



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL  
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC) – DOCTORADO EN  
CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO MOLECULAR DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA DE  
ALMACENAMIENTO PRE-SIEMBRA EN EL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DE  
AJO (*Allium sativum* L.) CV. 'COREANO'**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias de los Alimentos**

Presenta:

**M. en C. Teresita Guevara Figueroa**

Dirigido por:

**Dr. Edmundo Mercado Silva**

C. U. Santiago de Querétaro, Qro. Mayo 2015



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

ESTUDIO MOLECULAR DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO  
PRE-SIEMBRA EN EL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DE AJO (*Allium sativum* L.) CV.  
'COREANO'

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M. en C. Teresita Guevara Figueroa

Dirigido por:

Dr. Edmundo Mercado Silva

SINODALES

Dr. Edmundo Mercado Silva  
Presidente

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Secretario


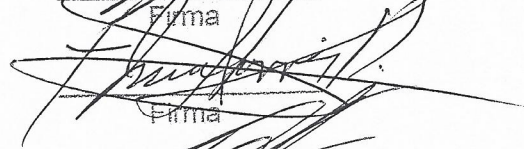
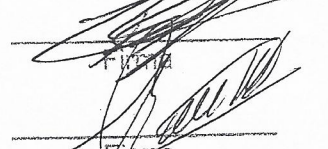
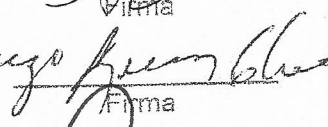
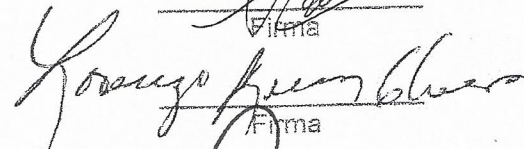
Dr. Ramón Guevara González  
Vocal

Dr. Ramón A. Martínez Peniche  
Suplente

Dr. Lorenzo Guevara Olivera  
Suplente

  
M.S.P. Sergio Pacheco  
Hernández

Director de la Facultad de Química

  
Firma  
  
Firma  
  
Firma  
  
Firma  
  
Firma

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia  
Loarca Piña

Directora de Investigación y  
Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Mayo 2015  
México

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro bajo la dirección y tutoría del Dr. Edmundo Mercado Silva; en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Ingeniería Bioquímica del Instituto Tecnológico de Celaya bajo la supervisión del Dr. Lorenzo Guevara Olvera; en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería de la UAQ bajo la tutela del Dr. Ramón G. Guevara González y en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica bajo la supervisión del Dr. Sergio Casas Flores.

## RESUMEN

El ajo es una planta anual que se propaga de forma agámica. La parte más importante comercialmente es el bulbo, cuya calidad está definida por su tamaño, firmeza, color, forma regular, número de dientes, ausencia de rebrotes y defectos. Estos parámetros están correlacionados con factores ambientales como la luz y la temperatura; por lo tanto para un buen desarrollo del bulbo, se requiere una apropiada secuencia de temperaturas y fotoperiodos durante el ciclo de cultivo. Diversos autores recomiendan refrigerar la 'semilla' antes de la siembra para obtener un producto de buena calidad. El Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de frutas y hortalizas de la UAQ; ha determinado que el almacenamiento de la "semilla" de ajo 'Coreano' a 5°C durante 5 ó 6 semanas adelanta la cosecha hasta 60 días, asegurando una completa formación de bulbos. Se ha observado sobre-expresión de genes relacionados con el metabolismo de fructanos y fenilpropanoides, y se ha indicado un aumento en la producción de fenoles y antocianinas. El objetivo de este trabajo fue generar un perfil transcriptómico que permita dilucidar el efecto que ejerce la baja temperatura de almacenamiento antes de la siembra, en la expresión de genes involucrados en el desarrollo de los bulbos de ajo. Para ello, después de tres semanas de almacenamiento a 5 °C (5C) y temperatura ambiente (TA) se tomaron muestras de brotes de los dientes semilla para realizar una hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH), obteniéndose 32 y 62 secuencias expresadas (EST, expressed sequence tag) para 5 °C y TA respectivamente. La comparación en bases de datos indicó una homología con 18 genes que codifican para las siguientes proteínas: proteína hipotética *SORBIDRAFT*, sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST), proteína putativa regulada por el frío (PCRFP), proteína de regulación de la floración *FRIGIDA*, cisteína sintasa (*CSGCS3*), transportador de azúcar (*ST*) y *NADH* deshidrogenasa subunidad 4. Para conocer el nivel de expresión de estos genes durante las cinco semanas de almacenamiento y durante el desarrollo del cultivo se realizaron RT-PCRs para cada EST. Los resultados indicaron una mayor expresión de *SORBIDRAFT*, *1-SST*, *CSGCS3*, *PAL* y *NADH* durante el almacenamiento a 5 °C. Por el número de transcritos obtenidos con homología con *SORBIDRAFT* y la importancia de la *1-SST* en la síntesis de fructanos y *PAL* en la ruta de los fenilpropanoides, se realizó una PCR cuantitativa (qPCR), confirmando la diferencia de expresión de esos genes. Un estudio de secuenciación masiva (RNA-seq) de los brotes del diente 'semilla' en la semana cinco de almacenamiento, generó 483,128 transcritos para ambas condiciones de almacenamiento, de los cuales, 7,033 se expresaron diferencialmente; 49.14 % de ellos se sobre expresaron y 50.86 % fueron reprimidos en la condición de 5 °C.

Palabras clave: ajo, factores ambientales abióticos, crecimiento de cultivo, hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión, transcriptoma de ajo.

## SUMMARY

Garlic is a biennial plant that spreads so agamic. Its most important part is the bulb, whose quality is defined by its size, firmness, color, regular, number of teeth, lack of volunteers and defects. These parameters are correlated with environmental factors such as light and temperature. A proper bulb development requires an appropriate sequence of temperatures and photoperiods during the growing season; some authors recommend refrigerating the 'seed' before planting to obtain a good quality product. The Laboratory of Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruit and Vegetables in the UAQ; has determined that the storage of the "seed" garlic 'Korean' to 5 ° C for 5 or 6 weeks ahead the harvest up to 60 days, ensuring better bulb formation. It has been observed overexpression of genes related to fructan and phenylpropanoids metabolism, and indicated an increase in the production of phenols and anthocyanins. The aim of this work was generate a transcriptome allowing elucidate the effect that low temperature storage before planting, in the expression of genes involved in the development of garlic bulbs. For this, after three weeks storage at 5 ° C [5C] and room temperature [RT] clove "seed" samples were taken for hybridization under conditions of suppression subtractive (SSH) to yield 32 and 62 expressed sequence (EST, expressed sequence tag) to 5 ° C and RT respectively. The comparison database indicated homology with 18 genes which encode the following proteins: 0057s002150 *SORBIDRAFT*\_ hypothetical protein, sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST), putative cold-regulated protein (PCRP), flowering regulation protein *FRIGIDA*, cysteine synthase *GCS3*, sugar transporter (ST), and NADH dehydrogenase subunit 4. To determine the level of expression of these genes during the five weeks of storage under both temperature conditions, oligonucleotides were designed from the sequences of the genes selected, and RT-PCRs were performed for each EST. The results indicated increased expression of *SORBIDRAFT*, *1-SST*, *CSGCS3*, *PAL* and *NADH dehydrogenase 4* on 5C than RT. Due the importance of the numbers of ESTs with homology to *SORBIDRAFT*, *1-SST* participation on fructan biosynthesis, and *PAL* on phenylpropanoids pathway, a RT-qPCR was performed, confirming the different expressed genes aforementioned. A massive sequencing analysis (RNA-seq) was realized to the buds at the fifth week of storing, generating 483,128 contigs for both storage conditions, of which, 7,033 were differential expressed: 49.14 % of them were overexpressed and 50.86% underexpressed at 5 °C.

Keywords: garlic, abiotic environmental factors, crop growth, subtractive hybridization under conditions of suppression, garlic transcriptome

## DEDICATORIAS

Para

SFGG

JLGR

LFO

JGR

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la vida y por los pequeños mensajes de que no estoy sola.

Agradezco a mi mamá por su siempre presencia y por aguantarme todas las veces que la interrumpía para contarle mis aflicciones.

Agradezco a mi familia Guevara Rangel y Figueroa Gracián por todo su apoyo, sus muestras de cariño y sus consejos.

Agradezco al Dr. Edmundo M. Mercado Silva la oportunidad de trabajar bajo su dirección; aprendí una nueva forma en la que funciona un laboratorio, la cual amplió mi visión de lo que ya había experimentado.

Agradezco al Dr. Irineo Torres Pacheco todos sus consejos, sus enseñanzas, la clase de escritura científica y su aporte a este proyecto.

Doy gracias al Dr. Martínez Peniche por su constante ánimo, buenos deseos y sus atinados comentarios para que este proyecto mejorara.

Infinitas gracias al Dr. Lorenzo Guevara Olvera por la invitación a su laboratorio a aprender Biología Molecular, gracias a esto conocí una disciplina que no sabía qué me iba a gustar tanto.

Los consejos, la admisión en su laboratorio y toda la ayuda recibida del Dr. Ramón G. Guevara González son de las cosas que más me llevo guardadas en la mente y el corazón, no tengo cómo agradecerle sus atenciones, su tiempo, su disponibilidad y su positivismo.

Agradezco todas las facilidades otorgadas y el apoyo del Dr. Sergio Casas Flores y su equipo (Nicolás, Angélica, Mayté, Magnolia, Óscar, Macario, Ángel) para la realización de la qPCR.

A mis amigas Carolina Elizabeth, Conchita, Eli, Fátima, Gabriela, Miriam, Nora, Norma, Rubria y Vicky; que aunque distantes siempre cercanas. ¡¡¡Gracias por todas las porras!!!

Alezita, Ana Celia, Ana Laura, Ana Luisa, Ángela, Angélica, Blanca, Carlos, Carolina, Cecy, Claudia, Diego, Dr. Pichardo, Dulce, Fanny, Francisco, Gabriel, Germán, Gina, Gisela, Harry, Humberto, Isaac, Ismael, Jann, Jimena, Kari, Laura, Lina, Luis, Lupita, Marcelo, Marianita, Marisa, May May, Neli, Néstor, Paty, Paulina D., Paulina M., Paulina P., Paz, Pepe, Perla, Quintero, Rebeca, Ricardo, Rossana, Selene:

Cuando un nadador(a) se para en el banco de salida para competir, él o ella es el arquitect@ de su destino. El momento de la verdad es revelado una vez que suena la pistola de salida, un momento en el cual el atleta está completamente aislad@ de cualquier ayuda externa, basándose únicamente en su fuerza, intelecto y deseo. Ahí no hay entrenadores que acorten la distancia, ni padres que compongan egos adoloridos, y tampoco compañeros de equipo que compensen la falta de esfuerzo. La distancia es constante, el tiempo absoluto... Nadie más puede nadar la carrera... Desde la perspectiva del rendimiento, la natación es un deporte “*individual*”. De forma similar, durante el entrenamiento nadie más puede dar una brazada por el individuo. El dolor es solamente de él o ella para aceptar y dominar. **Sin embargo, el deporte de la natación, ha adoptado un ambiente de entrenamiento que está basado en una estructura de EQUIPO – un conjunto de atletas y entrenadores trabajando en conjunto para optimizar los rendimientos individuales. En consecuencia, lo que culmina como el esfuerzo de un solo atleta, EMPIEZA con el esfuerzo de MUCHOS** (Skip Kenney).

¡Gracias por hacerme sentir un ser humano valioso!

A mis senséis: Carlos Israel Nieves Serrano, José A. Guzmán, Ángela Chapa Oliver y Laura Mejía Teniente, gracias por tanta paciencia, sus consejos, su ayuda y sobre todo su amistad.

¡Gracias Ale Nuñez por tus consejos y palabras de aliento!

¡Mil gracias a la Sra. Margarita González C. y a Lupita por 4 años de amistad, cariño y hospedaje!



## ÍNDICE

Contenido	Página
RESUMEN	iv
SUMMARY	v
DEDICATORIAS	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	4
2.1 Generalidades	4
2.1.1 Origen y distribución	4
2.1.2 Clasificación taxonómica	4
2.1.3 Morfología	5
2.1.3.1 Bulbo	6
2.1.3.2 Bulbillo o “diente”	7
2.2 Desarrollo del cultivo	8
2.3 Efecto de la temperatura en el desarrollo del cultivo	10
2.4 Metabolismo de compuestos asociados a la bulbificación	15
2.4.1 Carbohidratos	15
2.4.1.1 Sacarosa	16
2.4.1.2 Fructanos	17
2.4.1.2.1 Biosíntesis y clasificación	19
2.4.1.2.2 Estudios del efecto de la temperatura de almacenamiento en los cambios del contenido de fructanos	23
2.5 Las técnicas de biología molecular como herramientas en el estudio de los efectos de ambiente en el desarrollo de la planta	27
2.5.1 Análisis moleculares en ajo	30
III. JUSTIFICACIÓN	32

Contenido	Página
IV. HIPÓTESIS	33
V. OBJETIVOS	34
5.1 Objetivo general	34
5.2 Objetivos específicos	34
VI. METODOLOGÍA	35
6.1 Estudio en condiciones de cultivo a temperatura semi controlada y en condiciones de campo	35
6.1.1 Experimento en condiciones semi controladas de temperatura	37
6.1.2 Experimento en campo	37
6.2 Análisis molecular de las muestras	39
6.2.1 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)	39
6.2.2 Análisis del nivel de expresión	41
6.2.2.1 RT-PCR	41
6.2.2.2 RT-qPCR	42
6.2.3 Análisis del transcriptoma mediante secuenciación masiva (RNA-seq)	47
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
7.1 Estudio del crecimiento del cultivo en campo y bajo condiciones de temperatura semi controlada	49
7.2 Análisis de expresión genética durante el almacenamiento	60
7.2.1 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)	60
7.2.1.1 Extracción de ARN	60
7.2.1.2 Síntesis de ADNc	61
7.2.1.3 Hibridación sustractiva (SSH)	62
7.2.2 Obtención de transcritos diferencialmente expresados	62
7.2.3 Análisis del nivel de expresión durante el almacenamiento	71

Contenido	Página
7.2.3.1 RT-PCR	71
7.2.3.1.1 Síntesis de ADNc	71
7.2.3.1.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa	72
7.2.3.1.2.1 Análisis de expresión de genes durante el almacenamiento	72
7.2.3.1.2.2 Análisis de expresión de genes durante el desarrollo del cultivo	75
7.2.3.2 Análisis del nivel de expresión por RT-qPCR	77
7.2.3.2.1 Extracción de ARN	77
7.2.3.2.2 Síntesis de ADNc	78
7.2.3.2.3 Análisis de PCR en tiempo real	80
7.2.4 Comparación y correlación de los datos de expresión genética con el contenido de carbohidratos	85
7.2.4.1 Cambios en el contenido de carbohidratos simples y fructooligosacáridos (FOS)	88
7.2.4.2 Cambio en el perfil de fructanos durante el desarrollo del cultivo	91
7.2.5 Análisis del transcriptoma mediante secuenciación masiva (RNA-seq)	94
VIII. CONCLUSIONES	122
IX. REFERENCIAS	124
X. ANEXOS	138
Anexo A. Extracción de ARN	138
Anexo B. Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión	140
Anexo C. Purificación productos de PCR	149
Anexo D. Ligación al vector pGem TEasy	150
Anexo E. Transformación de células competentes	151
Anexo F. Transformación de células electrocompetentes	152
Anexo G. Extracción ADN plasmídico	153

Contenido	Página
Anexo H. Digestión con enzima de restricción Eco R1	154
Anexo I. Extracción de ADN plasmídico	155
Anexo J. Síntesis de ADNc primera cadena	157
Anexo K. Análisis RT-qPCR	158
Anexo L. Determinación de las mezclas de reacción para 1-SST, SORBIDRAFT, PAL y el de referencia 18S	159
Anexo M. Extracción de ARN para análisis RNA-seq	162

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
2.1	Clasificación taxonómica del ajo	5
2.2	Técnicas de análisis para el estudio de expresión diferencial de genes	29
6.1	Descripción de los tratamientos aplicados	36
6.2	Estaciones climatológicas del Estado de Aguascalientes	38
6.3	Muestras utilizadas	41
6.4	Mezcla de reacción RT-PCR	42
6.5	Muestras utilizadas para RT-qPCR	45
6.6	Ejemplo de llenado de las placas para el análisis de RT-qPCR (por gen)	46
7.1	Muestreos y días transcurridos después de la siembra	49
7.2	Valor de probabilidad. Condiciones de cultivo con temperatura semi-controlada	51
7.3	Valor de probabilidad. Condiciones campo	52
7.4	Duración del ciclo de cultivo	52
7.5	Comparación de medias de las variables de crecimiento durante el desarrollo del ciclo de cultivo bajo condiciones semi controladas de temperatura	53
7.6	Comparación de medias de las variables de crecimiento durante el desarrollo del ciclo de cultivo bajo condiciones de campo	53
7.7	Acumulación de horas frío	60
7.8	Homología de EST's expresados en la condición de almacenamiento a 5 °C	65
7.9	Homología de EST's expresados en la condición de almacenamiento a TA	66
7.10	Secuencias de clonas utilizadas para del diseño de oligonucleótidos	68

Cuadro		Página
7.11	Oligonucleótidos diseñados	70
7.12	Cuantificación de ADNc para muestras de brotes durante el almacenamiento	72
7.13	Cuantificación de ADN para muestras de diferentes órganos obtenidos durante el desarrollo del cultivo	72
7.14	Cuantificación de ADNc para RT-qPCR	79
7.15	Contenido de fructanos en diferentes periodos y tejido de plantas de ajo generadas de dientes 'semilla' almacenadas a TA o 5 °C durante 5 semanas	87
7.16	Proteínas asociadas a los transcritos sobreexpresados diferencialmente	98
7.17	Proteínas asociadas a los transcritos reprimidos diferencialmente	113
L.1	Matriz de mezclas de reacción	137

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Escapo floral con bulbillos	6
2.2	Bulbo y dientes de ajo	6
2.3	Bulbillo de ajo en brotación	7
2.4	Etapas ecofisiológicas de ajo	8
2.5	Planta de ajo en brotación	9
2.6	Respuesta molecular de las plantas al estrés por frío	11
2.7	Estructura de 1-kestosa	21
2.8	Estructura 6-kestosa	21
2.9	Mezcla de levanos y series de inulina	22
2.10	Biosíntesis de fructanos en plantas	23
2.11	Dogma centra de la Biología Molecular	28
6.1	Obtención del brote del diente 'semilla'	39
6.2	Programa de RT-PCR	42
7.1	Desarrollo de las plantas en Querétaro	50
7.2	Comparación visual del desarrollo del cultivo en condiciones de campo	50
7.3	Fase final del desarrollo de cultivo para plantas procedentes de cultivo en condiciones semicontroladas y de cielo abierto	51
7.4	Número de hojas	55
7.5	Ancho de hojas	55
7.6	Altura de la planta	56
7.7	Diámetro del cuello	56
7.8	Diámetro del bulbo	56
7.9	Índice de bulbificación	57
7.10	Peso de la planta	58
7.11	Escapo floral y defectos en el ajo	59
7.12	Acumulación de horas frío	59
7.13	Extracción de ARN	61

Figura	Página
7.14 ADN complementario	61
7.15 Resultado SSH	62
7.16 Células transformadas; extracción de ADN plasmídico; confirmación de la presencia del inserto en las clonas	63
7.17 Clasificación de los fragmentos expresados diferencialmente (EST's) según su función	63
7.18 Extracción de ARN de brotes de ajo durante el almacenamiento pre-siembra	71
7.19 Extracción de ARN de tejido vegetal durante el desarrollo del cultivo	71
7.20 Heatmap del nivel de expresión durante el almacenamiento de los dientes "semilla" a TA y 5 °C	72
7.21 Heatmap del nivel de expresión durante el desarrollo del cultivo para los diferentes órganos	76
7.22 Extracción de ARN para RT-qPCR	78
7.23 RT-qPCR del gen <i>SORBIDRAFT</i> durante el almacenamiento del "diente" semilla	80
7.24 RT-qPCR del gen <i>SORBIDRAFT</i> en diferentes órganos de la planta a los 132 DDS	81
7.25 RT-qPCR del gen <i>1-SST</i> durante el almacenamiento del "diente" Semilla	82
7.26 RT-qPCR del gen <i>1-SST</i> a 132 DDS	83
7.27 RT-qPCR del gen <i>PAL</i> en brotes de dientes "semilla" durante el almacenamiento a dos condiciones de temperatura	84
7.28 RT-qPCR par la expresión del gen <i>PAL</i> a 132 DDS	85
7.29 Contenido de carbohidratos simples y fructooligosacáridos de bajo peso molecular durante el desarrollo del cultivo	89
7.30 Contenido de fructanos de alto peso molecular durante el desarrollo del cultivo	92



Figura		Página
7.31	Clasificación transcritos expresados diferencialmente – Componente celular	96
7.32	Clasificación transcritos expresados diferencialmente – Función molecular	97
L.1	Placas para RT-qPCR	162

## I. INTRODUCCIÓN

La producción nacional de ajo en 2013 fue de 59 014.84 toneladas generadas en una superficie de 5 468 hectáreas, con un rendimiento promedio de 11.11 ton ha<sup>-1</sup> y un valor de la producción de 768 568.38 millones de pesos que señaló un precio medio rural de 13.02 pesos kg<sup>-1</sup>; siendo Zacatecas (26 832.35 ton), Guanajuato (8 248.40 ton), Sonora (4 695.20 ton), Baja California (4 460.04 ton) y Aguascalientes (3,522.00 ton) los principales estados productores que aportaron el 81 % de la producción nacional. Los precios medios rurales por kilogramo de producto para cada estado fueron de 7.7 pesos para Zacatecas, 13.9 pesos para Guanajuato, 16.4 pesos para Sonora, 34.63 pesos para Baja California y 15.34 pesos para Aguascalientes (SIAP, 2015). Para el Estado de Aguascalientes durante los 2008-2013 se observó un descenso en la producción (6 674.4 – 3 522 ton), aunque el valor de la esta ha tenido altas y bajas, su tendencia hasta el 2013 fue a la alza.

