apoyo en mi vida. Los quiero mucho y les agradezco infinitamente todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanos

JOSÉ FRANCISCO CORTÉS ARGANDA

SIXTO MANUEL CORTÉS ARGANDAR

LAURA PATRICIA CORTÉS ARGANDAR

MARÍA CANDELARIA CORTÉS ARGANDAR

Por todo el cariño, por su apoyo incondicional para concluir mis estudios, las palabras de aliento y consejos para salir adelante en mi vida.

A todos mis familiares

Por la gran motivación que me dieron en mis estudios y por no dejarme vencer durante todo este camino recorrido en especial a la familia *CORTÉS QUINTERO* y la familia *ARGANDAR YÁÑEZ*

A mis padrinos

VERÓNICA ARROLLO y *ARTURO MARTÍNEZ* por el gran cariño, su apoyo incondicional y consejos para formarme como una persona de bien.

GRACIAS A TODOS POR SUS PALABRAS DE ALIENTO Y POR EL APOYO BRINDADO QUE ME IMPULSA A SEGUIR ADELANTE.....

PARÁBOLA DE LA EDUCACIÓN

Iba un hombre caminando por el desierto cuando oyó una voz que le dijo:

“levanta unos guijarros, mételos en tu bolsillo y mañana te sentirás a la vez triste y contento”.

Aquel hombre obedeció. Se inclinó, recogió un puñado de guijarros y se los metió en el bolsillo.

A la mañana siguiente, vio que los guijarros se habían convertido en diamantes, rubíes y esmeraldas.

Y se sintió feliz y triste.

Feliz, por haber recogido los guijarros; triste, por no haber recogido más.

¡Lo mismo pasa con la educación!

William Cunningham

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	12
CAPÍTULO I	13
1.1 INTRODUCCIÓN	13
1.2 HIPÓTESIS	15
1.3 OBJETIVOS	15
1.3.1 OBJETIVO GENERAL	15
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
CAPÍTULO II	16
2.1 REVISIÓN DE LITERATURA	16
2.1.1 EL TOMATE (<i>Solanum lycopersicum</i>)	16
2.1.1.1 TAXONOMÍA.....	16
2.1.2 MORFOLOGÍA	17
2.1.2.1 Raíz.....	17
2.1.2.2 Tallo.....	17
2.1.2.3 Hoja.....	17
2.1.2.4 Flor	17
2.1.2.5 Fruto.....	17
2.1.3 ETAPAS FENOLÓGICAS DEL CULTIVO DE TOMATE.....	18
2.1.3.1 FASE INICIAL:.....	18
2.1.3.2 FASE VEGETATIVA:.....	18
2.1.3.2.1 Floración.....	19
2.1.3.2.2 Amarre de frutos.....	19
2.1.3.3 FASE REPRODUCTIVA:.....	19

2.1.3.3.1	Cuajado o fructificación.....	19
2.1.3.3.2	Desarrollo del fruto.....	20
2.1.4	HORMONAS VEGETALES.....	22
2.1.4.1	FUNCIÓN DE LAS FITOHORMONAS.....	22
2.1.4.2	AUXINAS.....	23
2.1.4.3	GIBERELINAS.....	24
2.1.4.4	CITOCININAS.....	24
2.1.5	EXPRESIÓN DE GENES.....	25
2.1.5.1	RT-PCR.....	25
2.1.6	GENES.....	26
2.1.6.1	Gen AUXIAA.....	27
2.1.6.2	Gen GH3.....	27
2.1.6.3	Gen PIN4.....	27
2.1.6.4	Gen GID2.....	28
2.1.6.5	Gen GA20ox2 y Gen GA20ox4.....	28
2.1.6.6	Gen ARR.....	28
2.1.6.7	Gen LOG2.....	29
2.1.6.8	Gen SICYP735A1.....	29
CAPÍTULO III	30
3.1	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	30
3.1.1	FASE 1. APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS Y EVALUACIÓN AGRONÓMICA.....	30
3.1.1.1	Localización.....	30
3.1.1.2	Siembra.....	30
3.1.1.3	Trasplante.....	30

3.1.1.4	Descripción de los tratamientos.....	31
3.1.2	FASE 2. EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	31
3.1.2.1	Localización del experimento	31
3.1.2.2	Toma de muestras.....	31
3.1.2.3	Material vegetativo	32
3.1.2.4	Proceso de las muestras	32
3.1.3	EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL (AXYPREP MULTISOURCE TOTAL RNA MINIPREP KIT, MARCA AXYGEN).	33
3.1.4	CUANTIFICACIÓN DE ARN.....	34
3.1.5	CALIDAD DEL ARN.....	34
3.1.6	SÍNTESIS DE C-ADN (KIT IMPROM-II™ REVERSE TRANSCRIPTION SYSTEM MARCA PROMEGA).....	37
3.1.6.1	Primera reacción	37
3.1.6.2	Segunda reacción.....	38
3.1.7	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	39
3.1.8	ELECTROFORESIS HORIZONTAL DE AGAROSA AL 3%	45
3.1.9	ANÁLISIS SEMI-CUANTITATIVO	45
	CAPÍTULO IV	46
4.1	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
4.1.1	CUANTIFICACIÓN DEL ARN.....	46
4.1.2	CALIDAD DEL ARN.....	48
4.1.3	EXPRESIÓN DE GENES CUALITATIVA	50
4.1.3.1	Gen LOG2.....	52
4.1.3.2	Gen SICYP735A1.....	53
4.1.3.3	Gen PIN4.....	54
4.1.3.4	Gen GA20OX2	55

4.1.3.5	Gen GA20OX4	56
4.1.3.6	Gen endógeno G3f.....	57
4.1.4	EXPRESIÓN DE GENES SEMI-CUANTITATIVA.....	58
4.1.4.1	Gen LOG2.....	59
4.1.4.2	Gen SICYP735A1.....	60
4.1.4.3	Gen PIN4.....	61
4.1.4.4	Gen GA20OX2	62
4.1.4.5	Gen GA20OX4	63
CAPÍTULO V		65
5.1	CONCLUSIONES.....	65
BIBLIOGRAFÍA.....		66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Flor de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).	18
Figura 2.	Etapas fenológicas del tomate.....	20
Figura 3.	Modelo para la iniciación de la fructificación y desarrollo del fruto	21
Figura 4.	Liofilizador marca Labconco Freezone.	32
Figura 5.	Preparación de Agarosa en parilla de calentamiento.	35
Figura 6.	Solución de agarosa en el portagel de la cámara de electroforesis junto con el peine.....	35
Figura 7.	Termoplaca con tubos eppendorf del segundo muestreo (18-32).	36
Figura 8.	Síntesis de c-DNA en un Termociclador marca Labnet.	38
Figura 9.	Iniciadores forward y reverse en contenedor con hielo molido.	40
Figura 10.	Preparación del coctel.	41
Figura 11.	Termociclador marca Labnet corriendo prueba de PCR.	42
Figura 12.	Electroforesis desnaturalizante con gel de agarosa al 1.3%. En los carriles del 1 al 16 se encuentran las muestras correspondientes al primer muestreo (1-16).	49
Figura 13.	Electroforesis desnaturalizante con gel de agarosa al 1.3%. En los carriles del 17 al 32 se encuentran las muestras correspondientes al segundo muestreo (17-32).	49
Figura 14.	Electroforesis desnaturalizante con gel de agarosa al 1.3%. En los carriles del 18 al 32 se encuentran las muestras correspondientes al primer segundo muestreo (18, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31 y 32).	50
Figura 15.	Amplificación de los 9 genes (auxinas, giberelinas y citocininas) analizados en este estudio a diferentes temperaturas de anillamiento según los iniciadores. Carril 1 y 20: Marcador molecular 100pb; carril 2 y 3: gen AXIAA; carril 4 y 5: gen A-RR; carril 6 y 7: gen LOG2; carril 8 y 9: gen SICYP735A1; carril 10 y 11: gen GID2; carril 12 y 13: gen PIN4; carril 14 y 15: gen GA20Ox4; carril 16 y 17: gen GH3 y carril 17 y 19: gen GA20Ox2.....	51
Figura 16.	Amplificación del gen LOG2 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 58°C. Carriles M y	

M': Marcador molecular 100pb; carriles 1-16: muestras correspondientes al primer muestreo (1-16).....	52
Figura 17. Amplificación del gen LOG2 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 58°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 17-32: muestras correspondientes al segundo muestreo (17-32).....	52
Figura 18. Amplificación del gen SICYP735A1 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 58°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 1-16: muestras correspondientes al primer muestreo (1-16).....	53
Figura 19. Amplificación del gen SICYP735A1 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 58°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 17-32: muestras correspondientes al segundo muestreo (17-32).	53
Figura 20. Amplificación del gen PIN4 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 57°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 1-16: muestras correspondientes al primer muestreo (1-16).	54
Figura 21. Amplificación del gen PIN4 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 57°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 17-32: muestras correspondientes al segundo muestreo (17-32).....	54
Figura 22. Amplificación del gen GA20OX2 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 60°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 1-16: muestras correspondientes al primer muestreo (1-16).	55
Figura 23. Amplificación del gen GA20OX2 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 60°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 17-32: muestras correspondientes al segundo muestreo (17-32).....	55

Figura 24.	Amplificación del gen GA20OX4 por un barrido de PCR con diferentes temperaturas de anillamiento (56-61°C).	56
Figura 25.	Amplificación del gen GA20OX4 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 57°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 1-16: muestras correspondientes al primer muestreo (1-16).	56
Figura 26.	Amplificación del gen GA20OX4 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 57°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 17-32: muestras correspondientes al segundo muestreo (17-32).	57
Figura 27.	Amplificación del gen G3f por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 60°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 1-16: muestras correspondientes al primer muestreo (1-16).	58
Figura 28.	Amplificación del gen G3f por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 60°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 17-32: muestras correspondientes al segundo muestreo (17-32).	58
Figura 29.	Imagen del Software ImageJ versión 1.47.	59
Figura 30.	Análisis de expresión semi-cuantitativo del gen LOG2 con el Software ImageJ.	59
Figura 31.	Análisis de expresión semi-cuantitativo del gen SICYP735A12 con el Software ImageJ.	60
Figura 32.	Análisis de expresión semi-cuantitativo del gen PIN4 con el Software ImageJ.	61
Figura 33.	Análisis de expresión semi-cuantitativo del gen GA20OX2 con el Software ImageJ.	62
Figura 34.	Análisis de expresión semi-cuantitativo del gen GA20OX4 con el Software ImageJ.	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	16
Cuadro 2. Cuantificación de ARN.....	34
Cuadro 3. Calidad de ARN	36
Cuadro 4. Secuencias de los iniciadores utilizados para identificar la expresión de los genes específicamente para <i>Solanum lycopersicum</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
Cuadro 5. Codificación de las 32 muestras obtenidas en el primero y segundo muestreo.....	46
Cuadro 6. Valores obtenidos en la cuantificación de ARN por espectrofotometría.	47

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en los meses de Abril a Agosto del 2013 en el Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ubicada en Saltillo Coahuila México. Con el objetivo de estudiar el modo de acción de un producto de base natural respecto a la inducción de expresión génica para las hormonas; auxinas, giberelinas y citocininas en las etapas de floración y amarre de fruto del tomate. Las variables evaluadas fueron la expresión cualitativa y semi-cuantitativa de 3 genes relacionados a auxinas, 3 a giberelinas y 3 a citocininas. Los resultados obtenidos indican que la aplicación del producto antes de antesis induce sobreexpresión de 1 gen relacionado a auxinas, con una segunda aplicación después de antesis se indujo sobreexpresión de 2 genes relacionados a citocininas y 2 a giberelinas, el gen que tuvo mayor sobreexpresión fue el gen SICYP735A1, el cual es clave para las hormonas citocininas que son responsables de la frecuencia de división celular, lo cual se manifiesta fenotípicamente en la obtención de frutos de mayor tamaño.

Palabras clave: Hormonas, auxinas, giberelinas, citocininas, expresión génica, gen, inducción, extracto vegetal.

1.1 INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*), es considerado una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo gracias a su gran adaptabilidad, variabilidad, características organolépticas y usos.

Tiene su centro de origen en América del sur, entre el área del Perú y Ecuador, de donde se distribuyó a diferentes partes de América tropical, incluyendo México.

El nombre moderno del tomate tiene su origen en la lengua náhuatl de México donde se llamaba “tomatl” (Esquinas y Nuez, 2001, Rodríguez *et al.*, 2001). Es uno de los cultivos hortícolas más redituables en el mundo (Hilhorst *et al.*, 1998).

En la actualidad, se ha convertido en una de las hortalizas más populares y cultivadas, siendo la base de una importante industria agraria. Sus frutos, además de consumirse frescos, se procesan para la obtención de salsas, sopas, purés, zumos, concentrados, conservas, etc. (Diez *et al.*, 1996).

En México se siembran alrededor de 80,000 ha con un rendimiento promedio de 28.7 ton/ha., por lo cual es la segunda hortaliza más importante por la superficie sembrada que ocupa; la más importante por su volumen en el mercado nacional, y la primera por su valor de producción (Nieto y Velasco, 2006).

El rendimiento es el rasgo más importante de reproducción de cultivos. Para las plantas frutales tales como *Solanum lycopersicum* (tomate), la formación de frutos afecta directamente el rendimiento.

Estudios genéticos han identificado los genes que influyen en el ciclo celular, número de carpelo y cuajado de los frutos. Además, varias líneas de investigación han demostrado que las fitohormonas controlan el cuajado y tamaño de frutos a

través de la delicada regulación de los genes que desencadenan respuestas fisiológicas asociadas con la expansión de la fruta (Ariizumi *et al*, 2013).

El producto de base natural ha sido reportado como un inductor de mejora de los componentes de rendimiento del cultivo de tomate, (Ofosu-Anim, 2007) obtuvo incremento significativo del rendimiento del fruto, amarre de frutos, peso y diámetro de frutos de tomate. Galván *et al.*, 2009 encontró que se incrementó el porcentaje de amarre de frutos final y número de frutos retenidos en plantas de naranja.

1.2 HIPÓTESIS

Un producto de base natural (extractos vegetales) modifica la expresión génica de hormonas (auxinas, giberelinas y citocininas).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el modo de acción de un producto de base natural respecto a la expresión génica para las hormonas; auxinas, giberelinas y citocininas en las etapas de floración y amarre de fruto del tomate.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar una búsqueda de los principales genes asociados a las hormonas, auxinas, giberelinas y citocininas, así como el diseño de los iniciadores para realizar la expresión de dichos genes.
2. Obtener las amplificaciones de la expresión de genes, relacionados con las hormonas auxinas, giberelinas y citocininas sobre plantas de tomate.
3. Realizar la evaluación semi-cuantitativa de la expresión génica en diferentes etapas fisiológicas de las plantas de tomate, mediante un programa de densitometría.

2.1 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.1 EL TOMATE (*Solanum lycopersicum*)

2.1.1.1 TAXONOMÍA

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta dicotiledónea que se encuentra en la familia de las solanáceas. La taxonomía aceptada para esta especie es la siguiente (Fooland, 2007):

Cuadro 1. Taxonomía (*Solanum lycopersicum* L.)

Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Traqueobinta</i>
Superdivisión:	<i>Spermatophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Solanales</i>
Suborden:	<i>Solanineae</i>
Familia:	<i>Solonaceae</i>
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>Lycopersicum</i>

En la primera clasificación taxonómica, al tomate cultivado se le denominó *Solanum lycopersicum* (Linnaeus, 1753). En 1754, Miller hace una distinción asignando al tomate cultivado el género *Lycopersicon* y la especie *esculentum* (Miller, 1754).

2.1.2 MORFOLOGÍA

2.1.2.1 Raíz

El sistema radicular del tomate está constituido por: la raíz principal, las raíces secundarias y las raíces adventicias. Por lo general se extiende superficialmente sobre un diámetro de 1.5 m y alcanzan más de 0.5 m de profundidad.

2.1.2.2 Tallo

Es herbáceo, rastrero por naturaleza si no posee algún sostén, tiene de 2 a 4 cm de diámetro en la base y está cubierto por pelos glandulares que salen de la epidermis.

2.1.2.3 Hoja

Las hojas del tomate son pinnado compuestas. Una hoja típica de la planta cultivada tiene unos 5 cm de largo.

2.1.2.4 Flor

La flor de tomate es perfecta consta de 5 ó más sépalos y, de 5 ó más pétalos. Un número igual de estambres que se alternan con los pétalos y de un ovario. Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racimo cimoso, compuesto por 4 a 12 flores (Greyson y Sawhney, 1972).

2.1.2.5 Fruto

El fruto de tomate se clasifica como una baya carnosa que contiene abundante semilla. Cada semilla se encuentra cubierta por una sustancia mucilaginosa, llamada placenta contenida en cavidades o lóculos. Hay una variabilidad muy grande de tamaño y forma de fruto.



Figura 1. Flor de tomate (*Solanum lycopersicum*).

2.1.3 ETAPAS FENOLÓGICAS DEL CULTIVO DE TOMATE

La fenología del cultivo comprende a las etapas que forman su ciclo de vida. Dependiendo de la etapa fenológica de la planta, así son sus demandas nutricionales, necesidades hídricas, susceptibilidad o resistencia a insectos y enfermedades.

2.1.3.1 FASE INICIAL:

Comienza con la germinación de la semilla, a partir del primero hasta los 21 días. Se caracteriza por el rápido aumento en la materia seca, la planta invierte su energía en la síntesis de nuevos tejidos de absorción y fotosíntesis.

2.1.3.2 FASE VEGETATIVA:

Es la continuación de la fase inicial, pero el aumento en materia seca es más lento, dura entre 22 a 49 días, esta etapa termina con la floración. Se requiere de mayores cantidades de nutrientes para satisfacer las necesidades de las hojas y

ramas en crecimiento y expansión. La planta florece entre 51 a 80 días, desde la fase inicial.

2.1.3.2.1 Floración

La diferenciación y desarrollo de la flor constituyen etapas previas a la fructificación y, en consecuencia, todos los factores que afectan a la floración pueden influir sobre la precocidad, rendimiento y calidad de los frutos. La floración es un proceso complejo afectado por numerosos factores entre los que destacan la variedad, la temperatura, la iluminación, la competencia con otros órganos de la planta, la nutrición mineral y los tratamientos con reguladores de crecimiento.

2.1.3.2.2 Amarre de frutos

Se considera como el crecimiento rápido del ovario que sigue la polinización y la fecundación. Generalmente se producen simultáneamente otros cambios, como el marchitamiento de pétalos y estambres. En muchas plantas, el amarre de frutos conlleva a la abscisión de muchas de las flores y frutos que no amarran (Weaver, 1990).

2.1.3.3 FASE REPRODUCTIVA:

Se inicia a partir de la fructificación, dura entre 30 ó 40 días, se caracteriza porque el crecimiento de la planta se detiene y los frutos extraen los nutrientes necesarios para su crecimiento y maduración.

2.1.3.3.1 Cuajado o fructificación.

La formación del fruto es uno de los procesos del desarrollo más complejo de las plantas. El cuajado o fructificación se entiende como la reanudación del crecimiento del ovario de la flor, pasando de una condición estática a un rápido crecimiento. (Gillaspy *et al.*, 1993). El tiempo necesario para que el ovario se

convertida en fruto maduro puede tardar entre 7 y 9 semanas desde la antesis (Chamarro, 1995).

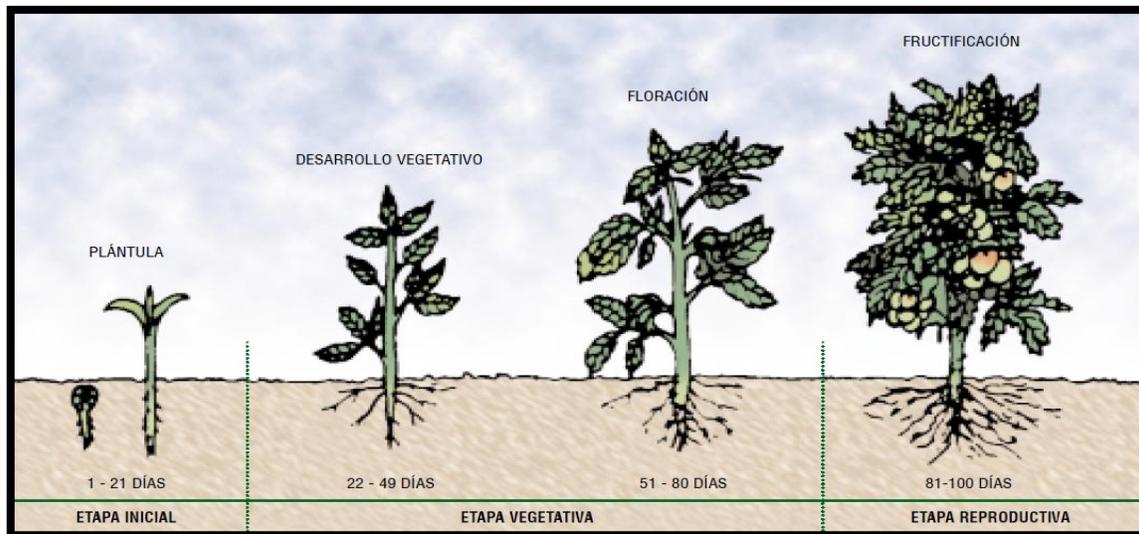


Figura 2. Etapas fenológicas del tomate.

2.1.3.3.2 Desarrollo del fruto

Tras la fertilización de los óvulos, los carpelos se transforman en un órgano complejo cuyo crecimiento da lugar a un fruto maduro. El desarrollo del fruto asegura la dispersión de la semilla y la posterior supervivencia de la planta. Las plantas de tomate producen frutos rojos carnosos como resultado de un proceso de desarrollo que incluye tres fases (Gillaspy y col., 1993).

La primera fase comienza con el estadio de antesis de la flor y está relacionada con el desarrollo del ovario y la decisión de abortar o continuar con el desarrollo del fruto (cuajado).

En la segunda fase, el crecimiento del fruto ocurre como consecuencia de divisiones celulares, siendo en esta fase donde comienza a desarrollarse los embriones.

En la tercera fase cesa la división celular y el fruto continúa creciendo a través de la expansión celular hasta que alcanza el tamaño final. Una vez que el fruto está completamente desarrollado y las semillas alcanzan la madurez, aumenta la respiración y la síntesis de etileno, lo que conduce a la maduración.

Como consecuencia, se producen cambios bioquímicos y fisiológicos que afectan al color, textura, sabor, aroma y contenido nutricional. Posteriormente, tiene lugar un proceso de reblandecimiento debido a la degradación de paredes celulares en diferentes compartimientos del fruto (Giovannoi, 2004).

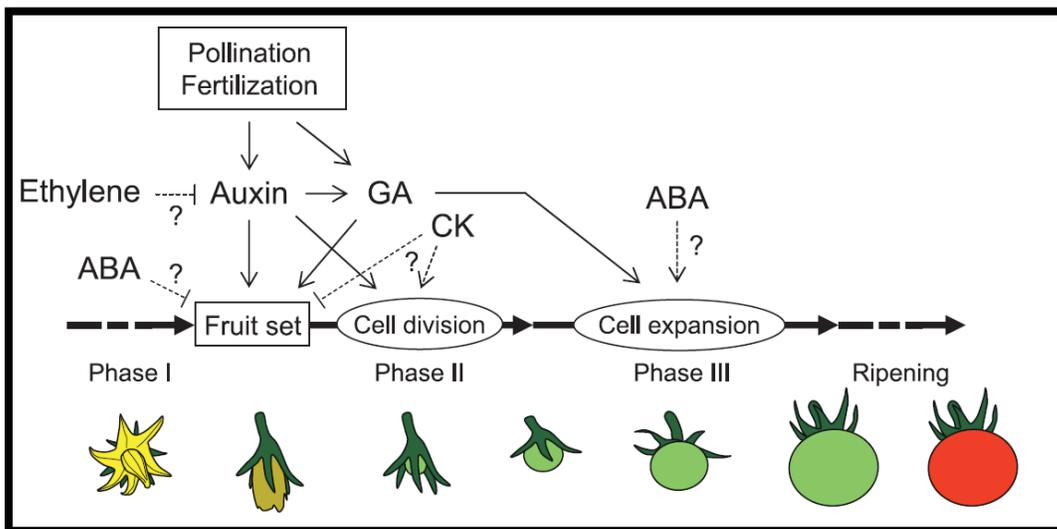


Figura 3. Modelo para la iniciación de la fructificación y desarrollo del fruto

El carpelo surge del meristemo (fase I). Tras la polinización y la fertilización, la auxina y la giberelina (GA) la síntesis se estimulan en el ovario. La auxina induce el crecimiento del fruto mediante la activación de la división celular y la estimulación de la iniciación del cuajado (fase II), mientras que GA induce el crecimiento del fruto mediante la activación de la expansión de células (fase III). Las citocininas CK pueden inducir la división celular después de la antesis.

2.1.4 HORMONAS VEGETALES

Las hormonas vegetales son producto de las glándulas de secreción interna que regula la mayor parte del proceso metabólico. En realidad es muy difícil de definir el término hormona vegetal con precisión. A menudo se refiere al término fitorregulador que son los compuestos naturales o sintéticos que inducen respuesta en el crecimiento, desarrollo o metabolismo de las plantas (Bidwell, 1993).

Estas sustancias ejercen una acción estimulando un proceso fisiológico tanto en las zonas de producción como en otras áreas de la planta y causan la producción y/o activación de enzimas (González citado por Pérez, 1996).

Son aquellas sustancias orgánicas que se sintetizan en alguna parte de la planta, y que se trasladan a otro donde ejercen su acción fisiológica en muy bajas concentraciones. El crecimiento y desarrollo de las plantas está regulado por hormonas estimulantes del crecimiento que son las auxinas, giberelinas y citocininas.

2.1.4.1 FUNCIÓN DE LAS FITOHORMONAS

Durante mucho tiempo se creyó que las plantas determinaban directamente los procesos de desarrollo y que se activaban sobre los grandes fenómenos como la emisión de raíces, flores, etc. (Hernández 1999).

En la actualidad existe evidencia suficiente para postular dos hechos básicos sobre la acción fundamental de las fitohormonas:

1.- Las fitohormonas no actúan directamente a nivel del organismo, sino de la célula, por ejemplo sobre la mitosis, el alargamiento celular, etc.; de modo que sus efectos se hacen sentir en todos los fenómenos citológicos.

2.- Afectan la acción de las hormonas sobre los ácidos nucleicos a nivel de transcripción del mensaje genético y su traducción (Rojas, citado por Hernández 1999).