Los meses de Febrero y Marzo son los de menor oferta y mayor precio del producto lo cual constituye un elemento importante para intentar producir ajo en esas fechas. Además de la demanda del producto, la calidad de los bulbos es un factor importante que determina su precio, y dicha calidad está definida por el color, tamaño y firmeza del bulbo; forma regular, dientes grandes, sin rebrotes y sin defectos; el obtener productos con tales atributos está en estrecha relación con las condiciones ambientales de cada región productora.

Se sabe que para tener un adecuado desarrollo del bulbo se requiere una secuencia de temperaturas y fotoperiodos que deben darse durante el ciclo de cultivo. Estos requerimientos pueden ser distintos para diferentes variedades o tipos de ajo que se cultiven en una zona, observándose que cuando los requerimientos de frío no se satisfacen adecuadamente, el desarrollo de los bulbos presenta problemas de diferenciación y mala calidad (Portela, 1996).

La producción de ajo del Estado de Aguascalientes, concretamente en el municipio de Cosío, incluye un ciclo que inicia con la siembra en los meses de Septiembre y Octubre y cosecha en el mes de Mayo. Se ha observado que durante

el periodo de desarrollo de la planta, las bajas temperaturas de los meses de diciembre, enero y febrero proporcionan el requerimiento de frío que el cultivo necesita (junto con fotoperiodos cortos que evitará el desarrollo de rebrotes), para que en el mes de abril se presente una adecuada formación del bulbo propiciada por fotoperiodos largos y altas temperaturas. Durante varias temporadas, el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la Universidad Autónoma de Querétaro, en colaboración con empresas y asociaciones de productores de ajo del Estado de Aguascalientes, ha desarrollado trabajos de investigación referentes a la mejora del cultivo de ajo (*Allium sativum* L.) cv 'Coreano' de la región Cosío – Rincón de Romos Aguascalientes. Particularmente durante las seis últimas temporadas y mediante experimentos en campo, se ha logrado adelantar la fecha de cosecha hasta 60 días mediante la manipulación de la temperatura de almacenamiento de los dientes "semilla". Aunque los rendimientos son menores, el precio del producto compensa con utilidades comerciales la producción de este producto y sobre todo con una menor producción de bulbos con defectos.

Por lo anterior, hay un gran interés por entender el mecanismo por el que los factores del medio ambiente interaccionan con el desarrollo de este cultivo. Brewster (1994); así como Ledesma *et al.*, (1997); Takagi (1990) y Takagi y Qu (1995) han mostrado evidencias de la importancia de las bajas temperaturas y la extensión del fotoperiodo para que este cultivo genere bulbos de buena calidad.

Ledesma *et al.* (1997), establecieron que en el desarrollo ontogénico del ajo, consta de dos etapas; en la primera llamada inductiva, las bajas temperaturas y fotoperiodos cortos son condiciones importantes para favorecer la diferenciación de las yemas axilares, las cuales permitirán la formación de dientes y crecimiento del bulbo; la segunda denominada morfogénica, requiere de temperaturas más altas y fotoperiodos largos, lo que favorece la fotosíntesis, el traslado de fotosintatos y el llenado de los dientes o formación del bulbo.

En otros reportes se ha descrito la importancia de las bajas temperaturas de almacenamiento de los dientes "semilla" en la formación de los bulbos, indicando que

la formación de bulbos y su rendimiento fue mejor cuando se almacenaron a 4 °C durante 30 y 45 días previo a la siembra (Bandara *et al.*, 1999; Takagi y Qu, 1995).

Los estudios realizados en el laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la UAQ han permitido establecer que el almacenamiento de los bulbos “semilla” antes de la siembra a 5°C hasta por 5 ó 6 semanas, asegura una menor formación de bulbos no diferenciados en ajo cv ‘Coreano’, reduciéndose la extensión del ciclo de cultivo (Zavala-Gutiérrez, 2011; López-Hernández, 2010).

Los resultados obtenidos, señalaron que las bajas temperaturas de almacenamiento antes de la siembra y durante las primeras etapas de desarrollo de la planta, generan un patrón de expresión de genes que inducen variaciones en la diferenciación de las yemas axilares de las hojas lo cual provoca un cambio en el patrón de crecimiento del bulbo.

Esta tesis doctoral presenta información de los cambios que se presentan en el transcriptoma durante el almacenamiento de los dientes semilla y durante el ciclo de desarrollo de plantas de ajo cv ‘Coreano’ generadas a partir de dientes “semilla” almacenados a bajas temperaturas en comparación con el transcriptoma generado por dientes semilla almacenados a temperatura ambiente. Estos cambios se correlacionan con los patrones de crecimiento del cultivo, así como con los cambios en la producción y acumulación de fructanos durante el desarrollo de las plantas generadas por ambos tratamientos de almacenamiento. Con esta información y en conjunto con lo obtenido mediante secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-seq), se discuten posibles mecanismos que pudieran estar ocurriendo en la fisiología de la planta de ajo bajo esas condiciones.

## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1 Generalidades.

El ajo es la especie más importante del género *Allium* después de la cebolla. Es una hortaliza altamente apreciada y utilizada en gastronomía y medicina (Nurwantoro et al., 2015; Suleira et al., 2015; Jangam y Badole, 2014; Shouk et al, 2014; Yun et al., 2014; Singh et al., 2001).

#### 2.1.1 Origen y distribución

El centro de origen de esta hortaliza no está completamente establecido; diversas fuentes indican que procede de Asia Central, mientras que otros autores sugieren que el área del Mediterráneo es un segundo centro de origen (Cavagnaro y Galmarini, 2007).

La diseminación del ajo a través del mundo se llevó a cabo en diferentes épocas de la historia humana. De las montañas del oeste de China fue llevado a las montañas del este, después hacia Turquía y el Cáucaso; de ahí hacia la India, Egipto y la zona del Mediterráneo y a través de las tribus del sur llegó al sur de Europa. También de la zona de Cáucaso fue introducido en Rusia, Ucrania y Europa del Este (Cavagnaro y Galmarini, 2007).

En América Latina fue introducido a finales del siglo XV en el segundo viaje de Cristóbal Colón al Nuevo Mundo y reintroducido en las varias expediciones de España e Italia (Jaramillo, 1994).

#### 2.1.2 Clasificación taxonómica

El ajo es una especie diploide que en 1754 Carlos Linneo le dio el nombre científico de *Allium sativum*, sin embargo su taxonomía es un tema de debate. Inicialmente fue ubicado en la familia Liliaceae pero hace 50 años se incluyó en la familia Amaryllidaceae basándose en la estructura de su inflorescencia (Hanelt, 1990), (Cuadro 2.1).

**Cuadro 2.1** Clasificación taxonómica del ajo

Súper-reino	<i>Eukariota</i>
Reino	<i>Plantae</i>
Sub-reino	<i>Viriplantae</i> (plantas verdes)
Infra-reino	<i>Streptophyta</i> (plantas terrestres)
Súper-división	<i>Embryophyta</i>
División	<i>Tracheophyta</i> (plantas vasculares)
Sub-división	<i>Spermatophytina</i> (espermatofitas, plantas con semilla, fanerógamas)
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Súper orden	<i>Liliane</i> (monocotiledóneas)
Orden	<i>Asparagales</i>
Familia	<i>Amaryllidaceae</i>
Tribu	<i>Allieae</i>
Género	<i>Allium</i> L.
Especie	<i>A. sativum</i>

ITIS, 2015; NCBI, 2015; Heredia-García y Delgadillo-Sánchez, 2000

### 2.1.3 Morfología

El ajo es una planta perene, sus hojas son planas y delgadas; tiene una altura de más de 70 cm y raíces adventicias superficiales. El bulbo, de piel blanca o de color según la variedad, está compuesto por un tallo discoidal, hojas escamosas, delgadas y secas, las cuales son la base de las hojas aéreas o funcionales y de bulbillos también llamados 'dientes' que se forman de yemas axilares de las hojas más jóvenes. Las hojas funcionales son aplanadas de 3 cm o menos de ancho, plegadas en forma longitudinal, de no menos de 8 en número, las cuales llevan a cabo la fotosíntesis (Mann, 1952).

En algunas variedades es poco frecuente que se produzcan flores; sin embargo, cuando está presente el escapo floral, este constituye la parte final del tallo que soporta la inflorescencia, redondo, sólido y ligeramente enrollado en el cual se forman pequeños bulbillos en la base (Figura 2.1; Jangam y Badole, 2014).

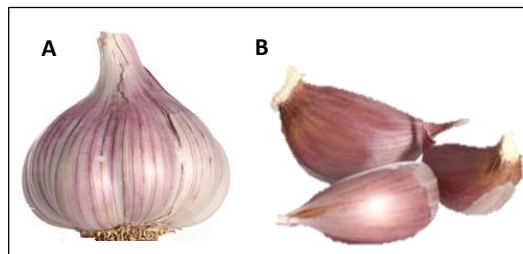


**Figura 2.1** Escapo floral con bulbillos

#### 2.1.3.1 Bulbo

El bulbo es un órgano de reserva y puede contener de 8 a 12 dientes los cuales conforman el material vegetativo para las siguientes siembras. Algunas variedades de esta planta no producen semilla, por lo que la propagación del cultivo se realiza a través de los bulbillos, a esta forma de reproducción asexual se le llama *agámica* (Warade y Shinde, 1998; Portela, 1996).

El bulbo está formado por un conjunto de capas, las exteriores consisten en una serie de hojas escamosas-membranosas (10 a 12) que cubren a todos los dientes y estos están cubiertos por 2 hojas de protección o túnicas (Figura 2.2).



**Figura 2.2** Bulbo y dientes de ajo. **A.** Bulbo completo cubierto de hojas escamosas-membranosas. **B.** Dientes del bulbo cubiertos por su hoja de protección.

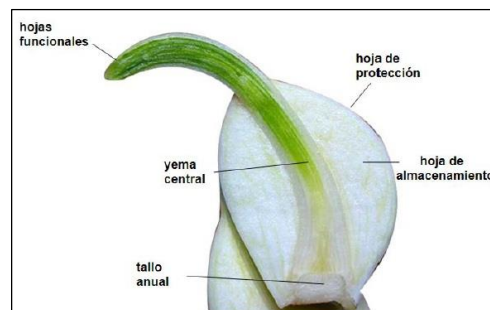
### 2.1.3.2 Bulbillo o “diente”

Los bulbillos simples, “dientes” o yemas se originan en la axila de las hojas fértiles o dentadas y están apoyados sobre el tallo anual o disco basal. Por su estructura, los bulbillos o dientes son órganos de propagación de esta planta, pues son yemas vegetativas en estado de letargo pero que activan su crecimiento para generar una nueva planta bajo determinadas condiciones ambientales (Utrilla-Vázquez, 2008).

Anatómicamente, el diente consiste en una serie de hojas, las cuales tienen funciones específicas. A través de un corte transversal, se identifican cuatro hojas (Figura 2.3).

La más externa, llamada *túnica* es una hoja protectora lignificada (hp) que durante la manipulación protege al bulbillito, su función es proteger al diente de la pérdida de humedad, del ataque de insectos y patógenos (Mujica y Pérez de Camacaro, 2006). La hoja de almacenamiento (ha) constituye la mayor parte del bulbillito debido a que en ella se almacenan gran cantidad de los carbohidratos de reserva, llamados fructanos.

La hoja de brotación (hb) o yema central, situada en el interior de la hoja de almacenamiento, es una envoltura que encierra a los ápices de las hojas funcionales, los cuales cubren el meristemo apical. En la brotación, las hojas funcionales se elongan y emergen por el poro en el ápice de la hoja de almacenamiento, luego emerge la primera hoja funcional (hf) a través del poro cerca de la hoja de brotación.

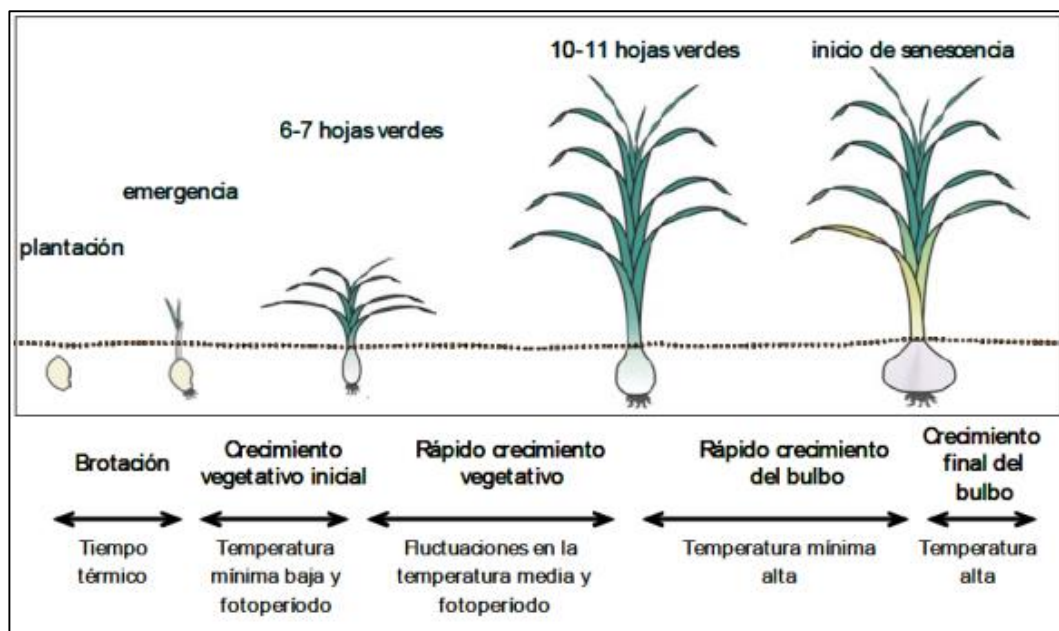


**Figura 2.3** Bulbillo de ajo en brotación (López-Hernández, 2010)



## 2.2 Desarrollo del cultivo

En 2005, Portela y Cavagnaro señalaron que el ciclo de cultivo del ajo está integrado por 5 etapas; brotación, crecimiento vegetativo inicial, crecimiento vegetativo rápido, crecimiento del bulbo y diferenciación de los dientes (Figura 2.4):



**Figura 2.4** Etapas ecofisiológicas de ajo

1. **BROTACIÓN:** Se inicia con la siembra de los bulbillos o dientes ‘semilla’ y termina con la emergencia de la hoja de brotación (Figura 2.5). La duración de esta etapa puede variar de acuerdo a las condiciones de almacenamiento de los dientes “semilla” y de las condiciones de temperatura después del periodo de siembra, la disponibilidad de agua y de la variedad. En general, esta primera etapa ocurre entre los 20 y 30 días después de la siembra (DDS) cuando emergen entre el 90-95% de las plantas sembradas (Portela y Cavagnaro, 2005; Ledesma *et al.*, 1997).

2. **CRECIMIENTO VEGETATIVO INICIAL:** En esta etapa hay un crecimiento de las primeras hojas y se distingue por el consumo de material de reserva del diente semilla y la poca acumulación de materia seca, mientras que las hojas se expanden a expensas de los fructanos localizados en la hoja de reserva: los cuales son movilizados desde la hoja de reserva hacia la planta en crecimiento.

La duración de esta etapa está influenciada por las temperaturas mínimas del sitio de cultivo durante el invierno y del fotoperiodo al inicio de la primavera. Si las temperaturas mínimas son bajas y constantes, la finalización de la etapa puede anticiparse.



**Figura 2.5** Planta de ajo en brotación

3. **CRECIMIENTO VEGETATIVO RÁPIDO:** Este se caracteriza por la actividad con la que la parte aérea de la planta crece y, está acompañado por fotoperiodos largos y temperaturas altas. La extensión de esta fase depende de la longitud del día y las temperaturas medias diarias. En esta etapa se lleva a cabo el inicio del desarrollo de las yemas laterales, la cual se considera como la primera fase de la diferenciación del bulbo y termina con el inicio de la formación del bulbo (Burba, 2007).

4. **CRECIMIENTO RÁPIDO DEL BULBO:** Es en esta etapa se caracteriza por el acelerado incremento en el diámetro del bulbo o “llenado”; esto está influenciado por las temperaturas máximas, la cuales controlan este periodo.

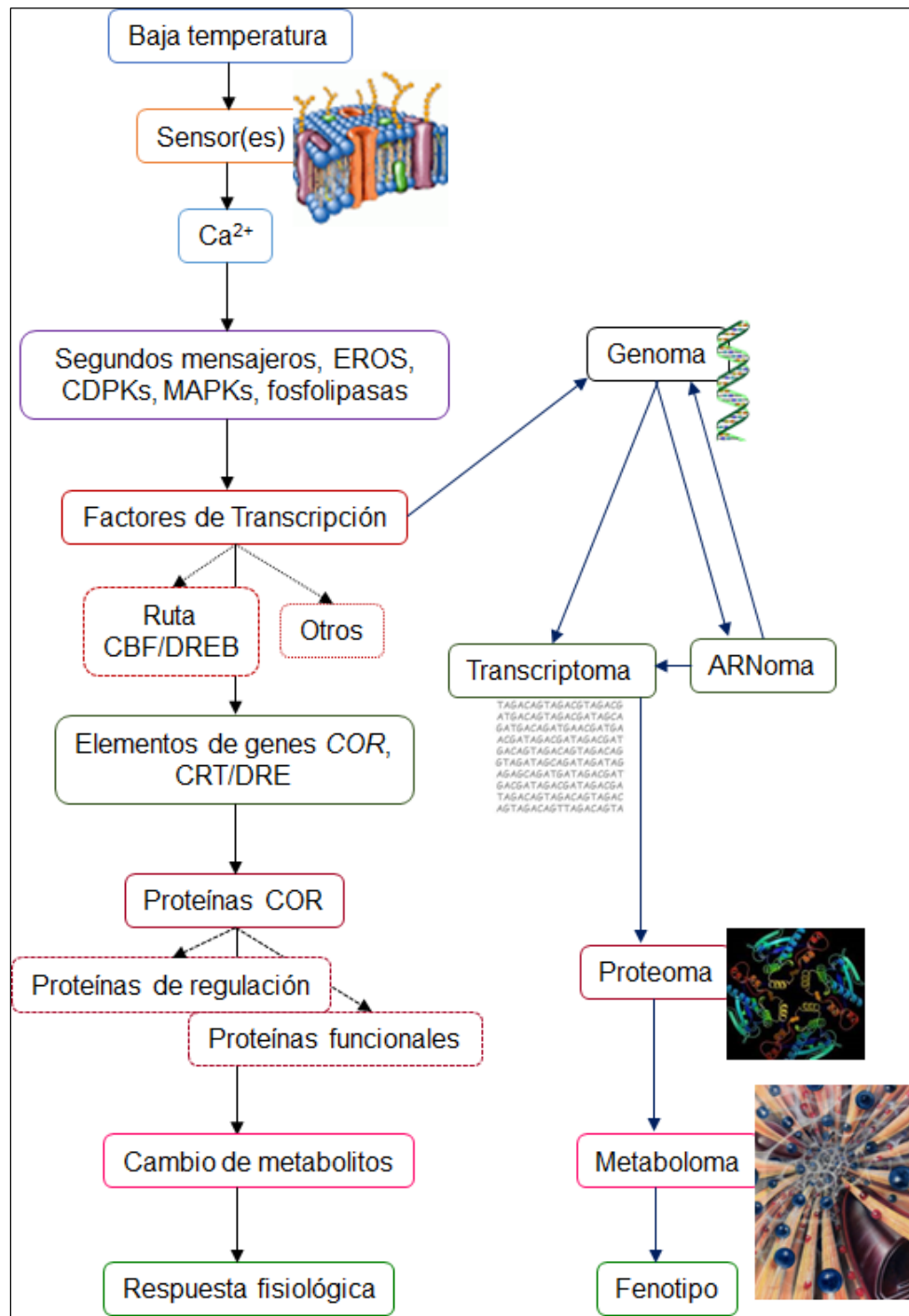
5. **CRECIMIENTO FINAL DEL BULBO:** En este periodo, se presenta la diferenciación de los dientes y la planta se acerca a su etapa de dormancia, por lo que el “llenado” del bulbo disminuye y se inicia la senescencia. Esta etapa termina con la muerte de la parte aérea de la planta.. La duración de esta etapa depende de las temperaturas mínimas diarias; usualmente, no se deja que esta etapa termine en

el campo, se recomienda cosechar los bulbos cuando las hojas de las plantas aún mantienen actividad biológica aunque se encuentran en su etapa senescente.