2.1.4.2 AUXINAS

Las auxinas son, las primeras hormonas vegetales en ser descubiertas. El término auxina, proviene del griego “auxein” significa “crecer”, que fue aplicado pocos años después por Kögl y Haagen-Smith al examinar una sustancia promotora de crecimiento vegetal presente en orina humana pero de estructura diferente a la hormona vegetal. La hormona vegetal fue luego aislada desde maíz y hongos e identificada más tarde como ácido indol-3-acético (Thimann 1977).

Es bien conocido que la fitohormona desencadena el cuajado de los frutos en el tomate mediante la activación de la división celular, expansión y diferenciación (Ariizumi *et al*, 2013). También controlan muchos aspectos del desarrollo del fruto, que incluyen las etapas secuenciales de formación del fruto, la expansión, la maduración y abscisión (Gillaspy *et al.*, 1993; Srivastava y Handa, 2005).

Las auxinas se definen como sustancias orgánicas que promueven la elongación celular cuando se aplican en concentraciones bajas a tejidos vegetales (Cohen *et al.*, 2003). La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (IAA), muy activo en bioensayos y presente comúnmente en concentraciones nanomolares. Aunque las auxinas se encuentran en todos los tejidos de la planta, una mayor concentración ocurre en las regiones que están en crecimiento activo.

Las auxinas efectúan un alargamiento de las células y probablemente esta acción es debido a que afectan la formación de las paredes celulares. Al parecer inducen a la célula a sintetizar más material de la pared primaria y a depositar este material en los dos extremos de la célula el resultado es el alargamiento de la célula (Weisz, 1980).

2.1.4.3 GIBERELINAS

Las giberelinas (GAs) son ácidos diterpenos tetracíclicos naturales, cuya estructura básica está constituida por un anillo de ent-giberelano, algunos de los cuales poseen actividad hormonal (Talón, 2000). Pueden actuar como reguladores endógenos del crecimiento controlando diversos procesos del desarrollo de las plantas como la germinación, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas y la inducción de flores y frutos (Pharis y King, 1985; Huttly y Phillips, 1995; Sponsel, 1995; Hedden y Kamiya, 1997).

Esta fitohormona es conocida por estimular varios aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo la elongación del tallo, la germinación de semillas, la transición a la floración y la fertilidad (Finkelstein *et al.* 2008, Sun y Gubler 2004).

Hacia 1935 se utilizó por primera vez el término giberelina, cuando unos fitopatólogos japoneses descubrieron una sustancia producida por el hongo *Gibberella fujikuroi* que causa crecimiento excesivo de los tallos y brotes de la planta del arroz, provocando la enfermedad conocida como “bakanae”. A mediados de los años 50 se aisló, a partir del filtrado secretado por el hongo, el compuesto inductor del crecimiento del tallo que se denominó ácido giberélico (giberelina A3 o GA3). Posteriormente, se aislaron en plantas compuestos de estructuras similares al ácido giberélico. (Hedden, y Proebsting, 1999; Talón, 2000). En plántulas, la síntesis y presencia de altos contenidos de estas hormonas se detecta en hojas y yemas en activo crecimiento. Participa en el cuajado de frutos y la evidencia molecular y genética reciente demuestra que la regulación precisa de la biosíntesis de GA es importante para el control del inicio del cuajado del fruto en tomate.

2.1.4.4 CITOCININAS

Son hormonas vegetales que actúan como reguladores clave en diversos aspectos del crecimiento y desarrollo de plantas, incluyendo la división celular, senescencia foliar, dominancia apical, formación de raíces laterales, la tolerancia

al estrés y señalización nutricional (Werner *et al*, 2003; Sakakibara, 2006; Argueso *et al*, 2009). Son un grupo de hormonas que regulan la división celular. Derivan de la adenina o de aminopurinas. Las diferentes cadenas laterales se unen al nitrógeno del carbono 6. La primera citocinina natural aislada fue la zeatina [N-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)aminopurina] obtenida de granos de maíz (*Zea mays*).

Las citocininas permiten el desarrollo de cloroplastos (con formación de granas) en oscuridad, reemplazando parcialmente la demanda de luz. Una mayor permanencia de clorofilas activas implica para la hoja y la planta la conservación de la síntesis de proteínas y consiguiente transcripción de varios genes. Promueven la división celular, regulan los ácidos nucleicos (ADN y ARN), la dominancia apical, la ramificación, la iniciación de yemas, impide la abscisión y senescencia de flores, frutos y hojas (Westwood, 1982).

2.1.5 EXPRESIÓN DE GENES

La expresión génica es un proceso muy complejo mediante el cual se logra la síntesis de una cadena polipeptídica a partir de la información hereditaria contenida en el gen correspondiente, lo que constituye el llamado dogma central de la genética perfeccionado en las últimas décadas con los conocimientos aportados por la Biología Molecular. La información genética en el ADN es transcrita a una molécula de ARNm (transcripto primario), la cual es procesada para dar una molécula de ARN maduro. Este ARNm es transportado desde el núcleo hasta el citoplasma donde es traducido para la síntesis de una proteína.

2.1.5.1 RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR del inglés Reverse transcription polymerase chain reaction) es una variante de PCR, una técnica de laboratorio comúnmente usada en biología molecular para generar una gran cantidad de copias de ADN, proceso llamado "amplificación".

En el RT-PCR, sin embargo, es una hebra de ARN es retrotranscripta en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa, y el resultado, se amplifica en un PCR tradicional.

Se realiza mediante la metodología conocida como RT-PCR, la cual conjuga la técnica de PCR y la reacción catalizada por la enzima transcriptasa inversa (RT), una polimerasa capaz de sintetizar una cadena de ADN a partir de una molécula de ARN molde (transcripción inversa). Posteriormente se amplifica mediante PCR este ADN sintetizado por la RT, así la cantidad del producto amplificado obtenido es directamente proporcional a la cantidad de moléculas del ARNm presente inicialmente en el material de partida, por lo que la intensidad del fragmento amplificado observado en una electroforesis es un indicador aproximado de los niveles de síntesis de dicho ARNm. (Foley KP, Leonard MW, Engel JD. 1993).

El análisis del ARNm se ha visto ampliamente extendido a partir del surgimiento de la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la década de los 80, la cual es actualmente una de las principales herramientas de la Biología y la Genética Molecular. (Saiki RK, Gelfand DH. 1989).

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction) permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA (ácido desoxirribonucleico). Fue desarrollada en 1983 por el Doctor Kary Mullis quien recibió en 1993 el Premio Nobel de Química por este descubrimiento. (Mullis, K.B. 1993.)

2.1.6 GENES

Un gen es una unidad de información o un segmento corto de ADN que contiene todos los elementos necesarios para su expresión de manera regulada. También se define como una secuencia de nucleótidos en la molécula de ADN que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica y puede estar vinculada con el desarrollo o funcionamiento de una función fisiológica. El gen es considerado la unidad de almacenamiento de

información genética y unidad de la herencia, pues transmite esa información a la descendencia.

(<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002371.htm>, 2014).

2.1.6.1 Gen AUXIAA

El ácido indolacético (IAA) es la auxina más estudiada y la de mayor presencia natural en plantas. La principal auxina endógena es el ácido indolil-3-acético (AIA). Es sintetizada en la planta a partir del L-triptofano, que puede estar libre o formando parte de proteínas. Por acción de una transaminasa se transforma en ácido indolpirúvico el cual se descarboxila por acción de una descarboxilasa formándose indol-acetaldehído. Luego actúa una oxidasa que lo transforma en ácido indol acético. La síntesis de IAA ocurre principalmente en meristemos apicales, hojas jóvenes y frutos en desarrollo.

2.1.6.2 Gen GH3

El primer gen identificado de la familia de las GH3 fue descrito por primera vez en soja como un gen de respuesta rápida a auxina (Hagen *et al.*, 1984). Pero la mayoría de datos sobre los genes de GH3 proviene de estudios realizados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

2.1.6.3 Gen PIN4

Un mecanismo importante que regula la distribución de auxina es el transporte polar de auxina mediada por las proteínas PIN y AUX/LAX, que controlan el flujo y afluencia celular de auxina respectivamente (Vanneste y Friml, 2009). En *Arabidopsis thaliana* se han descrito ocho proteínas PIN (Paponov *et al.*, 2005), de las cuales varias están directamente involucrados en la creación de gradientes de auxina que controlan diversos procesos de desarrollo tales como la embriogénesis, la iniciación de órganos, la diferenciación del tejido vascular y tropismos (Petra 'sek y Friml, 2009).

2.1.6.4 Gen GID2

La proteína F-box (Proteína SLEEPY 1 en *Arabidopsis thaliana*), es un componente esencial de los de tipo complejo SCF E3 ligasa, SCF (GID2), un complejo que regula positivamente la vía de señalización de giberelinas. Tras el tratamiento de giberelina, el complejo SCF (GID2) que media la posterior degradación de las proteínas DELLA (GAI, RGA y RGL2), algunos represores de la vía de giberelinas, que conduce a activar la vía. (Harberd *et al*, 2009.)

2.1.6.5 Gen GA20ox2 y Gen GA20ox4

Los genes GA20OX2 y GA20OX4 están implicados en el desarrollo de la polinización del ovario, ya que están asociados con el aumento de la acumulación del ARNm de la enzima GA 20-oxidasa (GA20ox), mientras que los ovarios no polinizados no muestran una mayor acumulación de ARNm GA20ox (Serrani *et al*. 2007).

2.1.6.6 Gen ARR

Esta familia de genes ARR se ha dividido en dos grupos, denominados tipo A y tipo B, que difieren en su secuencia y estructura de dominio (Brandstatter y Kieber, 1998; Imamura *et al*, 1999.). Además, varios de los genes de tipo A han considerado que responde al tratamiento citoquinina exógena, pero los genes de tipo B no parece estar regulada por citoquinina (Brandstatter y Kieber, 1998; Taniguchi *et al*, 1998.; Imamura *et al.*, 1999; Kiba *et al*, 1999.).

ARR4 y ARR5 (anteriormente llamado IBC7 e IBC6) fueron los primeros genes de respuesta rápida de citoquinina identificados (Brandstatter y Kieber, 1998). Son miembros de *Arabidopsis* de tipo A de la familia de homólogos de respuesta como regulador de dos componentes, otros varios de los cuales habían sido reportados previamente como citoquinina-inducible (Taniguchi *et al*, 1998.; Kiba *et al*, 1999.).

2.1.6.7 Gen LOG2

El gen LOG2 se expresa principalmente en botón floral y flores. La expresión de LOG2 es baja antes de la floración, y aumenta gradualmente después de la polinización, los ovarios no polinizados mostraron consistentemente baja expresión de LOG2 (Matsuo *et al.*, 2012).

2.1.6.8 Gen SICYP735A1

El gen SICYP735A1 se expresa principalmente en las raíces, flores y frutos jóvenes. La expresión de gen SICYP735A1 generalmente es baja antes de la antesis y posteriormente aumenta bruscamente, por lo que puede estar relacionado con la inducción de la frecuencia de la división celular, de la cual se tiene evidencia que es el proceso que determina el tamaño y el peso del fruto final (Cheniclet *et al*, 2005). La enzima SICYP35A se considera clave en la regulación de citocininas.

3.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

La presente investigación se realizó en dos fases, la primera de ellas fue la aplicación de tratamientos y evaluación agronómica; la segunda fase se realizó la evaluación de expresión génica.

3.1.1 FASE 1. APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS Y EVALUACIÓN AGRONÓMICA.

3.1.1.1 Localización

Se realizó en el Invernadero de Investigación Biológica de Arysta Lifescience México.

3.1.1.2 Siembra

Se llevó a cabo la siembra de semillas de *Solanum lycopersicum* (Var comercial Río Grande, Seminis) el 01 febrero del 2013 en charolas con sustrato de germinación en el invernadero de la empresa Arysta.

3.1.1.3 Trasplante

El trasplante de las plántulas de tomate se realizó el 22 de marzo a 49 días después de la siembra en macetas de plástico negro con capacidad de 5 L llenas con mezcla de sustrato peat moss, vermiculita y perlita en proporción 3:2:1. Las plantas se mantuvieron con fertirrigación utilizando la solución Steiner modificada. Se realizaron labores de tutorado, poda de yemas axilares y aplicación de insecticidas para el control de mosquita blanca y trips.

3.1.1.4 Descripción de los tratamientos

El experimento consistió en aplicar a las plantas tres diferentes dosis de un producto de base natural, a concentraciones de 0.5, 1 y 2 ml de extracto por litro de agua, así como el testigo en donde se aplicó solamente agua) para evaluar el efecto de estos tratamientos en una y dos aplicaciones; la primera realizada el 15 de abril del 2013 a los 24 días después del trasplante (ddt) aproximadamente una semana antes de antesis y la segunda el 1 de mayo del 2013 a los 40 ddt entre antesis y amarre de fruto del primer racimo floral.

3.1.2 FASE 2. EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA.

3.1.2.1 Localización del experimento

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de fisiología vegetal en el Departamento de Horticultura ubicado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buena Vista Saltillo Coahuila México.

3.1.2.2 Toma de muestras

Se tomaron muestras en dos etapas fisiológicas diferentes. El primer muestreo se realizó el 16 de abril del 2013, y 24 horas después se realizó otro muestreo solamente por si no obteníamos resultados en el primero. El segundo muestreo fue llevado a cabo el 2 de mayo del 2013 y 24 horas después se tomó otro por las mismas razones.

Se tomaron 4 repeticiones por tratamiento por etapa fisiológica, dando un total de 32 muestras (4 tratamientos x 2 etapas fisiológicas x 4 repeticiones). Cada repetición se definió como una unidad experimental, lo que equivale a una planta como unidad experimental.

3.1.2.3 Material vegetativo

Las muestras de cada unidad experimental fueron las hojas más jóvenes totalmente expandidas de la planta, una vez colectadas dichas hojas se almacenaron en recipientes hechos con papel aluminio previamente etiquetado.

3.1.2.4 Proceso de las muestras

Una vez tomadas las muestras fueron congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido y transportadas inmediatamente al laboratorio, una parte de las muestras se almacenaron a -80°C en un ultracongelador, y otra parte se liofilizó durante 36 horas a -80°C con una presión de 0.140 mBar, utilizando un liofilizador marca Labconco Freezone. Las hojas liofilizadas se almacenaron a temperatura ambiente en frascos de plástico y se colocaron en bolsas de cierre hermético con sílica gel con indicador de humedad.



Figura 4. Liofilizador marca Labconco Freezone.

3.1.3 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL (AXYPREP MULTISOURCE TOTAL RNA MINIPREP KIT, MARCA AXYGEN).

Posteriormente se realizó la extracción de ARN total de las 32 muestras de hojas tomadas 1 día después de las dos aplicaciones realizadas, utilizando el Kit comercial marca Axygen.

Se tomó tejido de la planta congelado y se maceró con nitrógeno líquido. Se pesaron 100 mg del macerado en un tubo de 2 ml. Se añadieron 400 ul de buffer de RI y la mezcla se pasó por una jeringa de 3 ml para homogenizar. Se transfirió el lisado a un tubo de 1,5 ml. Se añadieron 150 ul de buffer R-II y se agitó durante 15-30 segundos. Se centrifugó a 12,000 × g durante 5 minutos a 4 ° C para sedimentar el ADN y la proteína. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añadieron 250 ul de isopropanol y se mezcló bien con un vórtex.

Se colocó una columna en un tubo de 2 ml. Se transfirió la mezcla del paso anterior en la columna y se centrifugó a 6000 × g durante 1 minuto a temperatura ambiente o 4 ° C. Se desechó el filtrado desde el tubo de 2 ml. Se colocó la columna en el mismo tubo y se añadieron 500 ul de buffer W1A a la columna, se centrifugó a 12.000 x g durante 1 minuto. Se desechó el filtrado y la columna se volvió a colocar en el mismo tubo, se añadieron 700 ul de buffer W2 y se centrifugó a 12.000 x g durante 1 minuto. Se desechó el filtrado y se volvió a lavar la columna con 700 µl de buffer W2. Se desechó el filtrado y se volvió a centrifugar a 12.000 x g durante 1 minuto. Se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml, el ARN total se eluyó al agregar 50 ul de buffer TE en el centro de la columna. Se dejó reposar durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 × g durante 1 minuto. Los 50 ul de ARN se alicuotaron en 3 tubos de 0.2 ml y se almacenaron a -80 en el Ultracongelador.

Para comprobar la calidad del ARN se llevó a cabo una electroforesis desnaturizante horizontal y la cantidad de ARN se midió espectrofotométricamente.

3.1.4 CUANTIFICACIÓN DE ARN

Para cuantificar el ARN se utilizó un espectrofotómetro marca Thermo Scientific con el método para medir ácidos nucleicos, se midió el blanco (agua milli Q) y posteriormente las muestras. Para medir la muestra se agregaron 2 µl de muestra y 198 µl de agua milli Q, y se tomaron los datos de Absorbancia a λ 260, Absorbancia λ 280, y el valor R.

Se realizó una tabla de la siguiente manera:

Cuadro 2. Cuantificación de ARN

Muestra	λ 260	λ 280	R	ug/ml	ug totales (50 ul)
Código de la muestra	Abs	Abs	=A260/A280	=(A260)(100)(50)	=(ug/ml)(0.05)

3.1.5 CALIDAD DEL ARN

Para la determinación de la calidad del ARN se aplicó una electroforesis desnaturizante.

Se requiere previamente tener los valores de cuantificación del ARN para realizar los cálculos de las muestras.

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



Figura 5. Preparación de Agarosa en parilla de calentamiento.

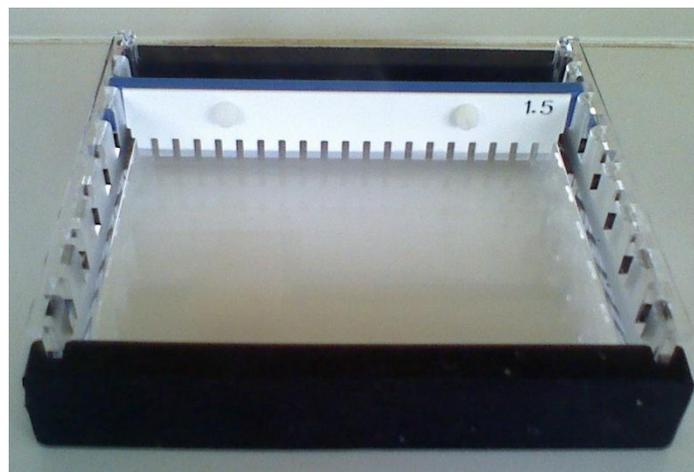


Figura 6. Solución de agarosa en el portagel de la cámara de electroforesis junto con el peine.

En tubos de 0.6 ml se prepararon las muestras (como en la siguiente tabla):

Cuadro 3. Calidad de ARN

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

Ya en cada tubo la muestra, el agua y el buffer loading (buffer de carga) se incubaron a 60°C por 10 minutos, inmediatamente después se pasaron a 4°C para enfriarse.



Figura 7. Termoplaca con tubos eppendorf del segundo muestreo (18-32).

Una vez que el gel se solidificó, se sumergió en la cámara de electroforesis para ARN y se agregó una solución de MOPS 1X a la cámara hasta la marca, posteriormente se quitó con cuidado el peine hacia arriba.

Las muestras se van cargando en los pozos (todo el contenido del tubo), cuidando que no se derramen, al final se anotó el orden de cómo se acomodaron las muestras en el gel. La cámara se conectó a la fuente de poder, y se dejó correr a 70 volts por 1 hora 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se sacó el gel de la cámara con cuidado y se colocó en el transiluminador con fotodocumentador para ver las bandas. Se tomó la foto y se guardó en la computadora del transiluminador y en una memoria USB.

Una vez verificada la calidad del ARN y ajustada la cantidad de ARN para todas las muestras, se realizó la síntesis de cADN por medio de RT-PCR utilizando el Kit comercial.

3.1.6 SÍNTESIS DE C-ADN (KIT IMPROM-II™ REVERSE TRANSCRIPTION SYSTEM MARCA PROMEGA)

3.1.6.1 Primera reacción

Todas las muestras se ajustaron a 2 ug de ARN para la reacción, se aforó a 5 ul con agua DEPC, y se agregó un control negativo con 4 ul de agua DEPC y 1 ul de Random primer para el control negativo y las muestras.

Los tubos se calentaron a 70°C por 5 minutos en una termoplaca, inmediatamente después se pasaron a 4°C por 5 minutos y se centrifugaron por 10 segundos en microfuga.

3.1.6.2 Segunda reacción

Se realizó la siguiente mezcla en un tubo de 2 ml (cantidades para 1 muestra, si son 20 muestras multiplica las cantidades por 21, es decir se agrega 1 muestra más para que no falten reactivos:

Agua libre de nucleasas	5.5 ul
Buffer de reacción 5X	4 ul
MgCl ₂	3 ul
DNTP mix	1 ul
Inhibidor de ribonucleasa	0.5 ul
<u>Transcriptasa reversa</u>	<u>1 ul</u>
TOTAL	15 ul

Se tomaron 15 ul de la mezcla y se agregaron al tubo de la primera reacción.

Los tubos se colocaron en un Termociclador marca Labnet en las siguientes condiciones:

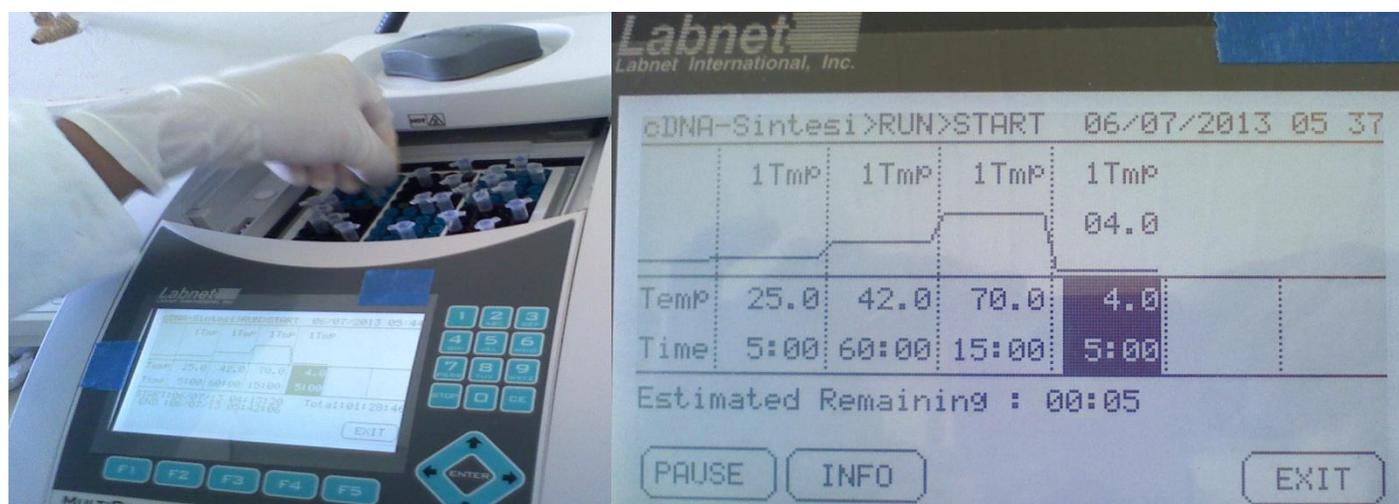


Figura 8. Síntesis de c-DNA en un Termociclador marca Labnet.

25°C por 5 min
42°C por 60 min
70°C por 15 min
4°C HOLD (tiempo de espera)

Una vez terminado el tiempo se guardaron los tubos a -20 °C (congelador).

Una vez sintetizado el cADN, se realizaron PCR de punto final (convencional) con las condiciones óptimas para la amplificación de los genes: auxinas (AUXIAA, GH3 y PIN4), citocininas (A-RR, LOG2 y SICYP735A1) y giberelinas (GID2, GA20ox4 y GA2ox2).

Cabe señalar que para esta etapa es necesario medir la expresión de un control endógeno (la medida de la expresión génica por medio de RT-PCR es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo (gen de Gliceraldehído 3 de *Solanum lycopersicum*) cuya expresión no varía en las condiciones del experimento).

3.1.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Una vez que se sintetizó el cADN se llevó a cabo la PCR con cada par de primers para un gen específico, en total se probaron 9 par de primers correspondientes a los 9 genes a analizar (3 de cada fitohormona), además de incluir un gen endógeno.



Figura 9. Iniciadores forward y reverse en contenedor con hielo molido.

Se realizó el coctel colocando en un tubo de 0.6 ml los siguientes reactivos:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad (para 1 muestra)</i>
Agua destilada desionizada estéril	18 ul
Buffer para PCR 10x	2.5 ul
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 ul
dNTPS (25 mM)	0.2 ul
Iniciador 5'-3' (15 pM)	0.83 ul
Iniciador 3'-5' (15 pM)	2.0 ul
Enzima Taq-Polimerasa (5 U/ml)	0.2 ul
<hr/>	
TOTAL	24 ul



Figura 10. Preparación del coctel.

Se mezclaron los reactivos con la micropipeta, el tubo se depositó en un recipiente con hielo, posteriormente se depositaron 24 ul del coctel en un tubo de 0.2 ul, luego se adicionó 1 ul del cADN de la muestra y se mezclaron con la micropipeta. Los tubos se introdujeron al Termociclador marca Labnet donde las condiciones de PCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C, 30 ciclos (30 segundos a 95°C, 30 segundos de la TM del iniciador, 1 minuto a 72°C) y 10 minutos a 72°C. Una vez terminado el tiempo de corrida las muestras se guardaron a -20°C en el congelador.

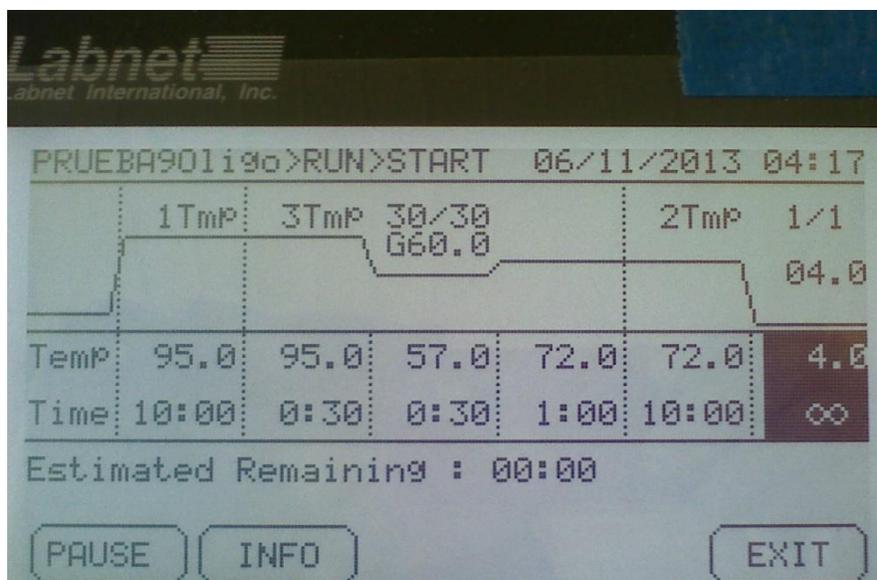


Figura 11. Termociclador marca Labnet corriendo prueba de PCR.