### 2.3 Efecto de la temperatura en el desarrollo del cultivo

La temperatura es un factor ambiental cíclico de amplia variabilidad; en consecuencia, los organismos deben de poseer un sistema de adaptación a las condiciones ambientales a las que están expuestos (Portela, 1996). Cuando dichas condiciones abarcan periodos de bajas temperaturas por arriba de 0 °C, las plantas resistentes al frío desarrollan una capacidad de incrementar la tolerancia a estas temperaturas a través de respuestas multifacéticas (Browse y Xin, 2001). A esta capacidad se le denomina *aclimatación al frío*, la cual consiste en un proceso complejo que involucra cambios en la expresión genética, de enzimas relacionadas con el metabolismo – vías biosintéticas de proteínas, aminoácidos y carbohidratos solubles – y la morfología, que se reflejan en amplias respuestas de los transcritos y metabolitos. Tales respuestas son mediadas por una o varias vías de señalización sometidas a una estricta regulación (Catalá *et al.*, 2012; Janská *et al.*, 2010; Yadav, 2010; Kaplan *et al.*, 2007; Sitt y Hurry, 2002). Adicionalmente, el contenido de azúcares se altera, infiriendo que existe una correlación alta entre los niveles de azúcar y la tolerancia a las temperaturas bajas (Catalá *et al.*, 2012).

Los cambios que se han observado al exponer plantas a temperaturas bajas incluyen alteración del estado de fluidez de la membrana celular a causa de cambios en la composición de los ácidos grasos presentes, aumento o disminución de proteínas involucradas en la fijación del dióxido de carbono y en la reparación y protección de membrana; así como la acción del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en la intervención de segundos mensajeros y la consecuente participación de factores de transcripción que provocarán la expresión de genes regulados por el frío (*COR*) y sus proteínas codificantes, *COR* (Figura 2.6).



**Figura 2.6** Respuesta molecular de las plantas al estrés por frío, realizada como cambios en el transcriptoma, proteoma, metaboloma y fenotipo.

Modificado de Janská et al., 2010.

EROS, especies reactivas de oxígeno; CDPKs, cinasas dependientes de calcio; MAPKs, cinasas activadas por mitógeno; CBF/DREB, factores de unión al extremo C-repetido; COR, regulados por el frío; CRT/DRE, elementos de respuesta a la deshidratación independiente de ABA

Cuando plantas de *Arabidopsis thaliana* cuya temperatura de crecimiento (20 °C) fue interrumpida al término de 3 semanas con un choque frío a 4 °C por 1, 4, 12, 24, 48 y 96 horas; se observó que a través de los 4 días que duró la aclimatación al frío, tanto los niveles de expresión del transcriptoma como los patrones de metabolitos detectados tuvieron cambios dinámicos expresados como aumentos o disminuciones durante las primeras o últimas horas de la aclimatación al frío; lo cual indica un cambio progresivo del perfil de expresión del transcriptoma (Kaplan *et al.*, 2007). Al ser el ajo una planta tolerante al frío, es previsible observar cambios en el transcriptoma durante el ciclo del desarrollo del ajo.

Sin embargo, ¿cómo es que la planta percibe la señal causada por las bajas temperaturas y procede a la transducción de esta en los cambios mencionados anteriormente? Se piensa que cuando las membranas celulares perciben el descenso en la temperatura, se induce el incremento en la concentración del calcio citoplasmático (Figura 2.6). Después, esta señal es transmitida a través de proteínas de unión que activan cascadas reversibles de fosforilación/desfosforilación, las cuales, participarían en el control de la acumulación de diferentes moléculas de señalización, como por ejemplo las fitohormonas que, a su vez, modularían la actividades de varios factores de transcripción, y por lo tanto, se induce la expresión genética regulada por las bajas temperaturas (Catalá *et al.*, 2012); otros compuestos podrían ser los azúcares como la sacarosa, cuya síntesis es activada debido a la fosforilación de la enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS) (Stitt y Hurry, 2002).

Diversos estudios han señalado la importancia del factor temperatura antes de la siembra y durante el desarrollo del cultivo del ajo. Gvozdanović-Varga *et al.* (2004) observaron que un mismo genotipo puede mostrar diferentes fenotipos dependiendo de las variaciones climatológicas presentadas en cada temporada de cultivo, indicando que los factores ambientales juegan un papel importante en la formación del bulbo.

Kamenetsky *et al.* (2004) estudiaron el efecto de la temperatura de almacenamiento y condiciones de crecimiento en relación con el desarrollo

vegetativo y los órganos reproductivos. Sus observaciones indican que las bajas temperaturas del almacenamiento antes de la siembra y durante el crecimiento en combinación con fotoperiodos largos promueven la elongación del escapo floral, mientras que temperaturas más cálidas y fotoperiodos largos inducen la translocación de compuestos de reserva.

Mathew *et al.* (2011), señalaron que un adecuado estímulo ambiental puede promover la florogénesis en diversos genotipos de ajo. Los autores almacenaron dientes semilla durante 8 semanas a 4 °C antes de la siembra y, 79 días posteriores a esta, tomaron una muestra representativa de cada genotipo, la cual fue expuesta a una interrupción de la duración del fotoperiodo por 30 ó 10 días. El almacenamiento a bajas temperaturas junto con un fotoperiodo corto promovió la iniciación floral en los genotipos que producen escapo floral, mientras que este fue afectado de manera mixta por el fotoperiodo largo dependiendo del genotipo, en unos fue promovido, mientras que en otros fue suprimido.

En otro estudio en el cual se determinó la duración óptima del almacenamiento a 4 °C previo a la siembra de dos variedades de ajo California Late y California Early, los resultados indicaron que los rendimientos más altos en relación con el número de bulbos y de dientes por bulbo, se obtuvieron cuando los dientes semilla fueron almacenados a dicha temperatura por 45-60 días antes de la siembra (Bandara *et al.*, 1999).

El equipo de trabajo del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la Universidad Autónoma de Querétaro almacenaron dientes semilla durante 2 temporadas consecutivas (2009-2010 y 2010-2011) por 35-42 días a 5 °C antes de la siembra. Los ajos obtenidos presentaron escapo floral al término del periodo de cultivo lo que coincide con lo observado por Mathew *et al.* (2011) y Kamenetsky *et al.* (2007) por lo tanto, como estos autores indicaron, la florogénesis está controlada por una cascada de factores genéticos que codifican para su progresión ascendente y está diferencialmente regulada por la temperatura y el fotoperiodo.

Del Pozo y González, (2005) almacenaron bulbos de ajo a 4 y 16 °C durante 20, 40 ó 60 días, observando formación de bulbos sólo cuando la temperatura de almacenamiento fue de 4 ó 7 °C. Los autores observaron que la temperatura y el tiempo de almacenamiento antes de la siembra influyen en el tiempo que tarda en iniciar la formación del bulbo: a más baja temperatura y mayor tiempo de almacenamiento, hubo un mayor porcentaje de emergencia de brotes, y el número de días entre las etapas de emergencia e inicio de la bulbificación disminuyó. Los resultados obtenidos por Del Pozo y González (2005) concuerdan con lo observado en la temporada 2010-2011 por el grupo de trabajo del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la Universidad Autónoma de Querétaro: el número de días del periodo comprendido entre la emergencia y el inicio de bulbificación fue menor en las plantas cuya semilla fue almacenada antes de la siembra a baja temperatura (99 días) que el de las provenientes de semilla almacenada a temperatura ambiente (135 días).

Rahim y Fordham (1988, 2001) examinaron bulbos de ajo tropical obtenidos de 'semilla' almacenada a 5 y 20 °C durante 30 días antes de la siembra; y los efectos de este tratamiento en la iniciación, diferenciación, desarrollo y maduración de la planta. Los autores señalaron que los bulbos de ajo provenientes de los dientes almacenados a baja temperatura iniciaron la diferenciación de los dientes por adelantado y completaron su desarrollo en menos días (87), en comparación de los bulbos de ajo que resultaron del almacenamiento a 20 °C (117 días). Esto concuerda con lo observado por Zavala-Gutiérrez (2011) durante la temporada 2010-2011 quien observó que las plantas de ajo provenientes de bulbos almacenados a 5 °C completaron su madurez a los 157 DDS; mientras que aquellos almacenados a temperatura ambiente, su desarrollo se extendió hasta 199 días.

Utrilla-Vázquez (2008) y Vázquez-Mandujano (2009) almacenaron dientes 'semilla' a 5, 10 °C y temperatura ambiente (TA) por 2 o 16 días, observando que estos tratamientos de almacenamiento en frío no tuvieron un efecto significativo sobre el inicio de la bulbificación de los ajos. Esto contrastó con lo observado por López-Hernández (2010) y Zavala-Gutiérrez (2011); quienes también almacenaron

dientes 'semilla' a 5 °C y TA, por 35 y 42 días respectivamente, observando un adelanto en el inicio de la bulbificación y en la cosecha para las plantas provenientes de semilla almacenada a baja temperatura. Los datos anteriores señalan que hay un umbral del tiempo de almacenamiento en frío a partir del cual se observan respuestas en el ciclo de cultivo.

## 2.4 Metabolismo de compuestos asociados a la bulbificación

### 2.4.1 Carbohidratos

En el género *Allium*, los carbohidratos son los compuestos más abundantes, siendo estos del tipo no estructural tales como los fructanos (~84 % materia seca), además de glucosa, fructosa y sacarosa (~16 % materia seca). En las plantas que pertenecen a este género, no se han identificado almidón ni series de rafinosa (Chandrashekar *et al.*, 2011; Darbyshire y Henry, 1981).

Darbyshire y Henry (1981), citaron a Bacon (1959), quien reportó la distribución de sacáridos de 3, 4 y 5 monómeros en las bases del bulbo de cebolla (*Allium cepa*) y sugirió la presencia de polímeros de al menos 8 grados de polimerización (GP). Estos autores confirmaron la presencia de polímeros de hasta 12 unidades mediante cromatografía de permeación en gel en bulbos de cebolla Creamgold y Bunching. En ajo se ha reportado un polímero de fructanos de ~50 GP (Baumgartner *et al.*, 2000), por lo que estimaron que el rango de polimerización de los fructanos en ajo se extiende desde 3 hasta 50 GP. Darbyshire y Henry mencionaron que las reacciones de las enzimas fructan:fructan fructosiltransferasas de ambas especies fueron similares, independientemente del tamaño del polímero aceptor. Los autores sugieren que el suministro de sacarosa como sustrato, puede jugar un papel central y de control en la capacidad de la planta para sintetizar polímeros de mayor grado de polimerización; por lo cual *A. sativum* al contener una mayor cantidad de carbohidratos (252 mg g<sup>-1</sup> peso fresco) respecto de *A. cepa* (42 mg g<sup>-1</sup>), tendría un mayor suministro del sustrato para la síntesis de polímeros de mayor grado de polimerización. Es decir que estos



autores sugieren que el grado de polimerización del fructano está determinado por la disponibilidad de sustrato o por el transporte de sacarosa.

Por otro lado, también se ha señalado en otras especies que las bajas temperaturas inducen una mayor síntesis de sacarosa; Guy *et al.*, (1992) indicaron que plántulas de espinaca crecidas a 25 °C durante tres semanas y después transferidas a 5 °C durante 14 días, acumularon 15 veces más sacarosa respecto de las plántulas que fueron desarrolladas a 25 °C; este cambio fue asociado con un incremento en la actividad de la enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS), enzima clave en la síntesis de este disacárido. Este aumento en la concentración de sacarosa por efecto de bajas temperaturas también ha sido indicado en caña de azúcar (Uehara, 2009).

En general, los azúcares pueden actuar de forma diferencial para promover la aclimatación al frío, por ejemplo, incrementado la presión osmótica o protegiendo macromoléculas específicas de la deshidratación. También pueden interactuar con otros componentes de la respuesta a la aclimatación, como la expresión de genes que están regulados por el frío (*COR*) la desaturación de ácidos grasos y la síntesis de prolina (Stitt y Hurry, 2002).

#### 2.4.1.1 Sacarosa

Strand *et al.* (2003) analizaron la importancia de la regulación de la biosíntesis de sacarosa durante la aclimatación al frío en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con sobre expresión de la enzima sacarosa fosfato sintasa, o con represión antisentido de esta misma enzima y de la fructosa-1,6-difosfatasa (regulador de la vía biosintética). Cuando las plantas fueron transferidas de 23 °C a 5 °C; los autores observaron que la biosíntesis de la sacarosa en las plantas que tenían sobre expresada la enzima SPS redujo la inhibición de la fotosíntesis manteniendo la movilización de carbohidratos desde los sitios fuente hasta los de almacenamiento, así como el incremento del desarrollo de la tolerancia a la congelación. Esto se relaciona con lo señalado por Tognetti *et al.* (1990), quienes indicaron una relación entre la capacidad para acumular sacarosa con la capacidad

de incrementar la actividad de SPS. Se ha observado que en *Arabidopsis thaliana* la actividad de SPS comenzó 30 minutos después de haber transferido las plantas de una temperatura cálida a 4 °C estimulándose la síntesis de la sacarosa (Stitt y Hurry, 2002).

Guy *et al.* (1992), indicaron que bajo condiciones de baja temperatura, (14 días a 5°C) la captura de energía fotosintética se reduce en menor medida que la energía utilizada por el metabolismo, lo que llevó a una acumulación de carbohidratos de reserva como la sacarosa (12 veces más que a temperatura ambiente), fructosa, glucosa y fructanos. De igual forma indicaron que la actividad y cantidad de SPS se incrementó cuando las hojas fueron transferidas a bajas temperaturas.

Si este fenómeno se presentara en ajo, sería posible esperar que bajo condiciones de baja temperatura hubiera una sobre expresión del gen de la SPS que podría inducir una mayor cantidad de enzima y mayor actividad de la misma generando una mayor acumulación de sacarosa que podría ser empleada para la síntesis de fructanos. No obstante, los datos mostrados por las anteriores investigaciones muestran un efecto directo de las bajas temperaturas en la fisiología de las plantas estudiadas; para el caso del ajo, había que resaltar que el estímulo de bajas temperaturas se da antes que la planta sea sembrada, por ello habría que esperar que los efectos a nivel de expresión de genes deben observarse de manera temprana aunque los efectos fisiológicos solo sean observados cuando la planta se encuentra al final de su ciclo de cultivo.

#### 2.4.1.2 Fructanos

Los fructanos son carbohidratos de reserva cuya estructura química la constituye una molécula de sacarosa a la que se unen polímeros de fructosa, lineales o ramificados; están presentes en el 15 % de las plantas superiores, en algunas de las plantas inferiores y en bacterias (Heldt y Heldt, 2010; Kusch *et al.*, 2009; Vijn y Smeekens, 1999). El organismo humano no posee un sistema enzimático con capacidad para digerir estos compuestos, por lo que los fructanos son de gran interés a la industria alimentaria como ingredientes que no aportan calorías.

Los fructanos tienen importancia en la industria alimentaria, debido a que pueden ser usados como aditivos porque tienen sabor dulce, o formar emulsiones con textura similar a las grasas de sabor neutro (Olvera Carranza *et al.*, 2015) así como en aplicaciones farmacéuticas y biotecnológicas: producción de bioetanol jarabe de fructosa, sustituto de alimentos ricos en proteínas, agente de transesterificación de triacilgliceroles.

También han sido utilizados como prebióticos y antioxidantes, promotores de la absorción de minerales, componentes en mecanismos de defensa contra diversas enfermedades (estreñimiento, diarreas, síndrome de intestino irritable) o como inmunoreguladores, agentes mejoradores del metabolismo de lípidos al reducir la trigliceridemia y colesterolemia, prevención de enfermedades tales como osteoporosis, arterosclerosis cardiovascular, obesidad y diabetes tipo 2; (Verspreet *et al.*, 2015; Apolinário *et al.*, 2014; Peshev y Van den Ende, 2014; Ulloa *et al.*, 2010).

Estos carbohidratos son acumulados como reserva, además o en lugar del almidón; algunos investigadores asocian la formación de fructanos con la tolerancia al frío y la sequía, al observar un aumento en la expresión de genes que codifican para las fructosiltransferasas, enzimas que participan en la síntesis de estos compuestos (Hisano *et al.*, 2008). La función de los fructanos no solo es de reserva, pues también participan en el mantenimiento de potenciales osmóticos y en la estabilidad de macromoléculas y estructuras biológicas (Pontis, 2004; Vereyken *et al.*, 2001; Thorsteinsson *et al.*, 2002; Vijn y Smeekens, 1999).

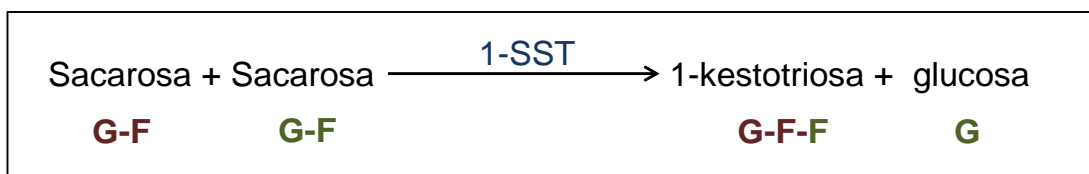
La síntesis de fructanos, en especial la actividad de síntesis de kestosa (fructosil-sacarosa), es inducida cuando hay presencia de sacarosa; además, se ha indicado que las proteínas cinasas y fosfatasas las cuales participan en la regulación genética, toman parte en la cadena de eventos que intervienen en la síntesis de este tipo de carbohidratos por acción de la sacarosa ya que se ha observado la inhibición de la inducción de síntesis de fructanos en presencia de antagonistas de cinasas y fosfatasas (Martínez-Noël *et al.*, 2001).

En el bulbo del ajo, este carbohidrato es el más abundante, 125 – 235 mg g<sup>-1</sup> peso fresco y constituye el 70 % del peso de la materia seca (Vázquez-Mandujano, 2009; Losso y Nakai, 1997). La clase de fructanos presentes en *A. sativum*, consiste en pocos fructooligosacáridos como neokestosa y pequeñas cantidades de inulina, mientras que se ha detectado una elevada concentración de fructanos de alto grado de polimerización (Ernst *et al.*, 1998), siendo el máximo hasta ahora reportado de 58 (Baumgartner *et al.*, 2000).

Losso y Nakai (1997) investigaron la distribución de pesos moleculares utilizando la técnica MALDI-MS (matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry), indicando que el rango de peso se encuentra entre menos de 1000 a ~4500 Da, para fructanos de hasta 38 GP. Recientemente se estableció el peso molecular de un fructooligosacárido de 9 GP, consistiendo en 1.8 kDa (Tsukamoto *et al.*, 2008).

#### 2.4.1.2.1 Biosíntesis y clasificación

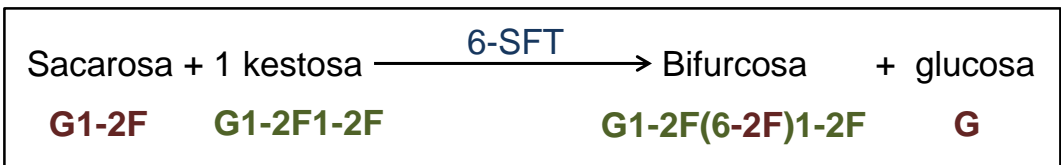
Estos compuestos se acumulan en la vacuola de las células vegetales aunque es posible que también sean sintetizados en los compartimentos prevacuolares, en las células del parénquima de almacenamiento (Valluru y Van den Ende, 2008; Pontis, 2004; Vijn y Smeekens, 1999; Kaeser, 1983). Su síntesis se lleva a cabo por *fructosiltransferasas*, quienes transfieren unidades de fructosa a la molécula de sacarosa. La primera reacción de síntesis la lleva a cabo la sacarosa:sacarosa fructosiltransferasa (1-SST), quien transfiere un residuo fructosil de la sacarosa a otra molécula de sacarosa dando como resultado la formación del trisacárido 1-kestosa (G1-2F1-2F) (Heldt y Heldt, 2010).



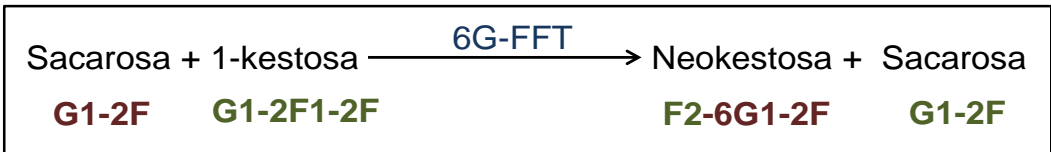
Esta 1-kestosa puede aceptar un residuo fructosil de un fructano donador, esta reacción reversible es catalizada por fructan:fructan fructosil transferasa (1-FFT). Esta enzima transfiere preferentemente un residuo fructosil de un trisacárido a una inulina más larga, por lo que la sacarosa no puede ser un donador fructosil, pero puede servir como un aceptor cuando esta enzima está en acción.