Las secuencias de los iniciadores utilizados para identificar la expresión de los genes se realizaron con las secuencias del ARNm de los genes antes mencionados específicamente para *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana*, para el diseño de los iniciadores se utilizó el Software Primer designing tool (NCBI), donde se obtuvo la secuencia de los iniciadores, el tamaño del amplificado y la temperatura de anillamiento (T_m). Se preparó una solución madre de cada iniciador de 100 pmol/ul y de esta se preparó una solución de trabajo de 15 pmol/ul.

En la siguiente tabla se presentan las secuencias de los iniciadores:

Cuadro 4. Secuencias de los iniciadores utilizados para identificar la expresión de los genes específicamente para *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana*.

FITOHORMONA	GEN	INICIADOR FORWARE	INICIADOR REVERSE	SINTESIS IN SILICO	TM (°C) para PCR	PRODUCTO (pb)
Auxinas	AUXIAA	AGGTTCCAGGTGCATTCGTT	TGGGAGGCTGTCTGAGACATA	Software Primer Blast	58	130
	GH3	AGTCGCAACCAGCAGCTATT	ATGGAACCCGTCCTCACAAAC	Software Primer Blast	60	177
	PIN4	TGGTTCTGTTTCGTTGGTGGAA	CGCCGCAATGAAACGGAAA	Software Primer Blast	57	148
Citocininas	A-RR	ACGGTGCGGTTGATTACCTT	TCTCTCGCCAGTCTCCTCAA	Software Primer Blast	58	137
	LOG2	AGCCGGTAGGATTGCTGAAT	TGCTGTTGGTGCAGATACGAT	Software Primer Blast	58	125
	SICYP735A1	TGGTACCATCAACGCCACAT	TTCGAGTGATCGGAGCAACC	Software Primer Blast	58	108
Giberelinas	GID2	TGAAACACGTCGACGCAAAG	GCAGCCGATGTTAGTCCAGT	Software Primer Blast	58	125
	GA20ox4	ATGTTGGTGGCCTTGAAGTCT	ATTGCTCTGTGCAAGCAACTC	Software Primer Blast	59	139
	GA2ox2	CCGCCATGCTCAGAGATTGA	TCAGGTGGGACAGAGATCCA	Software Primer Blast	60	161

Gen endógeno	G3P	GGAGTCGACCGGTGTTTTCA	GGGAGCAAGGCAATTTGTGG	Software Primer Blast	60	190
--------------	-----	----------------------	----------------------	--------------------------	----	-----

La temperatura óptima de anillamiento (TM) de los iniciadores, se determinó por medio del contenido de ácidos nucleicos, el cual determinó el fabricante de los iniciadores (Macrogen, Corea).

Una vez obtenido el producto de la PCR, se realizó una electroforesis horizontal para verificar la presencia del amplificado de cada gen (banda), y comprobar con un marcador molecular las pares de bases de cada banda.

3.1.8 ELECTROFORESIS HORIZONTAL DE AGAROSA AL 3%

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

3.1.9 ANÁLISIS SEMI-CUANTITATIVO

Para realizar el análisis semi-cuantitativo de expresión de genes, se realizó mediante el análisis por densitometría de imagen utilizando el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) Con este análisis se obtuvieron los datos numéricos de la expresión de los genes objeto, además se pudo llevar a cabo un análisis estadístico (ANOVA) y una comparación de medias (Tuckey) para determinar diferencias significativas de expresión de genes entre tratamientos.

4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras se codificaron del 1 al 32 para su fácil identificación.

Cuadro 5. Codificación de las 32 muestras obtenidas en el primero y segundo muestreo.

PRIMER MUESTREO (24 hrs)		SEGUNDO MUESTREO (24 hrs)	
T1R1 (1)	T3R1 (9)	T1R1 (17)	T3R1 (25)
T1R2 (2)	T3R2 (10)	T1R2 (18)	T3R2 (26)
T1R3 (3)	T3R3 (11)	T1R3 (19)	T3R3 (27)
T1R4 (4)	T3R4 (12)	T1R4 (20)	T3R4 (28)
T2R1 (5)	T4R1 (13)	T2R1 (21)	T4R1 (29)
T2R2 (6)	T4R2 (14)	T2R2 (22)	T4R2 (30)
T2R3 (7)	T4R3 (15)	T2R3 (23)	T4R3 (31)
T2R4 (8)	T4R4 (16)	T2R4 (24)	T4R4 (32)

T1= Plantas tratadas con extracto natural (0.5 ml/L); T2= Plantas tratadas con extracto natural (1 ml/L); T3= Plantas tratadas con extracto natural (2 ml/L); T4= Plantas sin tratamiento (testigo absoluto). R= # de repetición.

4.1.1 CUANTIFICACIÓN DEL ARN

A continuación se presenta la cuantificación de las 32 muestras (Tabla 2), para determinar si tiene una buena cuantificación el ARN, debe de tener al menos 10 ug totales y una R mínima de 1.4, entre más alta sea la R, mayor pureza tiene el ARN.

Cuadro 6. Valores obtenidos en la cuantificación de ARN por espectrofotometría.

Muestra	A260	A280	R	ug/mL	ug Totales
1	0.7	0.304	2.303	3500	175
2	0.459	0.202	2.272	2295	115
3	0.253	0.114	2.219	1265	63
4	0.284	0.126	2.254	1420	71
5	0.094	0.047	2	470	23
6	0.155	0.075	2.067	775	39
7	0.287	0.132	2.174	1435	72
8	0.222	0.105	2.114	1110	55
9	0.075	0.043	1.744	375	19
10	0.577	0.251	2.299	2885	144
11	0.053	0.03	1.767	265	13
12	0.11	0.057	1.93	550	27
13	0.035	0.021	1.667	175	11
14	0.332	0.149	2.22	1660	83
15	0.068	0.037	1.838	340	17
16	0.177	0.084	2.107	885	44
17	0.096	0.046	2.087	480	24
18	0.568	0.304	1.868	2840	142

19	0.143	0.069	2.072	715	36
20	0.428	0.256	1.672	2140	107
21	0.29	0.171	1.696	1450	72
22	0.064	0.033	1.939	320	16
23	0.241	0.159	1.516	1205	60
24	0.369	0.219	1.685	1845	92
25	0.202	0.124	1.629	1010	50
26	0.374	0.214	1.748	1870	93
27	0.514	0.292	1.76	2570	128
28	0.516	0.292	1.767	2580	129
29	0.264	0.145	1.821	1320	66
30	0.063	0.032	1.969	315	16
31	0.733	0.459	1.597	3665	183.25
32	0.268	0.145	1.848	1340	67

4.1.2 CALIDAD DEL ARN

A continuación se muestran las imágenes de los geles de agarosa de una electroforesis desnaturizante (Figuras 12-14), los cuales se utilizaron para ver la calidad del ARN por medio de las bandas. En un ARN de buena calidad deben visualizarse 2 bandas intensas que corresponden a la subunidad mayor del ARN ribosomal (28S) y a la subunidad menor (18S), debajo de estas bandas se verán varias bandas tenues que corresponden al ARN mensajero, al ARN de transferencia así como micro ARN.

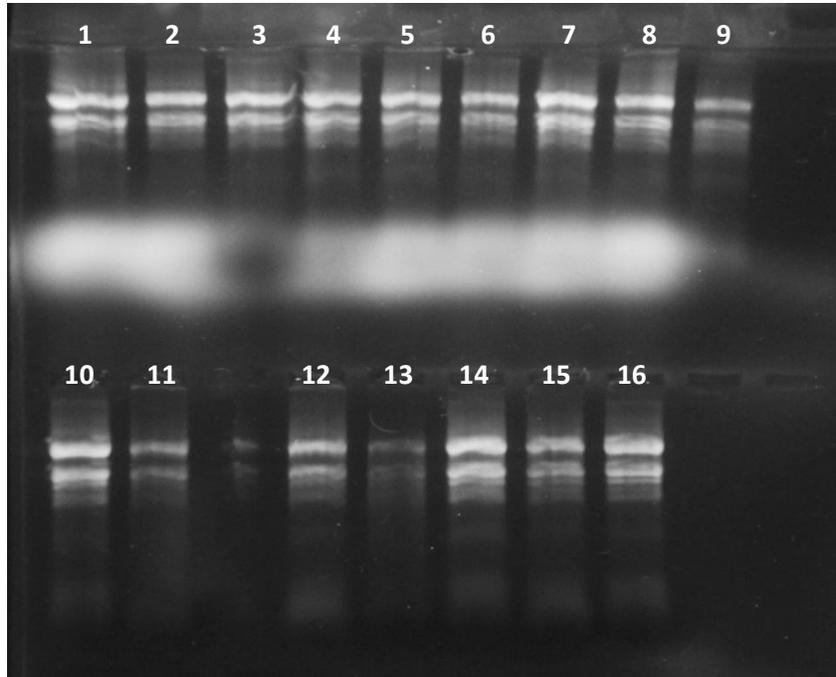


Figura 12. Electroforesis desnaturalizante con gel de agarosa al 1.3%. En los carriles del 1 al 16 se encuentran las muestras correspondientes al primer muestreo (1-16).

En la siguiente figura se presenta la calidad del ARN de las muestras tomadas en el segundo muestreo, cabe mencionar que de esta extracción de ARN solamente se seleccionaron las muestras 17, 19, 22 y 30 por presentar una buena cuantificación y calidad, de las demás muestras se volvió a extraer el ARN.

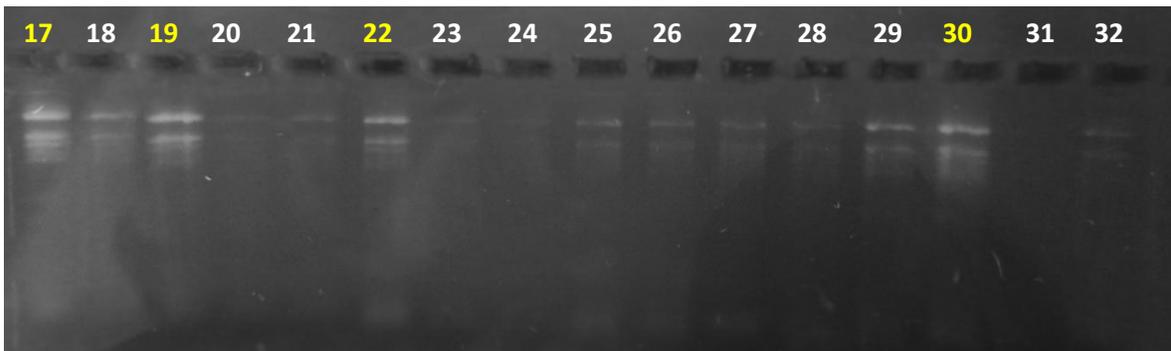


Figura 13. Electroforesis desnaturalizante con gel de agarosa al 1.3%. En los carriles del 17 al 32 se encuentran las muestras correspondientes al segundo muestreo (17-32).

En el segundo intento de extracción de ARN de algunas de las muestras obtenidas en el segundo muestreo, se obtuvo un buen resultado de cuantificación y calidad del ARN, por lo que se consideró apropiado pasar a la siguiente etapa (síntesis de c-ADN).

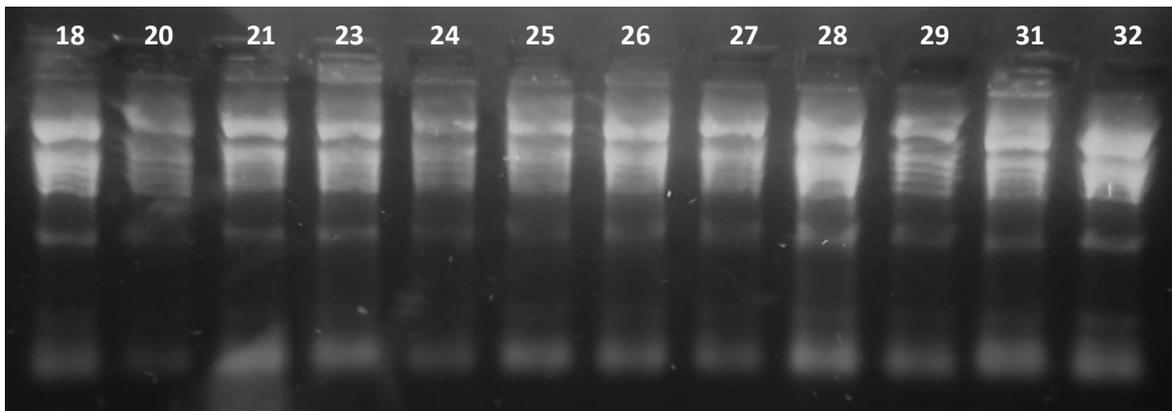


Figura 14. Electroforesis desnaturalizante con gel de agarosa al 1.3%. En los carriles del 18 al 32 se encuentran las muestras correspondientes al primer segundo muestreo (18, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31 y 32).