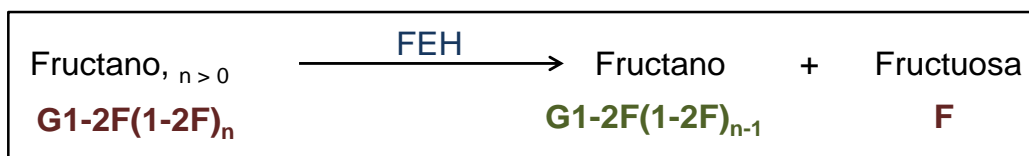
Otra enzima que participa en la biosíntesis de fructanos es la sacarosa fructosil transferasa (6-SFT), la cual a partir de dos sacarosas o de una sacarosa y un fructano, transfiere un residuo fructosil hacia el carbono 6 del compuesto aceptor, produciendo la 6-kestosa o una bifurcosa.



La enzima, que cataliza la formación de neokestosa a partir de sacarosa y 1 kestosa, fructan:fructan-6 glucosa-fructosiltransferasa (6G-FFT) transfiere el residuo fructosil de la fructosa hacia el carbono 6 de la glucosa de 1-kestosa:



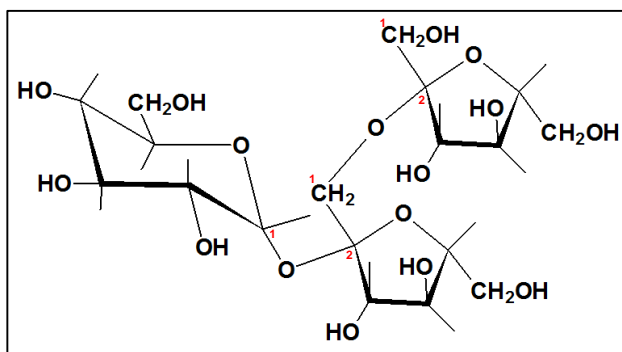
La enzima que está involucrada en la degradación de fructanos es la fructan exohidrolasa, la cual separa una fructuosa de la cadena del fructano.



La acción de estas enzimas da como resultado la formación de una mezcla de moléculas de fructanos con diferentes longitudes de cadena y grado de polimerización y que varía según la especie (Laere *et al.*, 2002; Vijn y Smeekens, 1999).

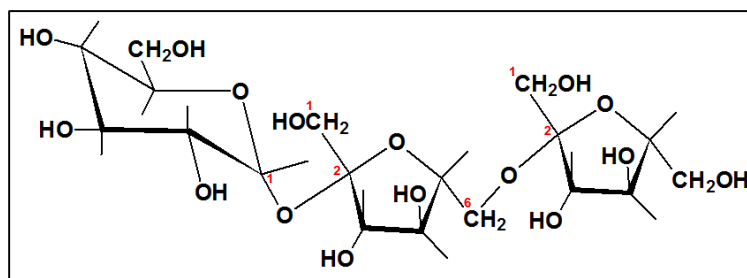
Los fructanos se clasifican en cinco estructuras básicas:

1. *Inulina*: polímero lineal de unidades D-fructosil que se unen entre sí por medio de enlaces  $\beta(2 \rightarrow 1)$ , la molécula más simple es el trisacárido 1-kestosa (isokestosa. Figura 2.7).



**Figura 2.7** Estructura de 1-kestosa

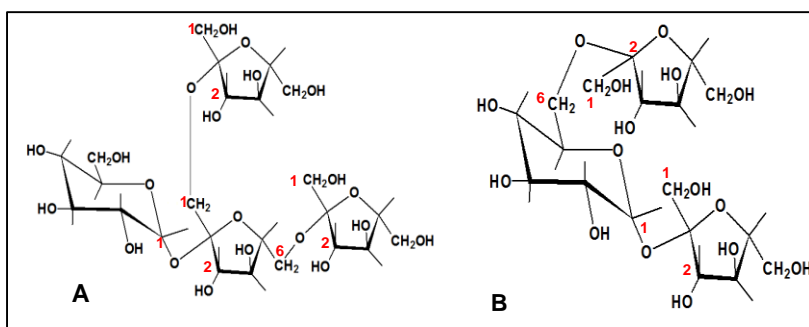
2. *Levano*: Presente en los forrajes, es un polímero lineal con enlaces  $\beta(2 \rightarrow 6)$ , como la 6-kestosa (Figura 2.8).



**Figura 2.8** Estructura de la 6-kestosa

3. *Mezcla de levanos*: Fructanos con ramificaciones, presentes sobre todo en el trigo y la cebada, consta de unidades fructosil unidas por dos tipos de enlaces,  $\beta(2\rightarrow1)$  y  $\beta(2\rightarrow6)$ . Ejemplo: bifurcosa (Figura 2.9 A).

4. *Neoseries de inulina*: Polímero lineal con residuos fructosil tanto en el carbono 1 como en el 6 de la glucosa, por lo que este tipo de fructano consiste en una cadena de fructosa a ambos extremos de la molécula de glucosa, como es el caso de la neokestosa (Figura 2.9 B).



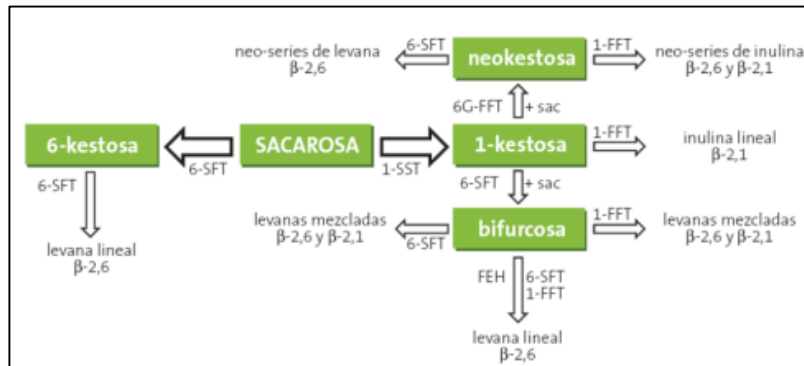
**Figura 2.9** Mezcla de levanos y series de inulina.

**A.** mezcla de leván, estructura de bifurcosa

**B.** estructura de neokestosa

5. *Neoseries de levano*: Son polímeros de residuos de fructosa unidos por enlace  $\beta(2\rightarrow6)$  al residuo de glucosa de la sacarosa.

Para la síntesis de estos compuestos es importante la luz del sol, con la cual la disponibilidad de la sacarosa en la célula se modifica: alta actividad fotosintética está asociada con altas tasas de exportación de carbono de los cloroplastos al citoplasma, lo que resulta en el incremento de intermediarios de la síntesis de sacarosa, y esta a su vez, puede ser distribuida hacia la vacuola donde es utilizada para la síntesis de fructanos por acción de las fructosiltransferasas (Vijn y Smeekens, 1999). En la Figura 2.10 se resume el esquema propuesto para la síntesis de fructanos en plantas.



**Figura 2.10** Biosíntesis de fructanos en plantas  
(Olvera *et al.*, 2007)

1-SST, sacarosa:sacarosa fructosil transferasa;  
1-FFT, fructan:fructan fructosil transferasa;  
6-SFT, sacarosa fructosil transferasa;  
6G-FFT, fructan:fructan seis fructosil transferasa,  
FEH, fructan exohidrolasa

2.4.1.2.2 Estudios del efecto de la temperatura de almacenamiento en los cambios del contenido de fructanos

El efecto de la temperatura en la acumulación de fructanos se ha estudiado en otras especies vegetales; Jeong y Housley (1990), observaron que la cantidad de estos carbohidratos en las hojas fue más alta cuando los materiales se encontraban a 10 °C, pero disminuyó si se aumentaba la temperatura a 25 °C; por lo que se puede inferir que las bajas temperaturas afectan la expresión de enzimas que participan en el metabolismo de los fructanos.

Thorsteinsson *et al.* (2002), observaron que las bajas temperaturas indujeron un aumento en la cantidad de carbohidratos totales, notándose una mayor acumulación de fructanos con grado de polimerización (DP) entre 12-80.

En un estudio bajo condiciones de foto y termoperiodo controlados, Galaz-Pérez (2008) analizó el contenido de fructanos en hojas durante el desarrollo de ajo ‘California Late’, indicando que la temperatura y el fotoperiodo controlan el ciclo de cultivo de esta planta y que la síntesis de fructanos parece estar controlada por las bajas temperaturas durante las primeras etapas del desarrollo.



Esto pareció indicar que durante el almacenamiento y las primeras etapas del desarrollo, las bajas temperaturas inducen la expresión de genes que se activan cuando cambian las condiciones de temperatura y luz, y que sus efectos son visibles hasta el final del cultivo.

Utrilla-Vázquez (2008) analizó el efecto de la temperatura y el periodo de almacenamiento antes de la siembra en el desarrollo de la planta de ajo en dos localidades. Esta autora observó que el contenido de fructanos en los bulbos de ajo “Retinto” durante su ciclo de cultivo en ambos lugares, mostraron un claro incremento a partir del día 179 después de la siembra, ella hace notar que este aumento coincidió con el inicio de la diferenciación del bulbo, lo cual tiene lógica si se considera que la materia seca de los bulbos está principalmente formada por estos carbohidratos. Adicionalmente a esto, la autora indica que los bulbos procedentes de dientes ‘semilla’ almacenados en refrigeración (5 y 10 °C) tuvieron un mayor contenido de fructanos respecto de aquellas procedentes de temperatura ambiente. Esto puede estar relacionado con el aumento en la actividad de la enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS) y la acumulación de sacarosa indicado por Guy *et al.*, (1992).

Vázquez-Mandujano (2009), analizó la acumulación de fructanos en bulbos y pseudotallos, además de la actividad de 1-SST durante diferentes periodos del desarrollo de plantas de ajo ‘Coreano’ generadas de dientes ‘semilla’ almacenados a 5 °C, 10 °C y temperatura ambiente durante 10 días antes de la siembra. El análisis estadístico indicó que en los tres tratamientos de almacenamiento no hubo efectos significativos en la acumulación de estos carbohidratos ni en la actividad total y específica de la enzima; sin embargo, sí se presentaron cambios a través del desarrollo del cultivo, independientes de los tratamientos aplicados. En ambas regiones anatómicas de la planta hubo acumulación simultánea de fructanos durante los primeros 203 días después de la siembra (DDS), seguido de un incremento rápido en el bulbo y una reducción en los pseudotallos; la disminución del contenido de fructanos en pseudotallos respecto a los bulbos casi al final del cultivo sugiere un transporte de estos desde los sitios de síntesis (hojas y pseudotallos) hasta los sitios de almacenamiento (bulbo), lo cual está asociado con el inicio de la bulbificación.

La actividad de 1-SST, antes de la siembra fue baja en comparación de la que presentaron las plantas a partir de 75 DDS cuyo valor aumentó o disminuyó durante el desarrollo del cultivo según la parte anatómica analizada, hojas, pseudotallo y bulbo; el hecho de que no se detectaran diferencias en la actividad específica de 1-SST, parece mostrar que esta enzima se encuentra de forma permanentemente en el tejido de la planta y, por lo tanto, no es una enzima reguladora del proceso de síntesis de fructanos, lo que pudiera indicar que quizá esta función esté a cargo de otras enzimas que participan en el metabolismo de fructanos, como la FFT (fructan:fructan fructosiltransferasa).

López-Hernández (2010) analizó el contenido total y el perfil cromatográfico de fructanos de hojas, pseudotallos y bulbos durante el desarrollo de plantas procedentes de “dientes semilla” de ajo ‘Coreano’ almacenada a 5°C por seis semanas o a temperatura ambiente; Los bulbos mostraron la concentración más alta (36.4 y 46.6 % de fructanos en la materia seca; TA y 5 °C, respectivamente), siguiendo los pseudotallos (18.8 y 18.6 % MS) y por último las hojas (5.6 y 7.0 % MS); indicando que, según la parte de la planta, será su capacidad para almacenar esta clase de carbohidratos.

Además, el análisis del contenido de fructanos para cada periodo de muestreo, López-Hernández (2010) indicó que durante los primeros 50 días después de la siembra (DDS), hojas y pseudotallos de plantas provenientes del almacenamiento a 5 °C mostraron mayor concentración de fructanos. Sin embargo, al final del cultivo, el contenido de estos carbohidratos en dichas partes anatómicas de la planta fue estadísticamente menor respecto de los bulbos. Esto sugiere un posible transporte de fructanos desde las hojas (posiblemente órganos de síntesis, pero con capacidad de reserva limitada) hasta los bulbos a través de los pseudotallos; tomando en cuenta de que los bulbos son órganos de reserva mientras que los pseudotallos son órganos de transporte cuya función consiste en conducir nutrientes, agua y fotosintatos, además de ser almacén temporal de fructanos; la autora, observó una tendencia de mayor transporte en las plantas provenientes de semilla almacenada a 5 °C.

En relación con el perfil cromatográfico de fructanos, López-Hernández (2010) obtuvo diferencias entre las diferentes condiciones de temperatura de almacenamiento del diente semilla. Para las plantas provenientes de 'semilla' almacenada a 5 °C, las hojas acumularon fructanos de alto peso molecular, los cuales fueron metabolizados y posteriormente transportados hasta los bulbos. Mientras que a temperatura ambiente no se indujo la acumulación temporal de fructanos de alto peso molecular en el mismo órgano.

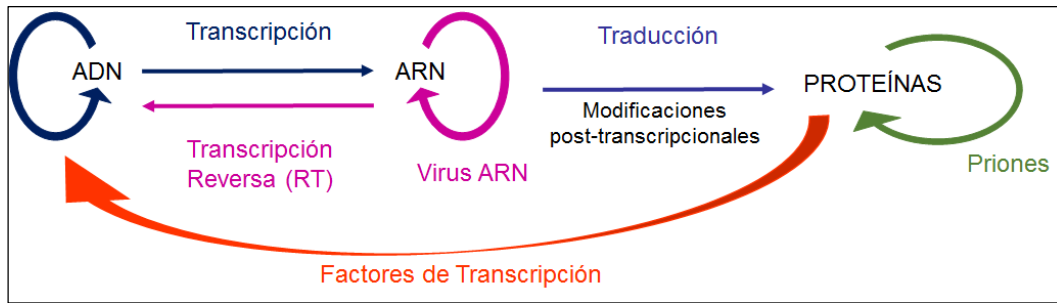
Hisano *et al.* (2008) aislaron 6 cDNA's que al expresarse codificaron para fructosiltransferasas de raigrás, una especie de pasto tolerante a bajas temperaturas; uno de ellos codificó para la sacarosa:sacarosa fructosiltransferasa (1-SST), dos para fructan:fructan 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT), y la secuencia proteínica de tres fue similar a la sacarosa:fructan 6-fructosiltransferasa (6-SFT). El contenido de fructanos tanto en hojas como en los tejidos de la corona cuando el raigrás fue sometido durante 4, 7, 14 y 30 días a un tratamiento en frío (8 horas a una temperatura diurna de 6 °C y una temperatura nocturna a 2 °C por 16 horas); los autores observaron al menos dos patrones diferentes en lo que respecta a los cambios en los niveles de mRNA por efecto de las bajas temperaturas. Transcritos de *6-SFT* se incrementaron de forma gradual durante el tratamiento con frío; mientras que la expresión de *1-SST* y *6G-FFT* aumentó durante las primeras 24 h, pero disminuyó antes de aumentar de nuevo cuando se amplió el periodo de tratamiento en frío.

Estas investigaciones señalan que el metabolismo de los fructanos está profundamente afectado por las bajas temperaturas a que se encuentran sometidos tanto los bulbos "semilla" como la planta durante su desarrollo; por tanto es muy posible que un escrutinio comparativo de la expresión de genes que codifiquen para las proteínas del metabolismo de estos carbohidratos durante el desarrollo de plantas producidas con semillas" almacenadas a 5°C y temperatura ambiente (TA) nos permita describir una dinámica de expresión de genes que ayude a interpretar los efectos de las bajas temperaturas en la acumulación de estos carbohidratos.

## 2.5 Las técnicas de biología molecular como herramientas en el estudio de los efectos de ambiente en el desarrollo de la planta

Cada organismo vivo está construido de acuerdo a la información contenida en sus genes: cada una de sus células, lleva una copia de esta información a la cual llamamos genoma (Karp, 2009; Mathews *et al.*, 2002). La biología molecular es la disciplina científica que se encarga de estudiar los procesos celulares que desarrollan las diversas macromoléculas biológicas presentes en la célula desde la perspectiva genética (genes y genoma); no obstante, dependiendo de condiciones fisiológicas concretas, ciertos genes estarán expresados, mientras que otros permanecerán apagados y otro grupo se estarán expresando según el momento del desarrollo, tipo celular y condiciones fisiológicas (Alberts *et al.*, 2008 en Lomas-Soria, 2012).

Esta expresión génica conduce a la síntesis de proteínas y/o enzimas, 'máquinas moleculares' cuya función consiste en cambiar, conducir y regular la fisiología y morfología celular (Renneberg, 2012; Müller-Esterl, 2011; Beadle y Tatum, 1941). A este proceso le han llamado dogma central de la biología molecular, el cual es el paradigma dominante, propuesto por Francis Crick en 1956, los genes estructurales son secuencias de ácido nucleico que funcionan al ser expresados en forma de polipéptidos, la replicación permite la herencia de la información genética, mientras que la transcripción y la traducción son responsables de su expresión; a la fecha esta representación ha sufrido cambios a causa de la obtención de nuevos datos a través de investigaciones (Figura 2.10; Krebs *et al.*, 2014; Barry, 2007; Gerstein *et al.*, 2007).



**Figura 2.11** Dogma central de la Biología Molecular

Debido a las ventajas obtenidas a partir del desarrollo de herramientas y métodos que permiten la manipulación directa del ADN de diversos organismos, tanto *in vitro* como *in vivo*, se han desarrollado diversas herramientas o técnicas con el fin de conocer y comparar los genes que son expresados y/o apagados en una situación experimental y una control (Krebs *et al.*, 2014; Aggarwal y Lee, 2003).

Lomas-Soria (2012), realiza una sencilla descripción de las ventajas y desventajas del uso de algunas de estas herramientas (Cuadro 2.2).

**Cuadro 2.2** Técnicas de análisis para el estudio de la expresión diferencial de genes

<b>Técnica</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Despliegue diferencial (DD)<sup>a</sup></b> (separar y clonar ARNm individuales por medio de la PCR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Se pueden comparar múltiples muestras experimentales simultáneamente</li> <li>· Es posible identificar genes inducidos y/o reprimidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· No es un método cuantitativo</li> <li>· Confiabilidad, falsos positivos (50-70 %)</li> <li>· No puede detectar transcritos de baja abundancia</li> </ul>
<b>Análisis de representación diferencial (RDA)<sup>b</sup></b> (examina las diferencias entre dos genomas complejos mediante enriquecimiento cinético y substractivo con el fin de purificar fragmentos de endonucleasas de restricción presentes en una población de fragmentos de ADN, pero no en la otra)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Elimina los fragmentos presentes</li> <li>· Obtención de los candidatos a genes diferenciables (después de varias amplificaciones selectivas)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Se hace forzosa la realización de pasos de amplificación secuencial (obtención de fragmentos diferenciables), por lo tanto, es una técnica laboriosa</li> </ul>
<b>Análisis seriado de expresión génica (SAGE)<sup>c</sup></b> (aislamiento de pequeños fragmentos de transcritos, los cuales se concatenan y clonan)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Identificación de un vasto número de transcritos</li> <li>· La cantidad de la expresión depende de la repetición del transcrito</li> <li>· Sin necesidad de un conocimiento previo de los genes de interés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Secuencias muy cortas, por lo que hay poca información para compararlas con una base de datos</li> </ul>
<b>Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)<sup>d</sup></b> (obtención de EST's diferencialmente expresados mediante hibridación sustractiva)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Detección de genes con bajo nivel de expresión</li> <li>· Se pueden analizar miles de clonas simultáneamente</li> <li>· Disminución de falsos positivos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Sólo se puede hacer una comparación de dos poblaciones a la vez</li> <li>· Sólo un paso de sustracción, lo que implica un aumento de las secuencias de fondo</li> </ul>

<sup>a</sup> Liang y Pardee, 1992; <sup>b</sup> Lisitsyn *et al.*, 1993; <sup>c</sup> Velculescu *et al.*, 1995; <sup>d</sup> Diatchenko *et al.*, 1996.