Una vez teniendo ARN de buena cantidad y calidad, se realizó la síntesis del c-ADN de las 32 muestras, y posteriormente las PCR específicas para cada gen.

4.1.3 EXPRESIÓN DE GENES CUALITATIVA

Como primer paso, se realizó una prueba de selección de los 9 genes, para saber cuántos de ellos amplificaban (se expresaban genéticamente), para esta prueba se seleccionaron dos muestras solamente. Teniendo como resultado una buena amplificación de 4 de los 9 genes que mostraron una banda definida.

Los genes que amplificaron fueron los siguientes: LOG2 (citocininas), SICYP735A1 (citocininas), PIN4 (auxinas) y GA20Ox2 (giberelinas). Cabe mencionar que en la imagen no se aprecia, pero el gen GA20Ox4 (giberelinas) muestra una banda muy tenue. Por lo que se decidió realizar las PCR de estos 4 genes que amplificaron con las 32 muestras, posteriormente se realizó un barrido de temperaturas con el gen que amplifica con una banda tenue para tratar de mejorar la amplificación.

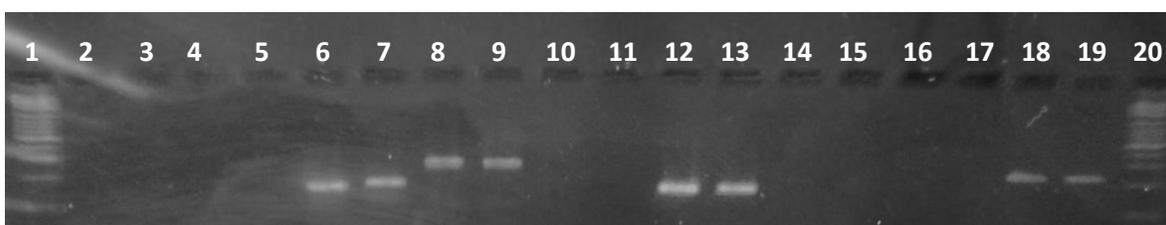


Figura 15. Amplificación de los 9 genes (auxinas, giberelinas y citocininas) analizados en este estudio a diferentes temperaturas de anillamiento según los iniciadores. Carril 1 y 20: Marcador molecular 100pb; carril 2 y 3: gen AXIAA; carril 4 y 5: gen A-RR; carril 6 y 7: gen LOG2; carril 8 y 9: gen SICYP735A1; carril 10 y 11: gen GID2; carril 12 y 13: gen PIN4; carril 14 y 15: gen GA20Ox4; carril 16 y 17: gen GH3 y carril 18 y 19: gen GA20Ox2.

A continuación se presenta la expresión cualitativa de los genes amplificados con las 32 muestras (primer y segundo muestreo).

4.1.3.1 Gen LOG2

El gen LOG2 relacionado con la estimulación por citocininas, se amplificó con una temperatura de anillamiento de 58°C y el tamaño del amplificado fue de 125 pb.

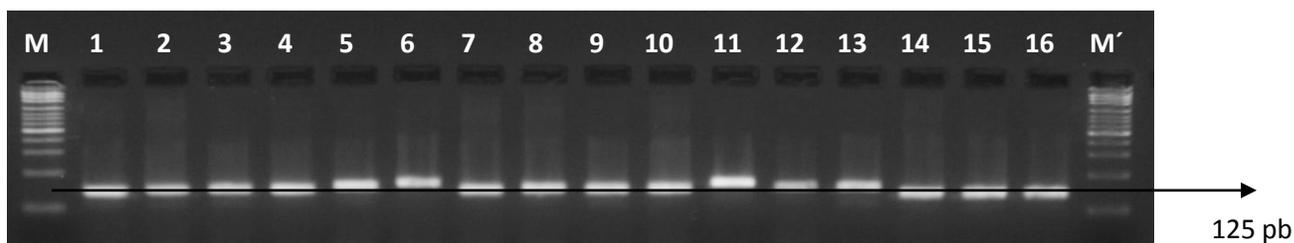


Figura 16. Amplificación del gen LOG2 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 58°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 1-16: muestras correspondientes al primer muestreo (1-16).

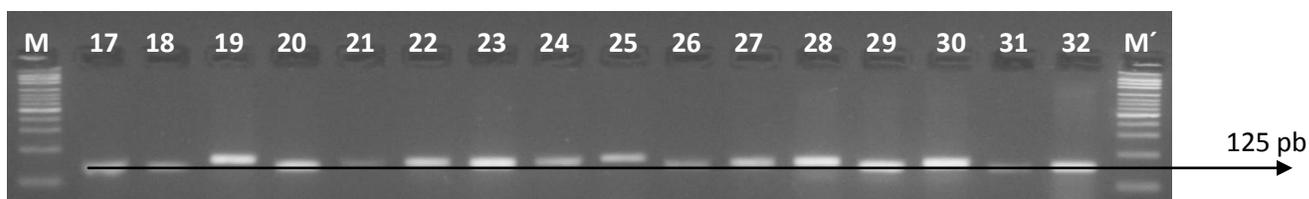


Figura 17. Amplificación del gen LOG2 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 58°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 17-32: muestras correspondientes al segundo muestreo (17-32).

4.1.3.2 Gen SICYP735A1

El gen SICYP735A1 relacionado con la estimulación por citocininas, se amplificó con una temperatura de anillamiento de 58°C y el tamaño del amplificado fue de 108 pb.

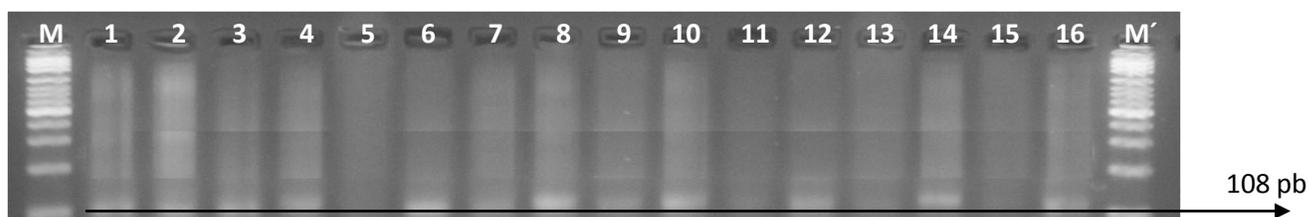


Figura 18. Amplificación del gen SICYP735A1 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 58°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 1-16: muestras correspondientes al primer muestreo (1-16).

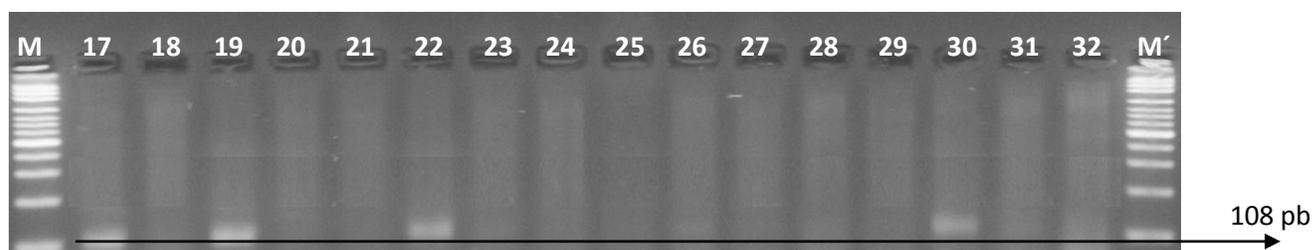


Figura 19. Amplificación del gen SICYP735A1 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 58°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 17-32: muestras correspondientes al segundo muestreo (17-32).

4.1.3.3 Gen PIN4

El gen PIN4 relacionado con la estimulación por auxinas, se amplificó con una temperatura de anillamiento de 57°C y el tamaño del amplificado fue de 148 pb.

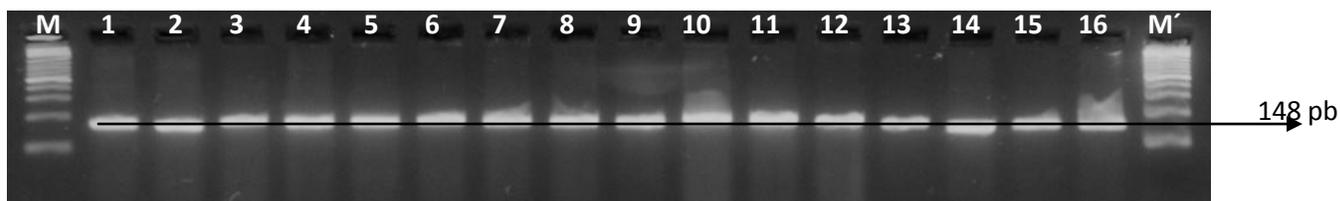


Figura 20. Amplificación del gen PIN4 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 57°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 1-16: muestras correspondientes al primer muestreo (1-16).

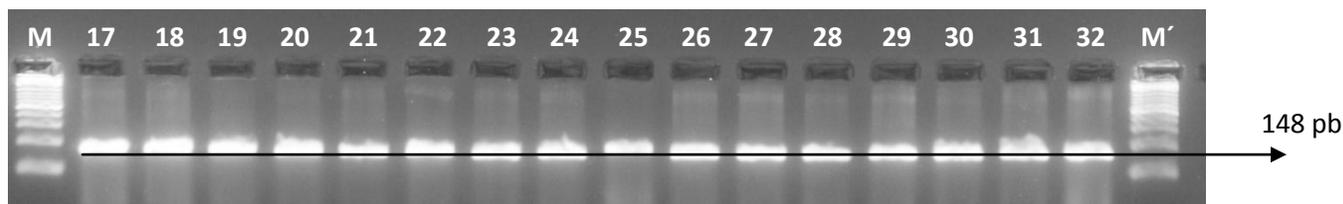


Figura 21. Amplificación del gen PIN4 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 57°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 17-32: muestras correspondientes al segundo muestreo (17-32).

4.1.3.4 Gen GA20OX2

El gen GA20OX2 relacionado con la estimulación por giberelinas, se amplificó con una temperatura de anillamiento de 60°C y el tamaño del amplificado fue de 161 pb.

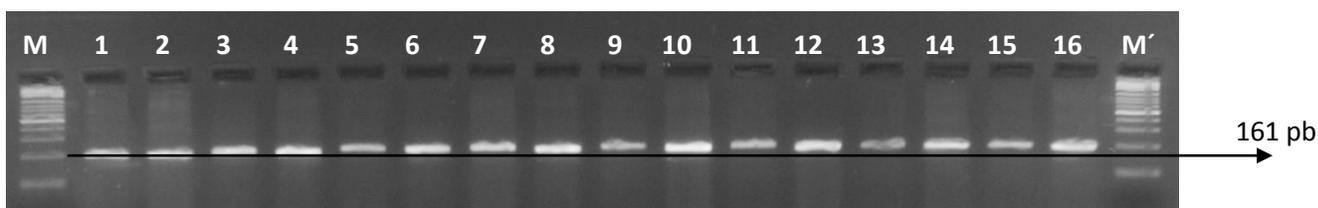


Figura 22. Amplificación del gen GA20OX2 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 60°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 1-16: muestras correspondientes al primer muestreo (1-16).

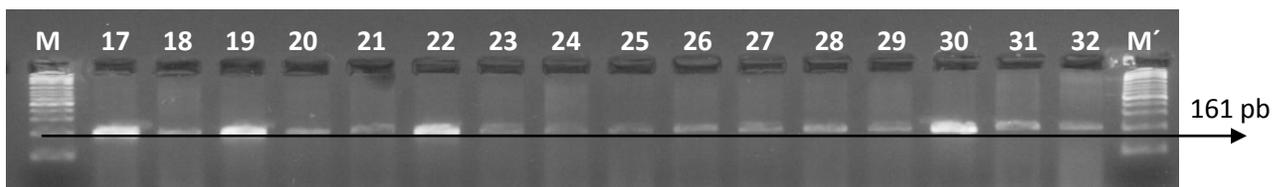


Figura 23. Amplificación del gen GA20OX2 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 60°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 17-32: muestras correspondientes al segundo muestreo (17-32).

4.1.3.5 Gen GA20OX4

Para el gen GA20OX4 relacionado con la estimulación por giberelinas, se trató de mejorar la intensidad de la banda de amplificación haciendo un barrido de temperaturas de 56-61°C, por lo que se obtuvo un mejor amplificado a 57°C, ya que con las demás temperaturas (58-61°C) se observó una banda adicional en aproximadamente 800 pb, lo cual es resultado de no especificidad del iniciador.

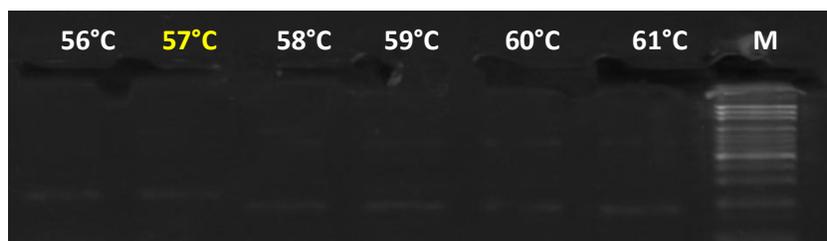


Figura 24. Amplificación del gen GA20OX4 por un barrido de PCR con diferentes temperaturas de anillamiento (56-61°C).

Posteriormente se realizó una amplificación del gen GA20OX4 con las 32 muestras utilizando una temperatura de anillamiento de 57°C con un producto de amplificación de 139 pb.

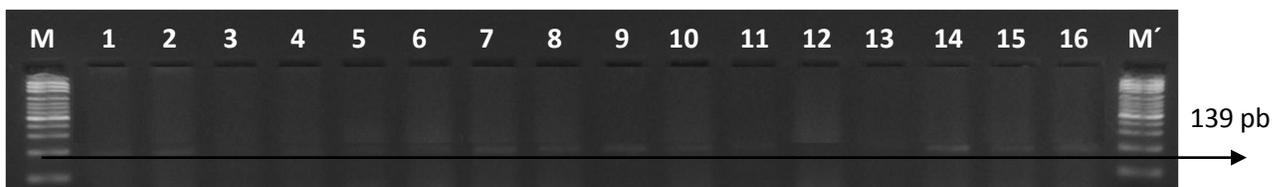


Figura 25. Amplificación del gen GA20OX4 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 57°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 1-16: muestras correspondientes al primer muestreo (1-16).

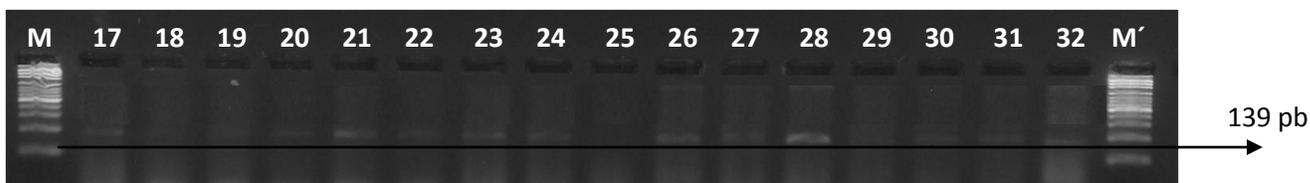


Figura 26. Amplificación del gen GA20OX4 por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 57°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 17-32: muestras correspondientes al segundo muestreo (17-32).

4.1.3.6 Gen endógeno G3f

Como control interno de la RT-PCR se utilizó el gen endógeno Glicerinaldehído 3 fosfato (G3f) específico para *Solanum lycopersicum*, este gen se utiliza como control interno, ya que su expresión no debe variar, o presentar un mínimo de variación aunque haya un cambio en la fisiología de la planta derivado de cambios en el ambiente o estimulados por otro medio.

En RT-PCR con la amplificación de éste gen endógeno comprobamos que no hubo un mal ajuste de la concentración de ARN para la síntesis de cADN, ya que si no hay un buen ajuste de la concentración de ARN por consecuencia se tendría una expresión diferencial entre tratamiento provocado por este error en la cuantificación.

El gen G3f está implicado en la vía de la glucólisis, la glicerinaldehído 3 fosfato es una enzima implicada en una de las reacciones más importantes de la glucólisis ruta de Embden-Meyerhof, puesto que cataliza un paso en el cual se genera el primer intermediario de elevada energía, y, además, genera un par de equivalentes de reducción (en forma de NADH).

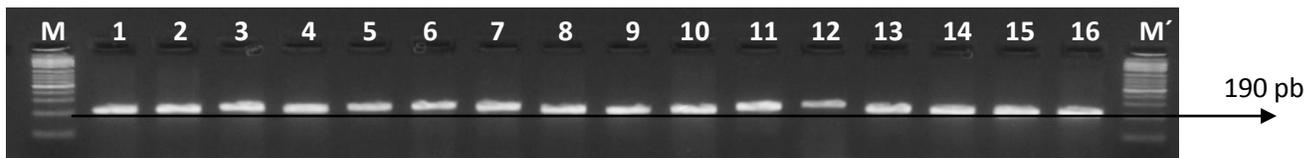


Figura 27. Amplificación del gen G3f por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 60°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 1-16: muestras correspondientes al primer muestreo (1-16).

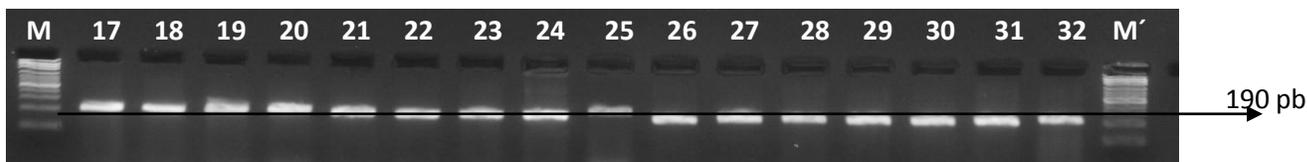


Figura 28. Amplificación del gen G3f por PCR de las muestras obtenidas en el primer muestreo a una temperatura de anillamiento de 60°C. Carriles M y M': Marcador molecular 100pb; carriles 17-32: muestras correspondientes al segundo muestreo (17-32).

4.1.4 EXPRESIÓN DE GENES SEMI-CUANTITATIVA

Para medir la expresión de dichos genes de forma semi-cuantitativa, utilizamos el Software ImageJ versión 1.47, creado por el National Institutes of Health (USA), de dominio público y soportado por Java 1.6.0_20. En este Software se analizó el área y el % de densidad de las bandas de cada gen, posteriormente se calculó la densidad relativa y la densidad ajustada con el gen endógeno.

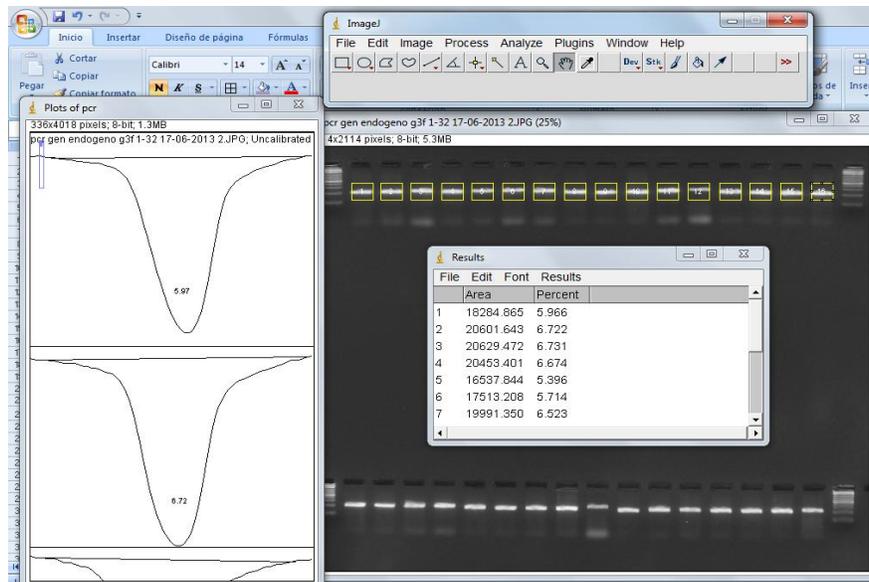


Figura 29. Imagen del Software ImageJ versión 1.47.

4.1.4.1 Gen LOG2

Se obtuvo una mayor expresión tanto en el primer como segundo muestreo a la concentración de 1 ml/L del producto de base natural.

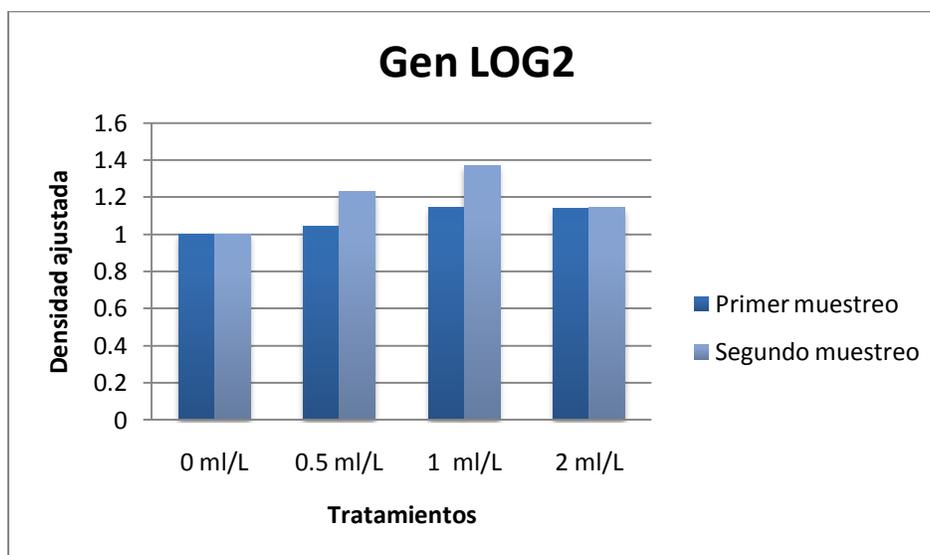


Figura 30. Análisis de expresión semi-cuantitativo del gen LOG2 con el Software ImageJ.

4.1.4.2 Gen SICYP735A1

Presentó una mayor expresión tanto en el primer como segundo muestreo con la concentración de 0.5 ml/L del producto de base natural.

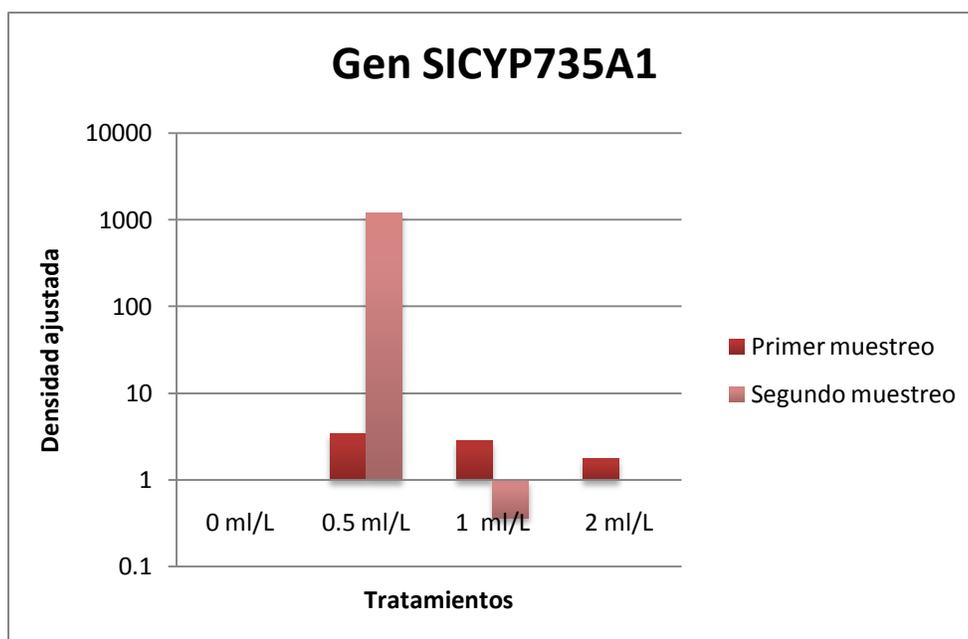


Figura 31. Análisis de expresión semi-cuantitativo del gen SICYP735A12 con el Software ImageJ.

4.1.4.3 Gen PIN4

Presentó una mayor expresión tanto en el primer como segundo muestreo con la concentración de 2 ml/L del producto de base natural.

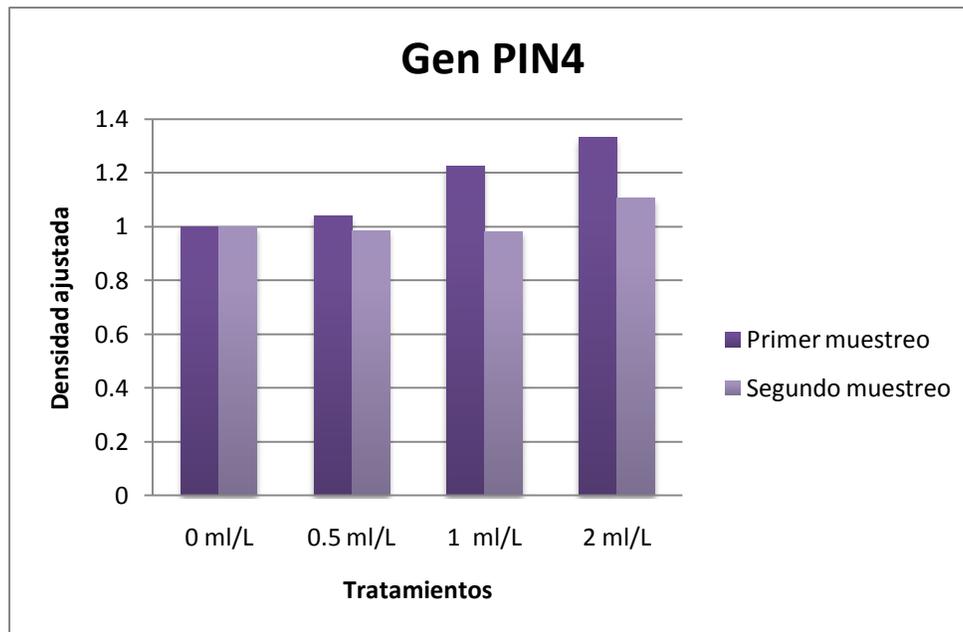


Figura 32. Análisis de expresión semi-cuantitativo del gen PIN4 con el Software ImageJ.

4.1.4.4 Gen GA20OX2

Presentó una mayor expresión en el primer muestreo a la concentración de 2 ml/L del producto de base natural, y en segundo muestreo a la concentración de 0.5 ml/L del producto de base natural.