Otra herramienta ampliamente utilizada para observar la expresión génica, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), creada y desarrollada en 1986 por el grupo Cetus del departamento de genética humana en Emeryville, California; esta técnica consiste en sintetizar/amplificar un número ilimitado de copias de un fragmento específico de ADN de interés mediante el uso de pequeñas sondas complementarias a su secuencia (oligonucleótidos) y la acción de la enzima ADN polimerasa (Mullis *et al.*, 1986; Mullis, 1990); cuando el templado utilizado es ARN, se tiene que emplear la enzima transcriptasa reversa para sintetizar ADN complementario (ADNc), el cual es usado para la reacción de la PCR, a esta variación se le denomina RT-PCR. El resultado, banda(s) visibles bajo luz ultravioleta, se

observa mediante electroforesis en gel, el cual es un método de separación por tamaño de ácidos nucleicos usando un diferencial de voltaje (Krebs *et al.*, 2014).

Durante los años siguientes al origen de la PCR, esta ha evolucionado de una técnica cualitativa o semicuantitativa, laboriosa e intensiva basada en lo observable en geles teñidos, a una que detecta la presencia de los productos de amplificación de forma rápida y cuantitativa (Bustin, 2010); lo cual es necesario para confirmar la expresión y la cantidad de fragmento de ADN de interés que se está investigando, el nombre dado a este procedimiento es PCR tiempo real, o cuantitativo (qPCR o RT-qPCR), que mediante la unión covalente de un colorante fluorescente (SYBR Green) a la doble cadena del ADN amplificado detecta su cantidad conforme se va sintetizando/amplificando. Esta técnica es más sensible, eficaz, precisa y certera que su predecesora (Reddy *et al.*, 2015).

Otra herramienta de la biología molecular es la secuenciación de nueva generación. Los métodos de secuenciación clásicos como el descrito por Sanger *et al.* (1977), utiliza dideoxinucleótidos (ddNTPs) para terminar la síntesis de ADN en nucleótidos particulares, los ddNTPs son etiquetados con fluoróforos que son detectados mediante electroforesis capilar. Ahora, el poder tener esta electroforesis automatizada permite una secuenciación masiva y en paralelo, del alto rendimiento, disminuye costos y tiempo de realización, que tiene el objetivo de estudiar y analizar todo el genoma/transcriptoma/proteoma/metaboloma en organismo bajo una condición dada. En el caso del transcriptoma (RNA-seq), permite generar un catálogo de todos los genes que se están expresando y conocer su función (Krebs *et al.*, 2014; Lister *et al.*, 2009; Wilhelm y Landry, 2009; Mardis, 2008).

#### 2.5.1 Análisis moleculares en ajo

Se han publicado mapas genéticos de plantas de género *Allium*, como el ajo y la cebolla. Estas investigaciones fueron realizadas usando diferentes sistemas de marcadores como los RAPD y AFLP en familias con diferentes antecedentes genéticos (Cavagnaro y Galmarini 2007; McCallum *et al.*, 2006; Sprenger *et al.*, 1995).

Cavagnaro y Galmarini (2007) mencionan que marcadores específicos de genes que codifican para aliinasa, chitinasa, 1 sacarosa:sacarosa fructosiltransferasa (1-SST) y chalcona sintasa (CHS) han sido mapeados y que estas enzimas se encuentran codificadas por varias familias de genes.

Zavala-Gutiérrez (2011) describió un perfil parcial del transcriptoma de 'semilla' almacenada a 5 °C por 5 semanas generando una biblioteca de 85 clonas a las cuales se les realizó un análisis bioinformático, cuyos resultados indicaron la presencia de 28 unigenes los cuales codifican para proteínas de respuesta al estrés (64.28 %), proteínas involucradas en el metabolismo (14.28 %), proteínas estructurales (10.71 %) y factores de transcripción (7.14 %). Al comparar el perfil de transcritos de los dientes almacenados a 5 °C y el de los almacenados a TA, se observaron 20 genes sobre expresados en la primera condición de almacenamiento, de los cuales 11 fueron de isoenzimas de fenil alanina amonio liasa y dos del metabolismo de fructanos.

De acuerdo a los antecedentes mencionados; la presente tesis doctoral aporta información obtenida a través de estudios de hibridación sustractiva de genes, análisis del nivel de expresión genética y RNA-seq, para dilucidar los efectos que ejercen las bajas temperaturas de almacenamiento pre-siembra en la expresión de genes involucrados en el desarrollo, diferenciación y crecimiento de la planta del ajo (*Allium sativum*). Esta información debe de contribuir a enriquecer el conocimiento para plantear alternativas de mejora en la tecnología de producción; con lo cual se completará de manera más integra el conocimiento fisiológico del cultivo.



### **III. JUSTIFICACIÓN**

El entender el efecto de las condiciones ambientales, como la temperatura, en la expresión diferenciada de los genes involucrados en la bulbificación del ajo, puede ser aprovechado para generar estrategias tecnológicas enfocadas a mejorar la tecnología de producción de este cultivo.

Hay escasa información acerca de los mecanismos fisiológicos y moleculares inducidos por las bajas temperaturas en la planta del ajo, por lo que esta investigación aporta mayor información en este campo.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Las bajas temperaturas antes de la siembra y durante los primeros meses del desarrollo del cultivo, inducirán señales a nivel genético para la expresión de genes de enzimas, factores de transcripción o reguladores de crecimiento que participan en las rutas metabólicas de compuestos involucrados en el proceso de bulbificación y diferenciación del ajo.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Generar un perfil transcriptómico que permita dilucidar los efectos que ejercen las bajas temperaturas de almacenamiento pre-siembra en la expresión de genes involucrados en el metabolismo del desarrollo, diferenciación y crecimiento de la planta del ajo (*Allium sativum*).

### 5.2 Objetivos específicos

1. Elaborar bancos sustractivos de cDNA de muestras de ajo tomadas de los brotes de dientes 'semilla' almacenados a 5 °C y Temperatura ambiente (TA) antes de la siembra.
2. A partir de las secuencias obtenidas del banco de genes, realizar el análisis bioinformático y compararlas con otras ya reportadas.
3. Analizar el nivel expresión de los genes encontrados durante las 5 semanas de almacenamiento y durante el desarrollo del cultivo, en las dos condiciones de temperatura estudiadas mediante las técnicas de RT-PCR y RT-qPCR.
4. Correlacionar los datos de expresión de genes con los cambios en los contenidos de azúcares simples, fructooligosacáridos y fructanos de alto peso molecular.
5. Con los datos obtenidos más los resultados del RNA-seq realizar un análisis bioinformático robusto y con ello una descripción a nivel genético del efecto de la temperatura en el desarrollo de la planta de ajo.

## VI. METODOLOGÍA

Para el cumplimiento de los objetivos de este trabajo, se llevará a cabo una metodología que consta de 2 etapas. La primera etapa corresponde al objetivo específico número uno, mientras que la segunda a los restantes.

### 6.1 Estudio en condiciones de cultivo a temperatura semi controlada y en condiciones de campo.

El material biológico utilizado para la realización de esta primera etapa fue bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) variedad “Coreano”, producidos en la Región de Rincón de Romos, Aguascalientes; y manejados en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la Universidad Autónoma de Querétaro. Estos se obtuvieron en la temporada 2010-2011 y provinieron de dientes ‘semilla’ que fueron almacenados previo a su siembra a temperatura ambiente (TA).

Este conjunto de bulbos, fue dividido en dos subconjuntos o lotes. El lote 1 fue almacenado a TA por 5 semanas y conformó el grupo control o testigo, y el lote 2 tuvo un tratamiento de almacenamiento a 5 °C durante el mismo periodo, este conjunto fue el grupo problema. Al final de esta fase, ambos conjuntos fueron desgranados y se seleccionaron los dientes medianos y grandes, firmes y sin defectos visibles. De cada condición de temperatura de almacenamiento se prepararon 2 lotes, el primero para el estudio a temperatura semi controlada (SC), llevado a cabo en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro; y el segundo para el estudio en el campo de cultivo ubicado en El Rancho “El Refugio”, Municipio de Cosío, Aguascalientes (Cuadro 6.1). Un día antes de la siembra, los dientes semilla seleccionados fueron contados y distribuidos para cada lote, y se mezclaron con productos agroquímicos con el fin de desinfectarlos y protegerlos de posibles ataques de plagas y enfermedades durante su desarrollo (Zavala-Gutiérrez, 2011).

**Cuadro 6.1** Descripción de los tratamientos aplicados

Cond. de Alm.	Lote #	Trat.	Descripción	No. de Réplicas	No. de Dientes	No. de Muestras	Plantas por Trat.
TA	1	TA-SC	Bulbos procedentes de plantas de ajo cuyo diente semilla fue almacenado a temperatura ambiente por tres temporadas consecutivas (2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012) y sembrados en Querétaro, Qro.	2: -R1 y -R2	100	6	3
TA	2	TA	Bulbos procedentes de plantas de ajo cuyo diente semilla fue almacenado a temperatura ambiente por tres temporadas consecutivas (2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012) y sembrados en Cosío, Aguascalientes	3: -R1, -R2 y -R3	900	6	5
5 °C	1	5C-SC	Bulbos procedentes de plantas de ajo cuyo diente semilla fue almacenado a temperatura ambiente por dos temporadas seguidas (2009-2010 y 2010-2011) y almacenado a 5 °C por 6 semanas en esta última (2011-2012). Sembrados en Querétaro, Qro.	2: -R1 y -R2	100	4	3
5 °C	2	5C	Bulbos procedentes de plantas de ajo cuyo diente semilla fue almacenado a temperatura ambiente por dos temporadas seguidas (2009-2010 y 2010-2011) y almacenado a 5 °C en esta última (2011-2012). Sembrados en Cosío, Ags.	3: -R1, -R2 y -R3	900	4	5

### 6.1.1 Experimento en condiciones semi controladas de temperatura

El primer lote de dientes semilla de ambas condiciones de almacenamiento fueron sembrados en envases de 1.8 L, con un suelo adecuado para este cultivo y se les aplicó el programa de fertilización diferenciado según la condición de almacenamiento de la 'semilla'. Al inicio del desarrollo, a estos les fue aplicado un régimen de temperatura baja y fotoperiodo cortos: 13 horas en oscuridad a 10 °C y 11 horas de luz natural a temperatura ambiente (TA) durante un mes, al término de este lapso, se controló la temperatura durante la oscuridad a 3 °C. Cuando se acumularon 650 horas frío por debajo de 5 °C, la temperatura durante las 13 horas de oscuridad se restableció a 10 °C, hasta el cambio natural de la duración del fotoperiodo: 11 horas de oscuridad a 10 °C, y 13 horas de luz a TA, condiciones que se mantuvieron hasta el final del ciclo de cultivo.

### 6.1.2 Experimento en campo

Los dientes semilla del segundo lote para cada condición de temperatura de almacenamiento fueron llevados a una huerta comercial localizada en Cosío, Aguascalientes, y sembrados manualmente en surcos a doble hilera con espacios de 85 cm entre cada uno y dejando una distancia de 7cm entre cada diente. En cada replica de los tratamientos sembrados, se delimitaron cinco metros de la siembra a la cual no se le hicieron muestreos durante el desarrollo del cultivo y fue utilizada para las evaluaciones de rendimiento y calidad de la cosecha al final del ciclo. El programa de fertilización y de riego, así como las prácticas de manejo del cultivo fue realizado según lo indicado por los productores.

El diseño experimental propuesto fue unifactorial (temperatura de almacenamiento previo a la siembra) a 2 niveles (5 °C y Temperatura Ambiente). Para los tratamientos sembrados en Querétaro, Qro., cada uno constó de 2 réplicas distribuidas al azar en cajas, las cuales fueron adaptadas para facilitar el transporte desde la cámara de refrigeración al lugar donde recibían la luz natural. Cada tratamiento sembrado en Cosío, Ags., tuvo tres réplicas distribuidas en surcos experimentales dentro de la huerta comercial (Cuadro 6.1).

Durante el ciclo del desarrollo de la planta y con el propósito de monitorear su crecimiento, se realizaron 4 y 6 muestreos. En cada uno se

tomaron al azar 3 ó 5 plantas (unidad experimental), dependiendo del lugar de la siembra, Querétaro o Aguascalientes (Cuadro 6.1). En cada uno de ellos se registraron los siguientes parámetros fisiológicos: talla o altura de la planta, ancho y número de hojas, peso fresco, diámetro del bulbo y del cuello e índice de bulbificación.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente a través de un análisis de varianza en el cual se examinó el efecto del tratamiento; si éste resultó significativo, se procedió a la comparación de medias utilizando la prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95%, utilizando el paquete estadístico JMP v.5.0.1.

Diariamente durante el desarrollo del cultivo, se monitoreó el clima registrado por las estaciones climatológicas cercanas a la huerta donde fueron sembrados los tratamientos experimentales (Cuadro 6.2), a través de la Red de Estaciones Agroclimáticas de Aguascalientes (INIFAP), por medio de su página web, en la cual se pueden obtener datos de temperatura (media, máxima, mínima, variación cada 15 minutos) y la intensidad máxima de irradiación solar (Watts/m<sup>2</sup>): <http://clima.inifap.gob.mx/redclima/clima/>.

**Cuadro 6.2** Estaciones climatológicas del Estado de Aguascalientes

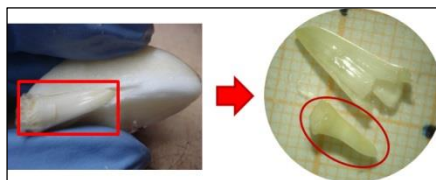
Nombre de la Estación	Coordenadas		Municipio
	Latitud	Longitud	
El Potrerito	22° 21' 49.4"	102° 17' 30.2"	Cosío
Los Pinos	22° 19' 13.2"	102° 13' 30.6"	Rincón de Romos

No obstante, el monitoreo y registro de datos se realizaron para ambas estaciones climatológicas, debido a la cercanía del campo experimental se decidió trabajar con los datos climáticos de la Estación Los Pinos.

Utilizando las gráficas de temperatura en tiempo real que esas estaciones climatológicas presentan, se registraron el número de horas al día en las que la temperatura estuvo por debajo de 5 y 7 °C; posteriormente los datos se sumaron durante todo el ciclo de cultivo para cuantificar las horas frío a las que estuvo sometido el cultivo durante su desarrollo.

## 6.2 Análisis molecular de las muestras

El material biológico utilizado en la segunda etapa fue 10 bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) variedad 'Coreano', producidos en la Región de Rincón de Romos, Aguascalientes en la temporada 2011-2012 provenientes de 'semilla' almacenada a temperatura ambiente. Este conjunto de bulbos, fue dividido en dos grupos, uno se almacenó a TA por 5 semanas y el segundo fue almacenado a 5 °C durante el mismo periodo. Cada semana se tomaron muestras de los brotes de los dientes (Figura 6.1), se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C.



**Figura 6.1** Obtención del brote del diente 'semilla'

### 6.2.1 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)

A la tercer semana, un brote de cada condición de almacenamiento se pulverizó por separado en un mortero y pistilo previamente tratados con una solución de etanol y DEPC al 0.1 % (v/v) y enfriados con nitrógeno para evitar la descongelación de la muestra. El polvo obtenido (28.2 y 29.7 mg para 5C y TA, respectivamente) se colocó en un tubo eppendorf libre de ARNasas sin dejar que se descongelara la muestra. Inmediatamente se procedió a extraer el ARN mediante el paquete de reactivos RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, 2006. Ver anexo A) y para verificar la integridad del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % (w/v) y se cuantificó la cantidad extraída mediante un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, 2009). A continuación se realizó la síntesis de ADNc de doble cadena según el protocolo descrito en el kit PCR-select™ cDNA subtraction de Clontech (2007. Ver anexo B) partiendo de aproximadamente 2 µg de ARN, y al término se efectuó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % (w/v). Con el fin de comprobar la calidad, se midió la concentración del ADN con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, 2009); siguiendo con las instrucciones descritas en el paquete de reactivos de



Clontech se llevó a cabo la hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH, Diatchenko, 1996; Ver anexo B) para las dos condiciones cuyo resultado fue confirmado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % (w/v).

Las bandas de gel obtenidas para las dos condiciones (cada banda se cortó y se conservó en un tubo eppendorf previamente pesado a -20 °C) fueron purificadas mediante el paquete de reactivos Wizard PCR preps DNA Purification System de Promega (2009, Ver anexo C) e inmediatamente se procedió a la ligación en el vector pGEM T Easy de Promega (2010), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (ver anexo D). En seguida se llevó a cabo la transformación de células competentes, para ello se utilizaron dos tipos de células siguiendo las especificaciones del fabricante (ver anexos E y F), TOP10 OneShot® Chemically Competents cells y OneShot® Electrocomp™ cells (Invitrogen) utilizando un electroporador Eppendorf Eporator® (2009) para estas últimas. Las células transformadas se sembraron en cajas Petri con agar LB + ampicilina 100 µg/µL, adicionadas con X-gal e IPTG. Después de 16 horas de incubación a 37 °C y de seleccionar las células que posiblemente tengan el inserto, se hizo la extracción de ADN plasmídico miniprep de Sambrook (2012, ver anexo G). A las colonias que presentaron el ADN plasmídico se les realizó una digestión enzimática, con la endonucleasa EcoRI (Promega, 2013) para liberar el inserto (EST) del vector (ver anexo H).

Las colonias que presentaron inserto se incubaron en medio LB líquido + ampicilina 100 µg/µL a una temperatura de 37 °C con agitación (150 rpm). Al término de 16 horas, el ADN plasmídico fue extraído utilizando el paquete de reactivos PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, 2009. Ver anexo I). Las secuencias de nucleótidos fueron determinadas en la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología, UNAM campus Juriquilla, Qro. México, mediante el método de terminación con el Big Eye (Applied Biosystems), en un PCR y en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

## 6.2.2 Análisis del nivel de expresión

### 6.2.2.1 RT-PCR

Con el fin de observar el patrón de expresión de algunos genes obtenidos, de la información derivada del análisis informático, se escogieron 8 secuencias a las cuales se diseñaron oligonucleótidos mediante el programa Vector NTI® designer v. 15.1 (Invitrogen), dichos oligos se mandaron secuenciar por medio Industrias Bioselec S. A. de C. V.

Al mismo tiempo, se extrajo ARN total de los brotes de las 5 semanas de almacenamiento del bulbillo a las dos condiciones de temperatura (5°C y TA), así como de 5 tejidos de las plantas a dos meses después de la siembra y en la cosecha (Cuadro 6.3), (Quiagen, 2006. Anexo A).

**Cuadro 6.3** Muestras utilizadas

	T <sub>alm</sub>	Semana					DDS*		
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	69	155	218
Almacenamiento (TA y 5 °C)	TA	Br	Br	Br	Br	Br	–	–	–
	5C	Br	Br	Br	Br	Br	–	–	–
Desarrollo del cultivo (plantas provenientes de semilla almacenada a 2 condiciones de Temperatura)	TA	–	–	–	–	–	R, B, Pt y H	R, Db, B, Pt y H	R, Db, B, Pt y H
	5C	–	–	–	–	–	R, B, Pt y H	R, Db, B, Pt y H	R, Db, B, Pt y H

\* DDS, días después de la siembra; Br, brote; R, raíz; Db, disco basal; B, bulbo; Pt, pseudotallo; H, hoja

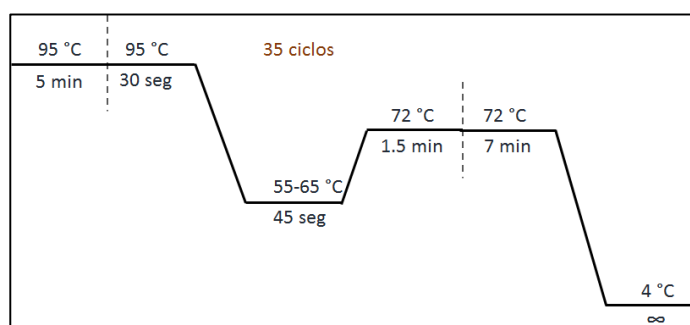
Después de comprobar la integridad del ARN y su cuantificación mediante un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, 2009), se procedió con la síntesis de la primera cadena del ADNc utilizando el paquete de reactivos first strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, 2011. Ver anexo J) partiendo de una misma cantidad de ARN para todas las muestras. El ADNc de cadena sencilla resultante se cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, 2009) y se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización.

Teniendo los templados correspondientes (ADNc de cada muestra), se procedió a realizar los RT-PCRs, utilizando la siguiente mezcla de reacción

(Cuadro 6.4) y empleando el programa que se muestra en la Figura 6.2 en un termociclador marca TECHNE, modelo TC-4000.

**Cuadro 6.4** Mezcla de reacción RT-PCR

Componente	$\mu\text{L}$
Agua estéril	20.2
Regulador Titanium Taq polimerasa (Clontech)	2.0
dNTPs	0.5
Oligonucleótido-Sentido	0.5
Oligonucleótido-Antisentido	0.5
Templado (ADNc)	1.0
Titanium Taq polimerasa (Clontech)	0.3
<b>TOTAL</b>	<b>25.0</b>



**Figura 6.2** Programa de RT-PCR

Al término de cada RT-PCR se realizó la electroforesis en gel de agarosa 1.2 % (w/v), y el nivel de expresión se cuantificó por densitometría con el programa Gelquant de DNR Bio-Imaging Systems (Jerusalén, Israel). Los datos obtenidos fueron normalizados utilizando como gen housekeeping *ACTINA*.