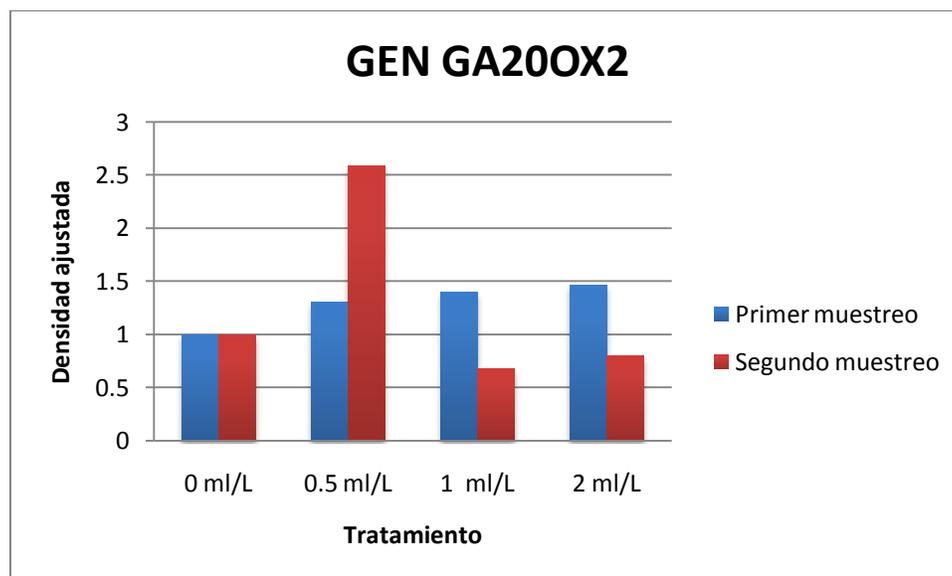


Figura 33. Análisis de expresión semi-cuantitativo del gen GA20OX2 con el Software ImageJ.

4.1.4.5 Gen GA20OX4

Presentó una mayor expresión tanto en el primer como segundo muestreo con la concentración de 1 ml/L del producto de base natural.

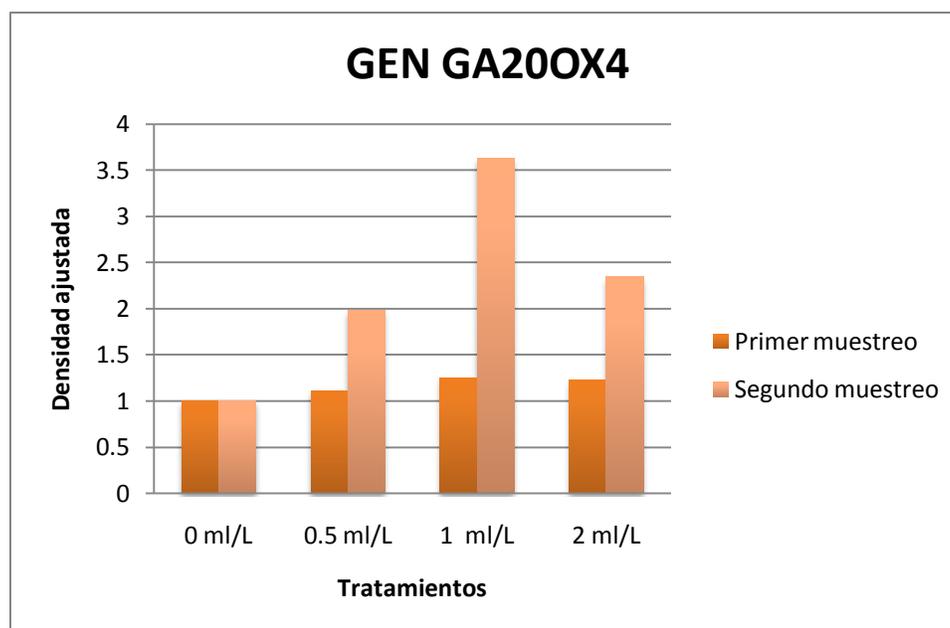


Figura 34. Análisis de expresión semi-cuantitativo del gen GA20OX4 con el Software ImageJ.

En general, se puede observar que los genes SICYP735A1 y GA20OX2 a una concentración de 0.5 ml/L del producto de base natural presentaron el mayor incremento con respecto al Testigo absoluto (0 ml/L Biozyme TF) con un aumento de 1.6 veces para el gen GA20OX2, y un aumento de 1,204 veces para el gen SICYP735A12 ambos en el segundo muestreo, siendo éste último gen el que más aumento presentó de todos los genes.

La expresión de gen SICYP735A1 generalmente es baja antes de la antesis y posteriormente aumenta bruscamente, por lo que puede estar relacionado con la inducción de la frecuencia de la división celular, de la cual se tiene evidencia que es el proceso que determina el tamaño y el peso del fruto final (Cheniclet *et al*, 2005).

Esto concuerda con lo que cita Bohneret *et al*, 1988. El nivel de citocininas es regulada hasta cinco días después de la antesis, en un momento en que la división celular es activa, lo que sugiere que hay una correlación positiva entre la citocininas y la división celular.

El gen GA20OX4 presentó un aumento de 2.6 veces respecto al Testigo absoluto (0 ml/L del producto de base natural) a la concentración de 1 ml/L del producto de base natural de igual manera en el segundo muestreo. Lo que indica que las giberelinas son esencial para el desarrollo de toda la planta, y también para la fructificación (Bensen y Zeevaart 1990).

Respecto a los demás genes, el gen LOG2 presentó un aumento de 0.4 veces respecto al Testigo absoluto a la concentración de 1 ml/L del producto de base natural en el segundo muestreo. Este gen está relacionado a la hormona citocinina.

El gen PIN 4 presentó un aumento de 0.3 veces respecto al Testigo absoluto a la concentración de 2 ml/L del producto de base natural en el segundo muestreo. Que es provocado por la hormona auxina.

5.1 CONCLUSIONES

- Se logró amplificar la expresión de 5 genes, dos relacionados al estímulo por citocininas (genes LOG2 y SICYP735A1), uno por auxinas (gen PIN4) y dos por giberelinas (genes GA20OX2 y GA20OX4).
- El de mayor expresión fue el gen SICYP735A1 con un aumento de 1,204 veces respecto al testigo absoluto, este incremento fue provocado por 2 aplicaciones del producto de base natural a una dosis de 0.5 ml/L (antes y después de anthesis).
- El gen GA20OX2 presentó un aumento de 1.6 veces respecto al testigo absoluto a una dosis de 0.5 ml/L del producto de base natural durante el segundo muestreo.
- El gen GA20OX4 presentó un aumento de 2.6 veces respecto al testigo absoluto a la concentración de 1 ml/L del producto de base natural de igual manera en el segundo muestreo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ariizumi, T., Shinozaki, Y., & Ezura, H. (2013). Genes that influence yield in tomato. *Breeding science*, 63(1), 3.
2. Brandstatter I, Kieber JJ (1998) Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1009–1020.
3. Chamarro, J. 1995. Anatomía y Fisiología de la Planta. En: Nuez F (ed). El cultivo del tomate. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, Barcelona, México, pp. 44-91.
4. Cheniclet, C., W.Y. Rong, M. Causse, N. Frangne, L. Bolling, J.P. Carde and J.P. Renaudin (2005) Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiol.* 139: 1984–1994.
5. Cruz B. L. 2007. Calidad de semilla de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) por efecto de potenciales osmóticos, calcio y podas bajo condiciones de invernadero. Colegio de Posgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. De México.
6. Diez *et al.* “Catálogo de semillas de tomate”. 1ra edición. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, 1996.
7. Esquinas-Alcazar J. y F. V Nuez. 2001. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. In: El Cultivo del Tomate. F. Nuez. Mundi prensa. España pp. 13-42.

8. Finkelstein R., Reeves W., Ariizumi T., and Steber C. (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 387–415.
9. Fooland M.R. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*. 2007: 1-52.
10. Foley KP, Leonard Mw, Engel JD. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends Genet* 1993; 9:380-5.
11. Galván Luna J.J., et al., 2009. Amarre, rendimiento y calidad del fruto en naranja con aplicación de un complejo hormonal. *Agricultura técnica en México*. 35(3):339-345.
12. Gillaspay G, Ben-David H, Gruissem W. 1993. Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* 5: 1439-1451.
13. Greyson, R. I.; Sawhney, V .K. (1972). Initiation and early growth of flower organs *Nigella* and *Lycopersicon*: insights from allometry. *Bot. Gaz.*, 133: 184-190.
14. Harberd NP, Belfield E, Yasumura Y (2009) The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an “inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* 21: 1328–1339.
15. Hedden, P. (1999) Recent advances in gibberellins biosynthesis. *J Exp Bot.* 50: 553-563.

- 16.** Hernandez. C.J.L. 1999. Aplicación de biorreguladores bajo el sistema de hidroponía en el cultivo del tomate. Tesis de Licenciatura. UAAAN Buenavista, Saltillo, Coahuila México, 57 p.
- 17.** Hilhorst, H.W.M., Groot S.P.C and Bino RJ. 1998. The tomato seeds as a model system to study seed development and germination. *Acta Botanica Neerlandica* 47. 169-183.
- 18.** HOWELL SH, LALL S & P CHE. 2003. Cytokinins and shoot development. *Trends Plant Science* 8: 453-459.
- 19.** Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Kiba T, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T (1999) Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol* 40:733–742.
- 20.** Kiba T, Taniguchi M, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T (1999) Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 40:767–771.
- 21.** Linnaeus C. (1753). *Species Plantarum*. Holmiae. Stockholm, Sweden, 1st edition.
- 22.** Matsuo, S., Kikuchi, K., Fukuda, M., Honda, I., & Imanishi, S. (2012). Roles and regulation of cytokinins in tomato fruit development. *Journal of experimental botany*, 63(15), 5569-5579.
- 23.** Miller P. (1754). *The Gardeners Dictionary*. John and Francis Rivington. London, UK, 4th edition.

24. Mullis, K.B. 1993. Conferencia con motivo de la recepción del Premio Nobel.
- Nassu, A., Pollari, E., Helmecky, K., Stewart, S. y Kofalvi, S.A 2000. Improved RNA extraction one tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *J. Virol. Methods.* 09: 37-49.
25. Nieto A. R. y Velasco H. E. “Cultivo de Jitomate en Hidroponía e Invernadero”. 2da edición. Departamento de Fitotecnia Universidad Autónoma de Chapingo. México, 2006.
26. Ofosu-Anim J., Blay E. T., Bening L. 2007. Effect of Biozyme TF on yield and quality of tomato. *Ghana Jnl agric. Sci.* 40: 113-117.
27. Paponov, I.A., Teale, W.D., Trebar, M., Blilou, I. and Palme, K. (2005) The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci.* 10, 170–177.
28. Pérez, M.C. 1996. Efecto de fuentes de Citocininas y Giberelinas en el crecimiento y desarrollo del tomate (*Lycopersicum esculatum* Mill). Tesis de Licenciatura. UAAAN Buenavista, Saltillo, Coahuila México, 39 p.
29. Petra´ s´ek, J. and Friml, J. (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* 136, 2675–2688.
30. Pharis, R.P., King, R.W (1985) Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 517-568.
31. Phillips, A. L., Ward, D.A., Uknes, S., Appleford, N.E.J., Lange, T., Huttly, A.K., Gaskin, P., Graebe, J.E., Hedden, P. (1995) Isolation and expression of three

- gibberellins 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 108: 1049-1057.
- 32.** Saiki RK, Gelfand DH. Introducing Ampli Taq DNA polymerase. *Amplifications* 1989;1:4-6.
- 33.** Serrani J.C., Sanjuán R., Ruiz-Rivero O., Fos M., and García-Martínez J.L. (2007) Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiol.* 145: 246–257.
- 34.** Srivastava, A. and Handa, A.K. (2005) Hormonal Regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *J. Plant Growth Reg.* 24, 67–82.
- 35.** Bidwell, R.G.S. 1993. *Fisiología Vegetal*. Editorial AGT. Primera edición. México DF. 789 p.
- 36.** Talon, M. (2000) Giberelinas. En: *Fundamentos de fisiología vegetal*. Azcón-Bieto, J. y Talon, M. Ed. Interamericana McGraw Hill. Ed. U. de Barcelona. Pp 325-341.
- 37.** Taniguchi M, Kiba T, Sakakibara H, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T (1998) Expression of Arabidopsis response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS Lett* 429:259–262.
- 38.** Thimann KV. 1977. *Hormone action in the whole life of plants*. Amherst: University of Massachusetts Press.

39. Vanneste, S. and Friml, J. (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136, 1005–1016.
40. Weaver, J. 1990. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Traducido del inglés por Agustín Contin. Editorial Trillas, México. Pp. 358-400.
41. Weisz, P., 1980. La Ciencia de la Biología. 5ª. Edición. Editorial Omega, S. A. Pp. 385-387.
42. Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmölling T. 2003. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell* 15, 2532–2550.
43. Westwood, M.N., Fruticultura de Zonas Templadas. Mundiprensa, Madrid, España. P. 314-321.

Páginas web consultadas

1. Protocolo para extracción de ARN total con el Kit comercial marca Axygen:
http://static0.jadedpixel.com/s/files/1/0001/7488/files/axyprep_multisource_protocol.pdf
2. Protocolo para la síntesis de cADN con el Kit Improm II de marca Promega:
<http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/improm-ii%20reverse%20transcription%20system%20protocol.pdf?la=en>
3. Gen
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002371.htm>