#### 6.2.2.2 RT-qPCR

Para corroborar lo observado en la RT-PCR y dado que la cuantificación en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa es sensible, eficaz, precisa y certera (Reddy *et al.*, 2015), se escogieron tres EST para llevar a cabo este análisis (*SORBIDRAFT*, *1-SST* y *PAL*):

- Para el gen que codifica para la proteína hipotética SORBIDRAFT\_0057s002150 [*Sorghum bicolor*] (acceso: XP\_002489117.1) fue el número de copias que se obtuvieron a partir de la SSH. Del total de clonas obtenidas para 5C que presentaron transcritos, el 50% tuvo homología para este gen; mientras que para las de TA, el porcentaje de homología fue del 74.

- La importancia de la sacarosa:sacarosa fructosiltransferasa (1-SST), al ser la primera enzima que participa en la biosíntesis de los fructanos.

- La fenilalanina amonio liasa (PAL), la cual interviene en la primera reacción de la biosíntesis de los fenil propanoides; Zavala-Gutiérrez (2011) observó la sobreexpresión del gen que codifica para esta proteína en brotes almacenados a 5 °C por 5 semanas; y Dufoo-Hurtado *et al.* (2013) indicó un aumento en la cantidad de fenoles y antocianinas en plantas 5C.

El estudio se llevó a cabo utilizando el gen *18S* como *housekeeping* o referencia, en el laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, bajo la tutoría del Dr. Sergio Casas Flores y con ayuda de la Dra. Mayté G. Cervantes Badillo.

Cada par de oligonucleótidos fue diseñado mediante el software comúnmente utilizado en el laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa, proporcionado por (IDT). Y se mandaron sintetizar mediante la compañía Uniparts S. A.

La dinámica se realizó con las mismas muestras de que las utilizadas para la RT-PCR: brotes de dos lotes de ajo almacenado a 5 °C y temperatura ambiente durante 5 semanas, y tejido vegetal (bulbo, pseudotallo y hoja) a los 132 DDS. Las muestras biológicas se tomaron por duplicado, y cada reacción de RT-qPCR se hizo por triplicado (Cuadro 6.5).

A cada muestra biológica se le extrajo el ARN (Quiagen, 2006. Anexo A), la integridad fue observada mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturante 1.2 % (w/v) y se cuantificó con un espectrofotómetro para microplacas Epoch marca BioTek Instruments. Utilizando la misma cantidad de ARN se procedió a sintetizar el ADNc (ver anexo K).

El ADNc sintetizado se diluyó a una concentración de 50 ng/μL, el cual se utilizó como templado para las reacciones de RT-qPCR, sin embargo, antes de proceder al análisis se realizó un escrutinio para determinar las condiciones de las mezclas de reacción, esto es establecer las condiciones de los oligonucleótidos para cada gen a analizar (ver anexo L).

Determinadas las mejores concentraciones, se procedió a realizar las mezclas de reacción para cada muestra (Cuadro 6.6).

**Cuadro 6.5** Muestras utilizadas para RT-qPCR

TRATAMIENTO	ALMACENAMIENTO					DESARROLLO						
	T	S #1	S #2	S #3	S #4	S #5	T 1	M #3 132 DDS	T 2	M #3 132 DDS	T 3	M #3 132 DDS
Temperatura ambiente (TA)	Brote	m1	m1	m1	m1	m1	Hojas (H)	m1	Pseudotallo (Pt)	m1	Bulbo (B)	m1
		m2	m2	m2	m2	m2		m2		m2		
5 °C (5C)		m1	m1	m1	m1	m1		m1		m1		m1
		m2	m2	m2	m2	m2		m2		m2		m2

S, semana; M, muestreo; T, tejido; m, muestra; DDS, días después de la siembra

**Cuadro 6.6** Ejemplo de llenado de las placas para el análisis de RT-qPCR (por gen)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N1	N2	N3	TA S1m1.1	TA S1m1.2	TA S1m1.3	TA S1m2.1	TA S1m2.2	TA S1m2.3	5C S1m1.1	5C S1m1.2	5C S1m1.3
B	5C S1m2.1	5C S1m2.2	5C S1m2.3	TA S2m1.1	TA S2m1.2	TA S2m1.3	TA S2m2.1	TA S2m2.2	TA S2m2.3	5C S2m1.1	5C S2m1.2	5C S2m1.3
C	5C S1m2.1	5C S1m2.2	5C S1m2.3	TA S3m1.1	TA S3m1.2	TA S3m1.3	TA S3m2.1	TA S3m2.2	TA S3m2.3	5C S3m1.1	5C S3m1.2	5C S3m1.3
D	5C S3m2.1	5C S3m2.2	5C S3m2.3	TA S4m1.1	TA S4m1.2	TA S4m1.3	TA S4m2.1	TA S4m2.2	TA S4m2.3	5C S4m1.1	5C S4m1.2	5C S4m1.3
E	5C S4m2.1	5C S4m2.2	5C S4m2.3	TA S5m1.1	TA S5m1.2	TA S5m1.3	TA S5m2.1	TA S5m2.2	TA S5m2.3	5C S5m1.1	5C S5m1.2	5C S5m1.3
F	5C S5m2.1	5C S5m2.2	5C S5m2.3	TA M3 Bm1.1	TA M3 Bm1.2	TA M3 Bm1.3	TA M3 Bm2.1	TA M3 Bm2.2	TA M3 Bm2.3	TA M3 Ptm1.1	TA M3 Ptm1.2	TA M3 Ptm1.3
G	TA M3 Ptm2.1	TA M3 Ptm2.2	TA M3 Ptm2.3	TA M3 Hm1.1	TA M3 Hm1.2	TA M3 Hm1.3	TA M3 Hm2.1	TA M3 Hm2.2	TA M3 Hm2.3	5C M3 Bm1.1	5C M3 Bm1.2	5C M3 Bm1.3
H	5C M3 Bm2.1	5C M3 Bm2.2	5C M3 Bm2.3	5C M3 Ptm1.1	5C M3 Ptm1.2	5C M3 Ptm1.3	5C M3 Ptm2.1	5C M3 Ptm2.2	5C M3 Ptm2.3	5C M3 Hm1.1	5C M3 Hm1.2	5C M3 Hm1.3

Cada celda representa un pozo, identificados por coordenadas alfanuméricas; S semana; m, muestra; TA, temperatura ambiente; 5C, 5 °C; B, brote; Pt, pseudotallo; H, hoja

Cada placa se llevó por separado Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental, del IPICYT para su análisis mediante el equipo de PCR tiempo real 7500 FAST de Applied Biosystems (previamente se llenó y envió la solicitud del servicio); cada corrida se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando los programas determinados por el equipo.

Después de aproximadamente 2 horas por corrida, se obtuvieron los resultados para cada placa, los cuales fueron analizados con el programa 7500 software v 2.0 (Applied Biosystems, 2007), los cálculos se realizaron conforme a lo descrito por Livak y Schmittgen (2001).

### 6.2.3 Análisis del transcriptoma mediante secuenciación masiva (RNA-seq)

Con el fin conocer todos los transcritos que se están expresando en una condición dada, se extrajo ARN del brote de ajo almacenado a dos condiciones de temperatura a la quinta semana de almacenamiento mediante un protocolo híbrido modificado por Mejía-Teniente (comunicación personal, Anexo M).

Después de comprobar la integridad y la cantidad del ARN, este se mandó a los servicios genómicos del LANGEBIO (Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad) para su análisis de secuenciación por síntesis (SBS), utilizando la plataforma Illumina HiSeq2000.

Los datos obtenidos (crudos) fueron analizados mediante bioinformática por el Dr. Juan Caballero de la siguiente manera:

- 1) Análisis de calidad de los datos utilizando el software Fast QC Report.
- 2) La información obtenida fue ensamblada mediante el algoritmo llamado Trinity (Grabherr *et al.*, 2011), puesto que por el momento no se tiene el genoma del ajo y por lo tanto no hay datos de referencia para comparar ni alinear los resultados. Trinity conlleva tres pasos:

- a. Inchworm



b. Chrysalis

c. Butterfly

El resultado del ensamblaje por Trinity se analizó mediante el programa Fast QC, en el cual se realizó un mapeo, el cual fue alineado para después realizar un ajuste más fino secuencia por secuencia. Los fragmentos obtenidos se analizaron mediante el programa estadístico R edge R y se obtuvieron los transcritos expresados diferencialmente.

3) Por último cada archivo de transcritos diferenciales fue analizado mediante el programa Blast2Go (biobam), con el cual se llevaron a cabo procesos de alineamiento, mapeo y anotación.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

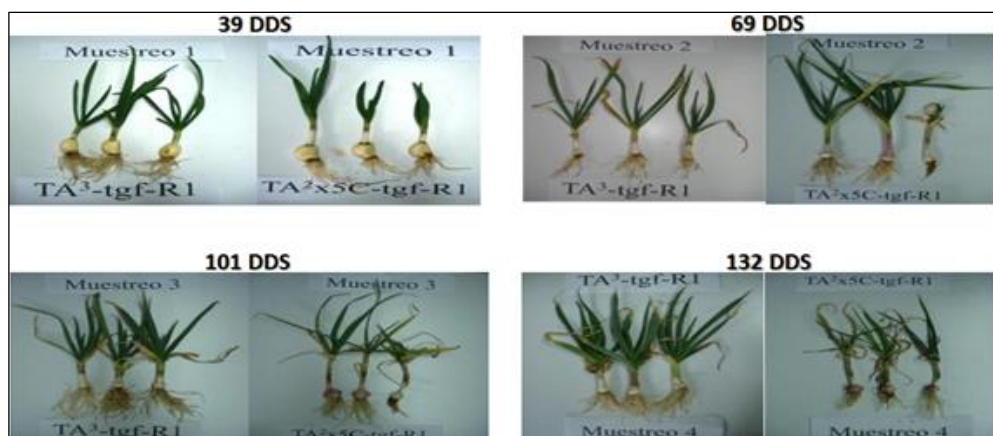
### 7.1 Estudio del crecimiento del cultivo en campo y bajo condiciones de temperatura semi controlada

Los dientes ‘semilla’ fueron sembrados con un día de diferencia en Aguascalientes (condiciones de campo) y Querétaro (temperatura semi-controlada), Durante el desarrollo, se realizaron seis muestreos de acuerdo a lo indicado en el Cuadro 7.1.

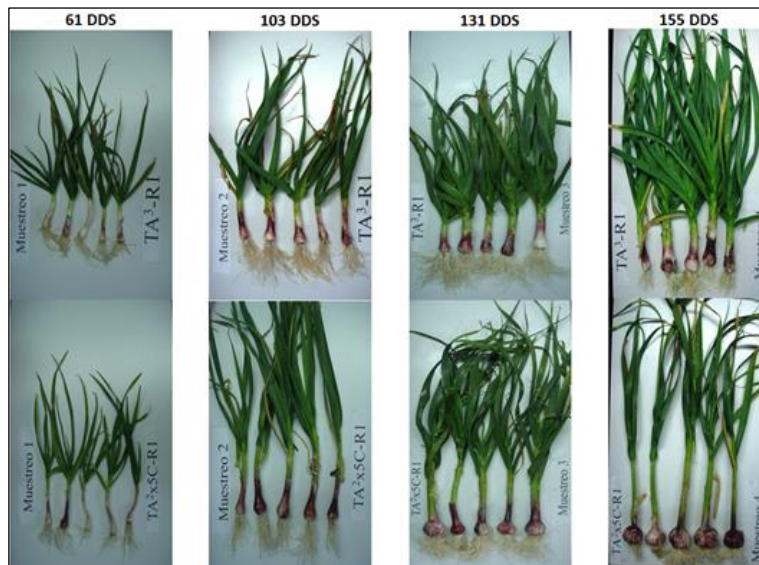
**Cuadro 7.1** Muestreos y días transcurridos después de la siembra

<b>Muestreo</b>	<b>Condición</b>			
	<b>Campo</b>	<b>Temperatura semi-controlada</b>		
	<i>Fecha</i>	<i>DDS</i>	<i>Fecha</i>	<i>DDS</i>
Siembra	6 oct 2011	0	7 oct 2011	0
1	6 dic 2011	61	15 nov 2011	39
2	16 ene 2012	102	15 dic 2011	69
3	14 feb 2012	131	16 ene 2012	101
4	9 mar 2012	155	15 feb 2012	131
5	24 abr 2012	201	15 mar 2012	160
6	11 may 2012	218	16 abr 2012	192

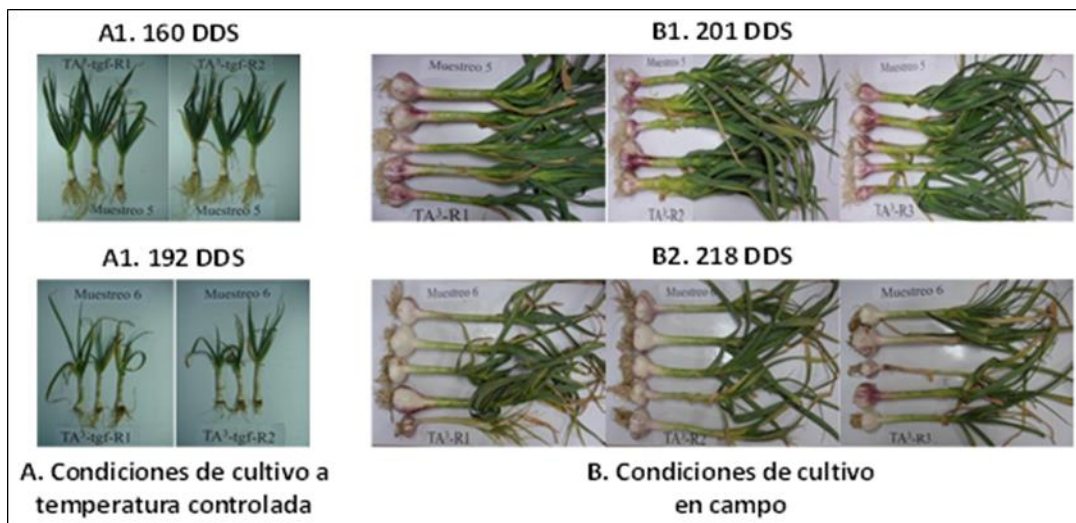
La figura 7.1 ilustra la comparación visual de los diferentes tratamientos para las plantas de ajo en ambiente semi controlado; mientras que la figura 7.2 muestra el desarrollo de las plantas en campo (Cosío, Ags.). Así mismo la figura 7.3 muestra las condiciones de esas plantas al momento de la cosecha. Las plantas cultivadas en condiciones semi controladas tuvieron un desarrollo notablemente inferior que las cultivadas a cielo abierto. Por ello, estos experimentos no permitieron determinar con precisión los efectos de controlar la temperatura en el desarrollo de la planta. No obstante, se presentan los datos observados.



**Figura 7.1** Desarrollo de las plantas en Querétaro



**Figura 7.2** Comparación visual del desarrollo del cultivo en condiciones de campo



**Figura 7.3** Fase final del desarrollo de cultivo para plantas procedentes de cultivo en condiciones semi controladas (A) y de cielo abierto (B)

El análisis de varianza de los datos de crecimiento para las condiciones semi controladas indicó los valores de probabilidad resumidos en la Tabla 7.2. El tratamiento de acondicionamiento tuvo efectos altamente significativos en el ancho de la hoja, diámetro del cuello, índice de bulbificación y peso de la planta. Como era de esperarse, los muestreos mostraron efectos altamente significativos así como la interacción tratamiento\*muestreo.

**Cuadro 7.2** Valor de probabilidad. Condiciones de cultivo con temperatura semi-controlada

	# hojas	Altura	Ancho de hoja	Diam. Cuello	Diam. Bulbo	IB	Peso
Tratamientos	0.0231*	0.6438 <sup>NS</sup>	<0.0001***	<0.0001***	0.0684 <sup>NS</sup>	<0.0001***	0.0044**
Muestreos	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***	0.005**	<0.0001***
Tratamientos* Muestreos	0.0448*	0.0245*	0.011*	<0.0001***	0.0353*	<0.0001***	0.0005***

\*\*\*= altamente significativo, \*\*= significativo, \*= poco significativo, NS= no significativo, IB= Índice de bulbificación

El Cuadro 7.3, muestra los valores de probabilidad indicados por el análisis de varianza de los datos de crecimiento de las plantas cultivadas a cielo abierto. También se observaron efectos altamente significativos en el ancho de la hoja,

diámetro del cuello, el índice de bulbificación y peso de la planta. Nuevamente el muestreo y la interacción tratamiento\*muestreo tuvieron diferencias altamente significativas.

**Cuadro 7.3** Valor de probabilidad. Condiciones campo

	# hojas	Altura	Ancho de hoja	Diam. Cuello	Diam. Bulbo	IB	Peso
Tratamientos	0.0007***	0.7596 <sup>NS</sup>	<0.0001***	<0.0001***	0.5712 <sup>NS</sup>	0.0056**	0.0091
Muestras	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***
Tratamientos*Muestras	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***	0.0457*	<0.0001***	0.0005***

\*\*\*= altamente significativo, \*\*= significativo, \*= poco significativo, NS= no significativo, IB= Índice de bulbificación

La duración del ciclo de cultivo tanto en condiciones de temperatura semi-controlada como en campo fue diferente: los productos obtenidos de dientes ‘semilla’ almacenada a 5 °C antes de la siembra se adelantaron en la cosecha por 79 y 58 días, respectivamente (Cuadro 7.4). Este adelanto coincidió con lo observado por López-Hernández (2010) y Zavala-Gutiérrez (2012).

**Cuadro 7.4** Duración del ciclo de cultivo

TRATAMIENTO	DURACIÓN (DDS)
- Condiciones semi controladas	
TA-SC	212
5C-SC	133
- Condiciones de campo	
TA	218
5C	160

En los cuadros 7.5 y 7.6 se presentan la comparación de medias de las variables de respuesta bajo condiciones de cultivo semi controlado y de cielo abierto respectivamente.

**Cuadro 7.5** Comparación de medias de las variables de crecimiento durante el desarrollo del ciclo de cultivo bajo condiciones semi controladas de temperatura

Trat.	M	DDS	No. Hojas	Altura (cm)	Ancho (cm)	DC (mm)	DB (mm)	IB = DB/DC	Peso (g)
TA	1	39	5.67 <sup>C</sup>	20.57 <sup>BC</sup>	1.17 <sup>C</sup>	5.28 <sup>C</sup>	10.52 <sup>D</sup>	2.00 <sup>B</sup>	5.19 <sup>DE</sup>
	2	69	6.50 <sup>BC</sup>	25.80 <sup>AB</sup>	1.31 <sup>BC</sup>	6.56 <sup>B</sup>	13.67 <sup>CD</sup>	2.10 <sup>B</sup>	8.36 <sup>CDE</sup>
	3	101	7.50 <sup>AB</sup>	26.48 <sup>A</sup>	1.46 <sup>AB</sup>	7.92 <sup>A</sup>	15.56 <sup>C</sup>	1.97 <sup>B</sup>	13.38 <sup>AB</sup>
	4	132	7.50 <sup>AB</sup>	27.75 <sup>A</sup>	1.73 <sup>A</sup>	8.66 <sup>A</sup>	16.49 <sup>BC</sup>	1.90 <sup>B</sup>	14.74 <sup>AB</sup>
	5	160	8.83	30.27	1.87	9.91	16.25	1.64	17.62
	6	192	8.67	27.35	1.38	7.10	15.34	2.16	11.14
5C	1	39	4.67 <sup>C</sup>	19.62 <sup>C</sup>	1.03 <sup>C</sup>	4.82 <sup>CD</sup>	10.08 <sup>D</sup>	2.10 <sup>B</sup>	4.67 <sup>E</sup>
	2	69	6.83 <sup>AB</sup>	30.17 <sup>A</sup>	1.27 <sup>BC</sup>	5.73 <sup>BC</sup>	15.50 <sup>C</sup>	2.73 <sup>B</sup>	9.90 <sup>BC</sup>
	3	101	8.33 <sup>A</sup>	31.63 <sup>A</sup>	1.21 <sup>BC</sup>	4.79 <sup>CD</sup>	19.37 <sup>AB</sup>	4.11 <sup>A</sup>	10.90 <sup>BC</sup>
	4	132	6.17 <sup>BC</sup>	26.42 <sup>AB</sup>	1.27 <sup>BC</sup>	4.06 <sup>CD</sup>	20.50 <sup>A</sup>	5.25 <sup>A</sup>	8.74 <sup>CD</sup>

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre tratamientos y muestreos: prueba de Tukey,  $\alpha = 0.05$ . M = muestreo; DDS = días después de la siembra; DC = diámetro del cuello; DB = diámetro del bulbo; IB = Índice de bulbificación

**Cuadro 7.6** Comparación de medias de las variables de crecimiento durante el desarrollo del ciclo de cultivo bajo condiciones de campo

Trat.	M	DDS	No. Hojas	Altura (cm)	Ancho (cm)	DC (mm)	DB (mm)	IB	Peso (g)
TA	1	61	7.67 <sup>CD</sup>	36.19 <sup>E</sup>	1.75 <sup>EF</sup>	9.77 <sup>D</sup>	15.65 <sup>E</sup>	1.61 <sup>D</sup>	15.21 <sup>B</sup>
	2	103	8.53 <sup>BC</sup>	47.92 <sup>D</sup>	3.05 <sup>B</sup>	14.59 <sup>C</sup>	24.89 <sup>D</sup>	1.71 <sup>D</sup>	46.56 <sup>B</sup>
	3	132	9.73 <sup>AB</sup>	58.83 <sup>C</sup>	3.66 <sup>A</sup>	20.37 <sup>A</sup>	34.99 <sup>C</sup>	1.72 <sup>D</sup>	115.42 <sup>A</sup>
	4	155	10.73 <sup>A</sup>	72.09 <sup>AB</sup>	3.68 <sup>A</sup>	20.82 <sup>A</sup>	35.19 <sup>C</sup>	1.69 <sup>D</sup>	144.67 <sup>A</sup>
	5	201	7.73	95.91	3.07	23.10	59.56	2.59	237.11
	6	218	5.07	82.79	2.69	17.36	66.78	4.06	203.13
5C	1	61	7.13 <sup>CD</sup>	38.66 <sup>E</sup>	1.63 <sup>F</sup>	8.43 <sup>D</sup>	17.00 <sup>E</sup>	2.03 <sup>CD</sup>	13.80 <sup>B</sup>
	2	103	7.87 <sup>CD</sup>	63.71 <sup>BC</sup>	2.56 <sup>CD</sup>	13.55 <sup>C</sup>	29.77 <sup>CD</sup>	2.23 <sup>BC</sup>	53.54 <sup>B</sup>
	3	132	6.73 <sup>D</sup>	78.23 <sup>A</sup>	2.86 <sup>BC</sup>	18.26 <sup>AB</sup>	47.39 <sup>B</sup>	2.63 <sup>B</sup>	133.59 <sup>A</sup>
	4	155	6.60 <sup>D</sup>	77.67 <sup>A</sup>	2.16 <sup>DE</sup>	16.00 <sup>BC</sup>	56.88 <sup>A</sup>	3.77 <sup>A</sup>	154.34 <sup>A</sup>

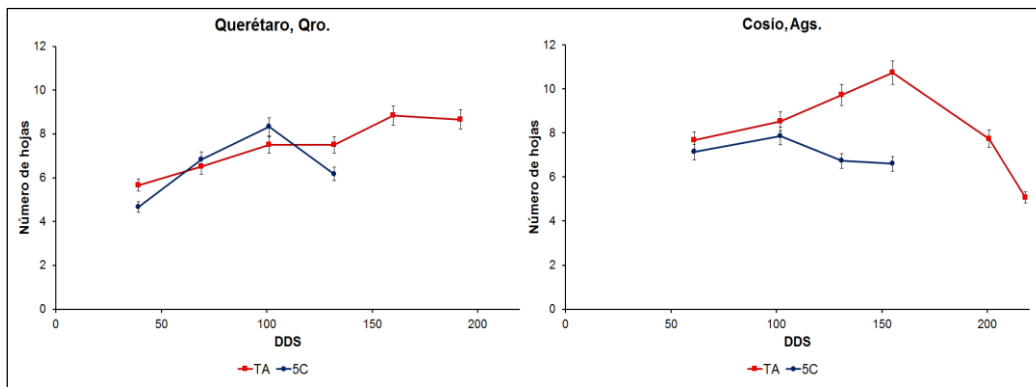
Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos\*muestreos: prueba de Tukey,  $\alpha = 0.05$ . M = muestreo; DDS = días después de la siembra; DC = diámetro del cuello; DB = diámetro del bulbo; IB = Índice de bulbificación

Las figuras (7.4 a 7.10) muestran, de forma separada, cada variable respuesta tanto en condiciones de cultivo a temperatura semi-controlada como en campo. El número de hojas, su ancho, la altura de la planta, el peso de la misma; así como los diámetros del cuello, del bulbo fueron notablemente menores en las plantas mantenidas en macetas respecto de las plantas cultivadas a cielo abierto. Esto señaló que hubo otro u otros factores que limitaron de manera drástica el desarrollo de las plantas. Dentro de estos factores pudo ser la alta compactación del suelo de las macetas que pareció facilitarse con los movimientos diarios de las macetas para cambiarlas a sus condiciones ambientales programadas.

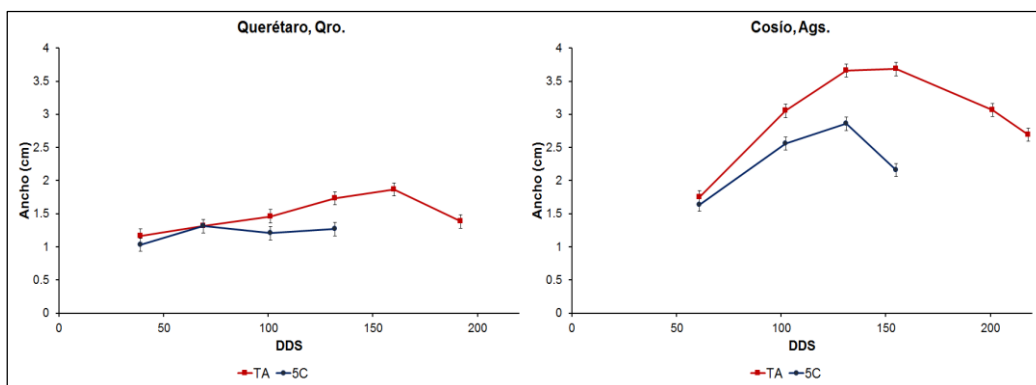
A pesar de esas fuertes diferencias con los experimentos a cielo abierto, la condición de almacenamiento a 5 °C así como la acumulación de horas frío durante el desarrollo mostró diferencias con las plantas TA.

En general, los valores de las variables aumentaron conforme avanzó el desarrollo de la planta; sin embargo, el número y ancho de las hojas, la altura así como el diámetro del cuello disminuyeron cuando inició la senescencia del área foliar y la bulbificación (Ledesma *et al.*, 1997).

Las plantas cultivadas en maceta no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos en el número de hojas (Figura 7.4); no obstante, el ancho de las hojas de las plantas 5C (Figura 7.5) no se incrementó durante el desarrollo señalando que la baja temperatura en conjunto con el estrés del cultivo en maceta alteró de manera evidente el desarrollo de las hojas.



**Figura 7.4** Número de hojas

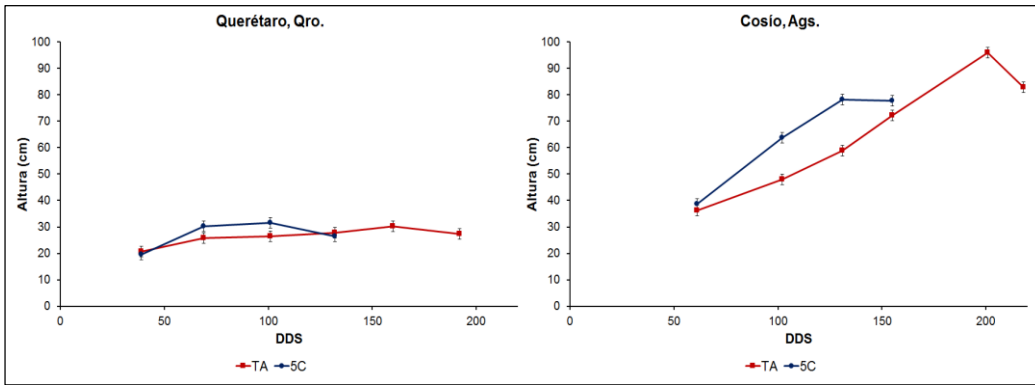


**Figura 7.5** Ancho de hojas

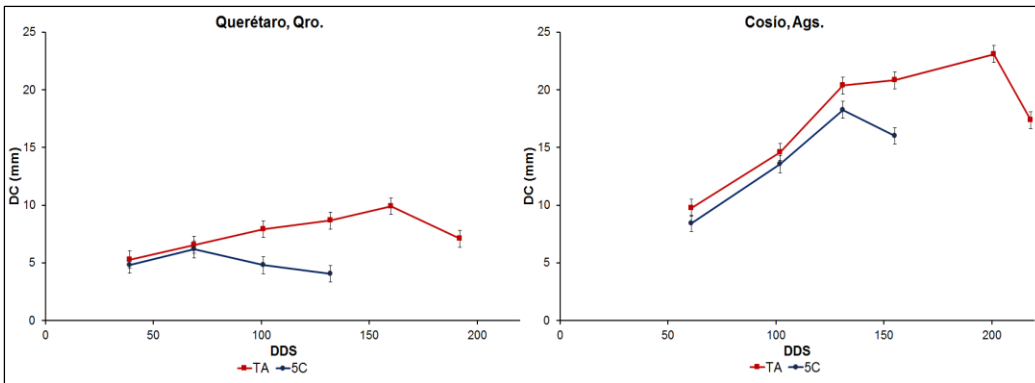
Para la variable altura, tanto para la condición de temperatura semi controlada como para la de campo, esta va aumentando conforme el ciclo de cultivo, sin embargo, su tamaño empieza a decaer al inicio de la senescencia (101 y 160 DDS para 5C y TA de la condición SC; y para el campo a 131 y 201 DDS para 5C y TA respectivamente; Figura 7.6).

Dentro del periodo de 155 DAS, las variables diámetro del cuello y diámetro del bulbo, se comportaron de manera similar (Figuras 7.7 y 7.8); las plantas generadas de dientes semilla 5C mostraron alturas mayores y diámetros del cuello y bulbo mayores que las plantas TA. No obstante, las plantas cultivadas en macetas fueron notablemente más pequeñas que las cultivadas a cielo abierto en Cosío, Aguascalientes.

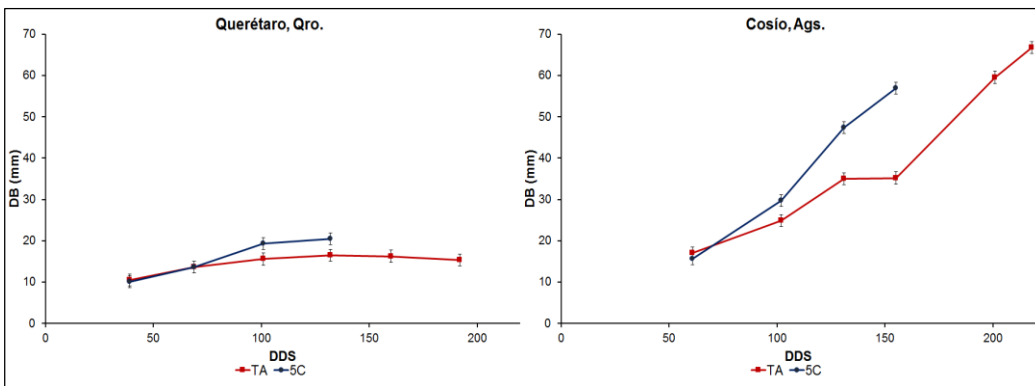




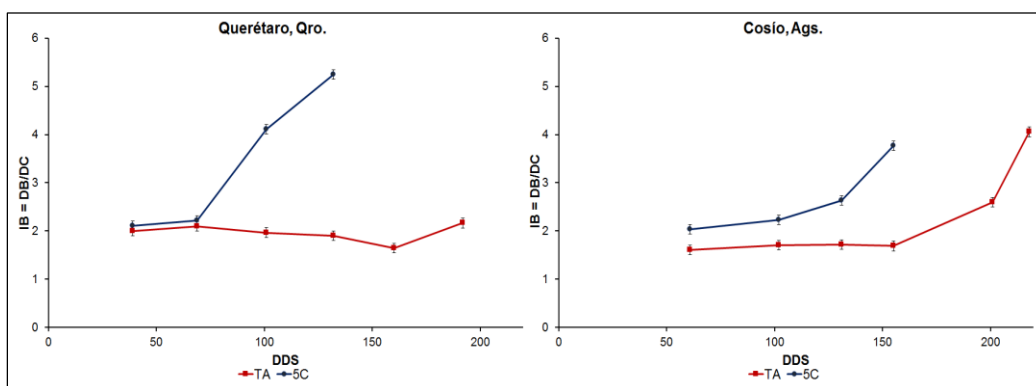
**Figura 7.6** Altura de la planta



**Figura 7.7** Diámetro del cuello (DC)



**Figura 7.8** Diámetro del bulbo (DB)



**Figura 7.9** Índice de bulbificación (IB)

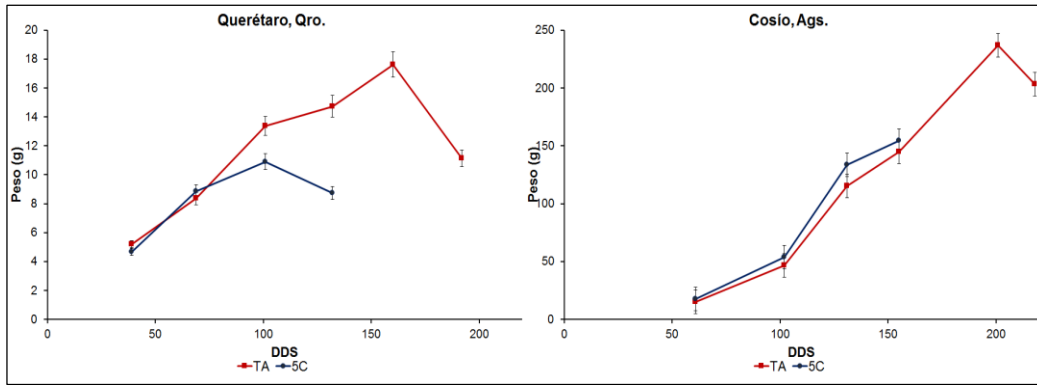
Ledesma et al., (1997) observaron que el inicio del llenado del bulbo corresponde con la disminución en el ritmo de crecimiento de la planta y el inicio de la senescencia de las hojas, lo cual puede acelerar el transporte de fotosintatos desde las hojas y el pseudotallo hacia el bulbo. Este aspecto puede estar relacionado con la disminución del diámetro del cuello observado (Figura 7.7), el aumento del diámetro del bulbo (Figura 7.8) y el mayor índice de bulbificación (Figura 7.9) de las plantas provenientes de dientes “semilla” o bulbillos almacenados a 5 °C antes de la siembra. No obstante, si se comparan estas mismas variables al final del periodo de crecimiento de las plantas TA, todos los valores de estas variables se invirtieron; es decir que las plantas TA tuvieron mayor altura, mayor peso y mayores diámetros de cuello y bulbo. Lo cual dio como resultado un mayor rendimiento de producción de bulbos.

La disminución del tamaño del cuello, pudiera estar relacionada con el transporte de fructanos del pseudotallo hacia el bulbo (López-Hernández, 2010; Vázquez-Mandujano, 2009); las plantas 5C mostraron una mayor reducción del diámetro del cuello, lo cual ocurrió a partir del 101 DDS en condiciones semi controladas y 132 DDS en condiciones de campo; mientras que en las plantas TA se observó, hasta los 192 y 201 DDS.

El peso de la planta durante el desarrollo del cultivo en condiciones de campo (Cosío, Ags.; Figura 7.10) va aumentando conforme transcurrió el tiempo, y el análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre los tratamientos

hasta el 4° muestreo. Sin embargo, al final del ciclo, las plantas TA, presentaron mayor peso (203.12 g) que las plantas 5C (154.34 g), como lo observaron López-Hernández (2010) y Zavala-Gutiérrez (2011).

De forma general, todos estos datos mostraron que el cultivo en macetas alteró negativamente el crecimiento de las plantas de ajo aunque sí se observó una inducción del crecimiento en los plantas 5C.



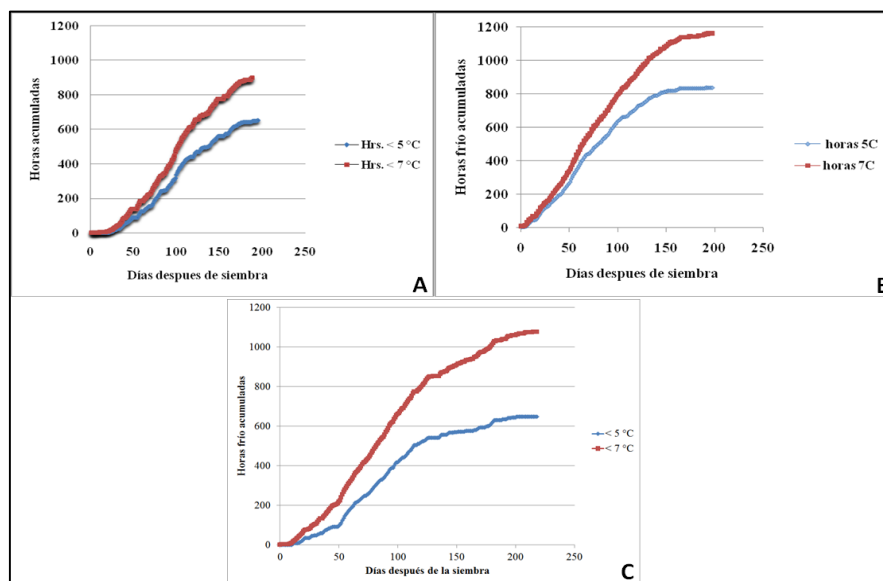
**Figura 7.10** Peso de planta

Para las plantas cultivadas en campo, Zavala-Gutiérrez (2011), señaló, para la temporada 2010-2011, la presencia de escapo floral en ambas condiciones de almacenamiento (5 °C y TA), y no observó bulbos acebollados o no diferenciados. En la temporada 2011-2012, se observó escapo floral (Figura 7.11A) en el 60 y 80 % de las plantas TA y 5C respectivamente, el 100 % de las plantas TA exhibieron crecimiento secundario o rebrotes (Figura 7.11B) y 40 % de bulbos acebollados (Figura 7.11C).



**Figura 7.11A** Escapo florar presente en la planta de ajo.  
**Defectos en el ajo. B.** ajo rebrotado. **C.** Ajo no diferenciado o acebollado

Estas diferencias de producción de defectos pudieran ser explicados por la diferente acumulación de horas frío en las dos temporadas analizadas. No obstante está comparación no explicó estos resultados. En la temporada 2010-2011 se registró el mayor número de horas de frío (837 horas por debajo de 5 °C y 1159 por debajo de 7 °C) (Figura 7.12B); mientras que en la temporada 2011-2012 se acumularon 648 horas a 5 °C y 1078 h para < 7 °C (Figura 7.12C). No obstante, los registros de horas frío de la temporada 2009-2010 se registraron 652 y 858 horas a 5 y 7°C respectivamente (Figura 7.12A) valores parecidos a la temporada 2011-2012.



**Figura 7.12** Acumulación de horas frío. **A.** Temporada 2009-2010. **B.** Temporada 2010-2011. **C.** Temporada 2011-2012

Con el objeto de entender un poco más el efecto de la acumulación de las horas de frío, se comparó esta acumulación en diferentes meses después de la siembra para las tres temporadas indicadas. En el cuadro 7.7 se muestra la acumulación de horas frío en los primeros 120 DDS.

**Cuadro 7.7** Acumulación de horas frío

DDS	2009-2010		2010-2011		2011-2012	
	< 5 °C	< 7 °C	< 5 °C	< 7 °C	< 5 °C	< 7 °C
30	21	37	140	178	48	104
60	126	183	367	455	183	322
90	268	379	555	703	353	570
120	452	673	719	920	520	798

Como se puede observar, durante 2010-2011, hubo una mayor acumulación de horas frío. En el cuarto mes de la temporada 2011-2012, las horas acumuladas representaron el 72 % de las horas que se acumularon en el mismo periodo en la temporada 2010-2011; pero 15 % más que en 2009-2010. Estas condiciones parecieran señalar que en la temporada 2011-2012 no deberían haberse presentado mayores problemas de defectos y sin embargo no fue así. La comparación con la temporada 2010-2011 muestran acumulaciones similares con la temporada 2010-2011 pero en aquella temporada hubo menos defectos que en la temporada 2011-2012. Estos datos sugieren que aunque las bajas temperaturas son importantes para una adecuada formación del bulbo, pueden existir la participación de otros factores aun no determinados.

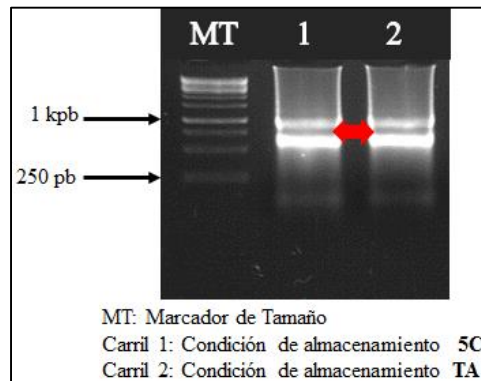
## 7.2 Análisis de expresión genética durante el almacenamiento

### 7.2.1 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)

#### 7.2.1.1 Extracción de ARN

En la Figura 7.13 se muestran las dos bandas características de los ARN ribosomales 28S y 18S (flecha rojas) y el barrido del ARN total extraído; por lo que podemos decir que el ARN extraído fue de buena calidad. La cantidad de ARN

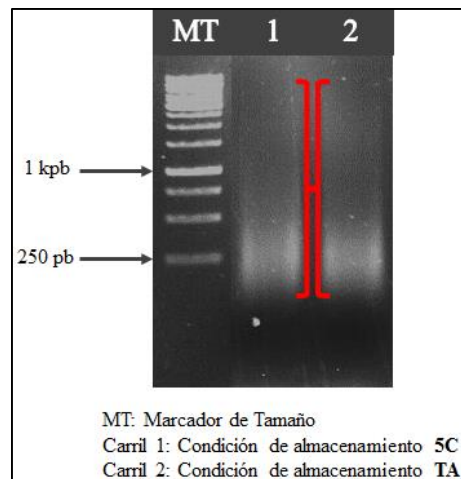
extraída fue  $0.60 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  para la condición de 5C y  $0.65 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  para TA. Estos datos son similares a lo encontrado por Zavala-Gutiérrez, (2011) quien señaló una concentración de  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de ARN total en la condición de almacenamiento a baja temperatura y  $1.4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  para el almacenamiento a temperatura ambiente.



**Figura 7.13** Extracción de ARN

#### 7.2.1.2 Síntesis de ADNc

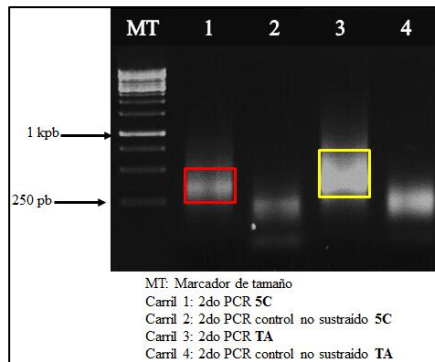
En la figura 7.14, se muestra la electroforesis de los ADNc para ambas condiciones de almacenamiento en la cual se puede observar el barrido (corchete rojo) que representa el ADNc de doble cadena (Figura 7.14).



**Figura 7.14** ADN complementario

### 7.2.1.3 Hibridación sustractiva (SSH)

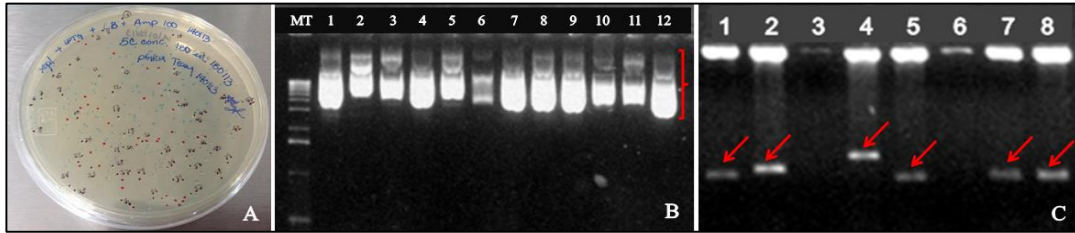
Partiendo de aproximadamente 400 ng (5C) y de 150 ng (TA) de ADNc purificado se llevó a cabo la hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión, obteniéndose dos bandas correspondientes a un tamaño de entre 200-700 pb (Figura 7.15), una representa los transcritos sobre expresados (condición 5C, recuadro rojo) y la otra indica los expresados en la condición de TA (recuadro amarillo).



**Figura 7.15** Resultado SSH. Recuadros rojo y amarillo, de transcritos sustractivos para la condición de 5 °C y TA, respectivamente

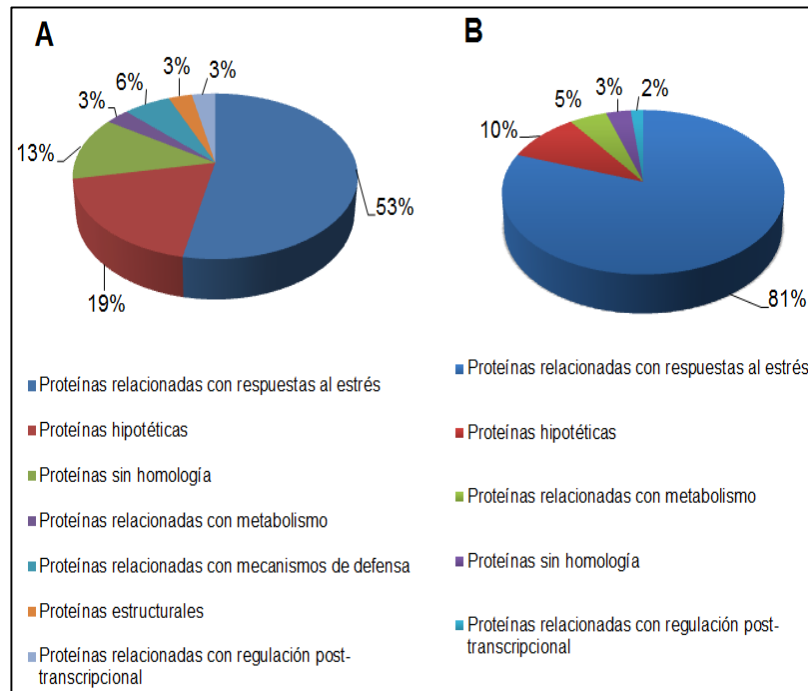
### 7.2.2 Obtención de transcritos diferencialmente expresados

El crecimiento de las células transformadas se observa en la figura 7.16A, los puntos negros son las colonias blancas, las que posiblemente presenten el inserto; y los puntos rojos son las colonias azul tenue. El ADN plasmídico que se extrajo de ambos tipos de colonias, se indica con corchetes rojos en la Figura 7.16B, en la cual se observan las bandas que indican la presencia del vector. En la 7.16C, se muestra la fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en la cual se indican, con flechas rojas, las clonas que presentaron inserto; las cuales se mandaron a secuenciar. El total de colonias obtenidas que presentaron inserto fue de 32 para la condición 5C y de 62 para TA.



**Figura 7.16** A. Células transformadas. B. Extracción de ADN plasmídico. C. Confirmación de la presencia del inserto en las clonas

Al comparar en la base de datos blastx del NCBI (Altschul et al., 1990), se determinó que de las 94 secuencias obtenidas (EST o fragmentos expresados diferencialmente), se encontraron homologías para 10 proteínas en la condición 5C y 11 para TA. Adicionalmente en la condición 5C se observaron 4 EST que no tuvieron homología y 2 para la condición TA. En la Figura 7.17 se muestra la relación porcentual de las clonas secuenciadas de acuerdo a su función (Marchler-Bauer et al., 2013).



**Figura 7.17** Clasificación de los fragmentos expresados diferencialmente (ESTs) según su función. A. 5 °C. B. Temperatura ambiente



De acuerdo a la base de datos contrastada, parece haber una mayor diversidad de funciones de los tipos de proteínas encontrados en la condición 5C en comparación con la condición TA; en 5C, al parecer hay proteínas relacionadas con la estructura de la célula, en este caso se trata de la proteína histona H2B que forma parte del nucleosoma y está relacionada con el mantenimiento de la integridad estructural del nucleosoma, condensación de la cromatina y por lo tanto en la regulación de la expresión del ADN. Otros ESTs estuvieron relacionados con los mecanismos de defensa como la Quitinasa a la que se le asocian funciones antifúngicas además de un papel en la respuesta a estrés no específico y puede ser regulada por el desarrollo (Graham y Sticklen, 1994). En ajo se han caracterizado tres isoformas tanto en hojas como en bulbos (Van Damme *et al.*, 1993).

En los cuadros 7.7 y 7.8 se hace una recopilación de los ESTs analizados, para las plantas 5C y TA respectivamente; su homología determinada en el NCBI, su valor E y su número de acceso al NCBI.

**Cuadro 7.8** Homología de EST's expresados en la condición de almacenamiento 5 °C

Clonas	Nombre	Valor E	No. de acceso
5C-T5 y 5CAAt-T98	Tar1p [ <i>Medicago truncatula</i> ]	$1 \times 10^{-17}$	XP_003614391.1
5C-T24, T25, T51, T55, T56, T76, T94, T104, T114, T124, T155, T159, T162, T164, T177 y 5CAAt-T10	Proteína hipotética SORBIDRAFT_0057s002150 [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	$10^{-17}$ a $10^{-38}$	XP_002489117.1
5C-T109	Inhibidor de tripsina [ <i>Allium cepa</i> ]	1.8	BAB88746.1
5C-T147, 5CAAt-T13	Proteína hipotética MTR_5g051130 [ <i>Medicago truncatula</i> ]	$10^{-22}$ a $10^{-32}$	XP_003614394.1
5C-T158, 5C-T119	Proteína hipotética MTR_5g051140 [ <i>Medicago truncatula</i> ]	$10^{-22}$ a $10^{-23}$	XP_003614395.1
5C-T27	Sacarosa:sacarosa fructosil transferasa (1-SST) [ <i>Allium sativum</i> L.]	0.027	AAM21931.1
5C-T113	Proteína putativa regulada por el frío [ <i>Allium sativum</i> ]	2.9	AEX55232.1
5C-T142	Quitinasa, parcial [ <i>Allium sativum</i> ]	9.4	AAA32641.1
5C-T145	Histona H2B-1 [ <i>Lolium perenne</i> ]	$1 \times 10^{-15}$	AAK48889.1
5C-T160	Predicción: proteína parecida a TAR-1 [ <i>Glycine max</i> ]	$5 \times 10^{-15}$	XP_003541235.1
5C-T23, T106, T111 y 5CAAt-T78	Sin homología	–	–

**Cuadro 7.9** Homología de EST's expresados en la condición de almacenamiento TA

Clonas	Nombre	Valor E	No. de acceso
TA-T1, T2, T6, T9, T13, T29, T33, T34, T36, T42, T44, T47, T62, T63, T64, T48, T49, T52, T53, T56, T57, T59, T60, T61, T65, T77, T82 T86, T87, T89, T90, T94, T96, T99, T102, T106, T107, T108, T109, T112, T118 y 5CAAt-T1, T5, T6, T8, T9	Proteína hipotética SORBIDRAFT_0057s002150 [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	10 <sup>-15</sup> a 10 <sup>-41</sup>	XP_002489117.1
TA-T38 y T40	Proteína de choque térmico 90-1 [ <i>Cryptocoryne ciliata</i> ]	8 x 10 <sup>-32</sup>	ADC53692.1
TA-T55	Proteína hipotética VITISV 039385 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	5 x 10 <sup>-23</sup>	CAN72686.1
TA-T88	Proteína TAR1 [ <i>Medicago truncatula</i> ]	8.1	XP_003614364.1
TA-T95	Proteína hipotética SORBIDRAFT_03g026930 [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	7 x 10 <sup>-6</sup>	XP_002458100.1
TA-T97 y T103	Proteína hipotética SORBIDRAFT_01g023641 [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	10 <sup>-17</sup> a 10 <sup>-23</sup>	XP_002464695.1
TA-T68 y T69	Proteína hipotética SORBIDRAFT_04g030880 [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	3.5	XP_002452699.1
TA-T37	Cisteína sintasa GCS3 [ <i>Allium sativum</i> L.]	0.22	AAX07222.1
TA-T84	Transportador de azúcar	2.0	AEX55225.1
TA-T91 y T110	FRIGIDA	1.1 a 6	AAS68532.1
TA-T79	NADH deshidrogenasa subunidad 4	0.83	CAB96188.2
TA-T58 y T85	Sin homología		

Zavala-Gutiérrez (2011) utilizando otra técnica diferente, obtuvo 85 clonas, y el análisis bioinformático arrojó homología con genes que codifican para fenil alanin amonio liasa (PAL), 4-coumarato:coenzima A ligasa (4CL), cinamato 4-hidroxilasa (C4H) y la sacarosa:sacarosa fructosil transferasa (1-SST); las tres primeras involucradas en el metabolismo de los fenilpropanoides (Tuan et al., 2010) y la última en la síntesis de fructanos (Heldt y Heldt, 2010). Con excepción de la 1-SST, los resultados de este estudio no coinciden con los resultados reportados por esta autora. La diferente técnica utilizada pudiera ser una explicación a estas diferencias.

Con el fin de analizar el perfil de expresión a través del tiempo de almacenamiento de algunos genes encontrados, se escogieron 8 secuencias (Cuadro 7.10) para el diseño y síntesis de oligonucleótidos (Cuadro 7.11) que servirían para realizar las reacciones en cadena de la polimerasa correspondientes.

**Cuadro 7.10** Secuencias de clonas utilizadas para del diseño de oligonucleótidos

#	Clona	Proteína	Observaciones
1	5C-T56	Proteína hipotética SORBIDRAFT_0057s002150 [ <i>Sorghum bicolor</i> ] (Paterson <i>et al.</i> , 2009)	Proteína con una posible relación a la respuesta al estrés por frío (Gupta y Deswal, 2012).
2	5C-T27	1 Sacarosa:sacarosa fructosiltransferasa (1-SST) [ <i>Allium sativum</i> ] (Lue, 2002).	Enzima que cataliza la primera reacción en la biosíntesis de fructanos (Heldt y Heldt, 2010)
3	5C-T113	Proteína putativa regulada por el frío [ <i>Allium sativum</i> ] (Son <i>et al.</i> , 2012)	Proteína denominada por Son <i>et al.</i> (2012) como regulada por giberelinas y Oono <i>et al.</i> (2006) indica que este tipo de proteínas están sobre-expresadas en <i>Arabidopsis thaliana</i> como respuesta al tratamiento con frío.
4	TA-T110	FRIGIDA, parcial [ <i>Allium sativum</i> ] (Rotem <i>et al.</i> , 2004)	Johanson <i>et al.</i> (2000) reportaron que este gen hace que los niveles de ARN de <i>FLC</i> (locus de floración C, por sus siglas en inglés) se eleven, por lo que al expresarse FLC la floración se reprime. Cuando hay una exposición al frío, <i>FLC</i> disminuye y la floración se vuelve posible. Este grupo de investigadores indicaron que el tiempo de floración (temprano o tardío) en <i>A. thaliana</i> depende de la expresión de este gen.
5	TA-T37	Cisteína sintasa GCS3 [ <i>Allium sativum</i> ]	Enzima implicada en la biosíntesis de los compuestos característicos del aroma y sabor del ajo (Jones <i>et al.</i> , 2007).

#	Clona	Proteína	Observaciones
6	TA-T84	Transportador de azúcar [ <i>Allium sativum</i> ] (Son <i>et al.</i> , 2012)	Posiblemente una proteína transmembranal cuyos azúcares que transporta mantienen la homeostasis y ósmosis celular (Son <i>et al.</i> , 2012).
7	TA-T79	NADH deshidrogenasa subunidad 4 [ <i>Allium sativum</i> ] (López-Serrano <i>et al.</i> , 2001)	López-Serrano <i>et al.</i> (2001) indicaron diferencias en la secuencia de nucleótidos que codifican para esta proteína en las liliáceas, y modificaciones que no se han reportado en otras plantas; lo cual sugiere que la síntesis de la proteína está controlada a nivel de la transcripción.
8	K33A	Fenilalanil amonio liasa (PAL) [ <i>Allium sativum</i> ] (Tuan <i>et al.</i> , 2010)	Enzima que participa en la biosíntesis de los fenilpropanoides (Tuan <i>et al.</i> , 2010). Zavala-Gutiérrez (2011) indicó que esta enzima está sobre-expresada al final del almacenamiento a 5 °C en los brotes de semilla de ajo.

**Cuadro 7.11** Oligonucleótidos diseñados

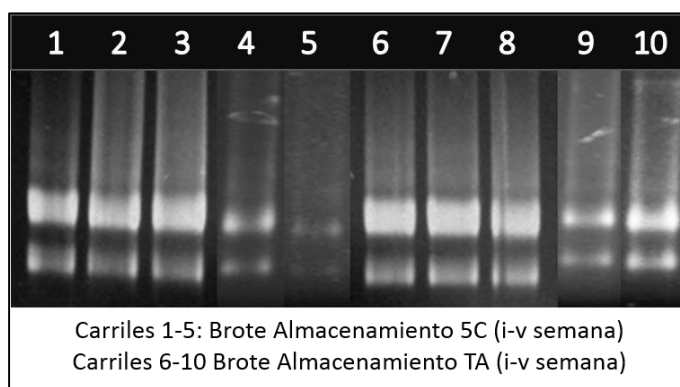
<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>	<b>Oligo sentido</b>	<b>Oligo antisentido</b>
As_SORBI	<i>Allium sativum</i> SORBIDRAFT_0057s00215 0	5'-TCGCGGCCGAGGTACGTGTTAGCTA-3'	5'-TTAGTAACGGCGAGCGAATCGGGAA-3'
As_1-SST	<i>Allium sativum</i> Sacarosa:sacarosa fructosiltransferasa	5'-TTTTTTTTTCCGACGGCTTC-3'	5'-GGTACCAATGATCGGGAATA-3'
As_PCRP	<i>Allium sativum</i> Proteína putativa regulada por el frío	5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTA-3'	5'-CCGGGCAGGTACAGGCTTTT-3'
As_FRIGIDA	<i>Allium sativum</i> FRIGIDA	5'-TGGTCGCGGCCGAGGTATTCTGAGA-3'	5'-CAAGTCCATAATTGCAGAGC-3'
As_CSGCS3	<i>Allium sativum</i> Cisteína sintasa GCS3	5'-TAAGGCAAGCGTGGGTTGAATTGGC-3'	5'-CCAGCACCTCCTGTCCCAAGAGAA-3'
As_ST	<i>Allium sativum</i> Transportador de azúcar	5'-CTAGTCCTGCAGGTTTAAAC-3'	5'-AGGACAAGATGGCTAAAAC-3'
As_NADHd4	<i>Allium sativum</i> NADH des 4	5'-TAGTTGCCTTGTAGGCAATAT-3'	5'-GCAATGTAACACAAGTTCTC-3'
As_PAL	<i>A. sativum</i> fenilalanila amonio liasa	5'-AAACCTCAAACACCAACAAC-3'	5'-TTAGCGTTGCGTAGTACGAA-3'

## 7.2.3 Análisis del nivel de expresión durante el almacenamiento

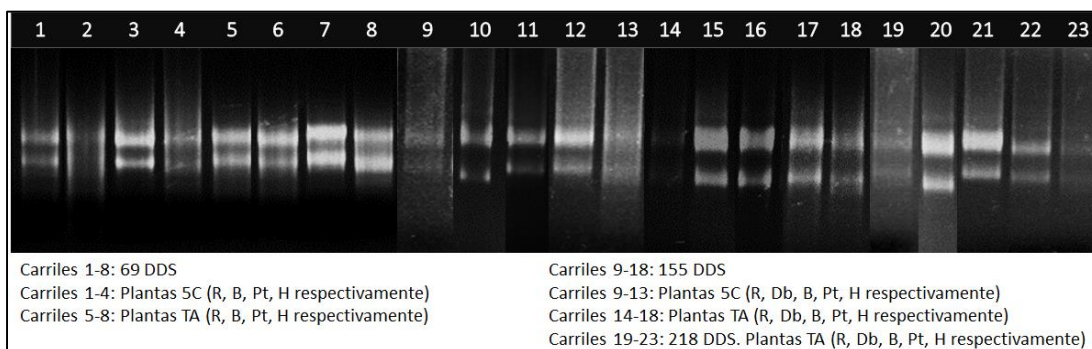
### 7.2.3.1 RT-PCR

#### 7.2.3.1.1 Síntesis de ADNc

En la figura 7.18 se muestra el gel de agarosa desnaturalizante del RNA de las muestras del periodo de almacenamiento pre-siembra (a 5C y TA) y la figura 7.19, el RNA de las muestras de raíz, bulbo, pseudotallo y hojas obtenidos durante el desarrollo del cultivo.



**Figura 7.18** Extracción de ARN de brotes de ajo durante el almacenamiento pre-siembra.



**Figura 7.19** Extracción de ARN de tejido vegetal durante el desarrollo del cultivo

Para la síntesis de ADNc se partió de una cantidad homogénea de ARN para todas las muestras (Cuadros 7.12 y 7.13).



**Cuadro 7.12** Cuantificación de ADNc para muestras de brotes durante el almacenamiento

Semana	ADNc ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )				
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>
TA	2.1721	2.7412	2.6245	2.7427	2.6641
5C	2.6468	2.4470	2.2147	2.757	2.3249

**Cuadro 7.13** Cuantificación de ADNc para diferentes órganos obtenidos durante el desarrollo del cultivo

DDS*	ADNc ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )														
	69				155					218					
Tejido	R	B	Pt	H	R	Db	B	Pt	H	R	Db	B	Pt	H	
P. TA	2.05	2.11	2.14	2.10	2.08	2.12	2.04	1.84	2.06	2.14	2.08	2.14	2.14	2.10	
P. 5C	2.52	2.65	2.97	2.15	2.08	2.09	2.15	2.23	1.99	-	-	-	-	-	

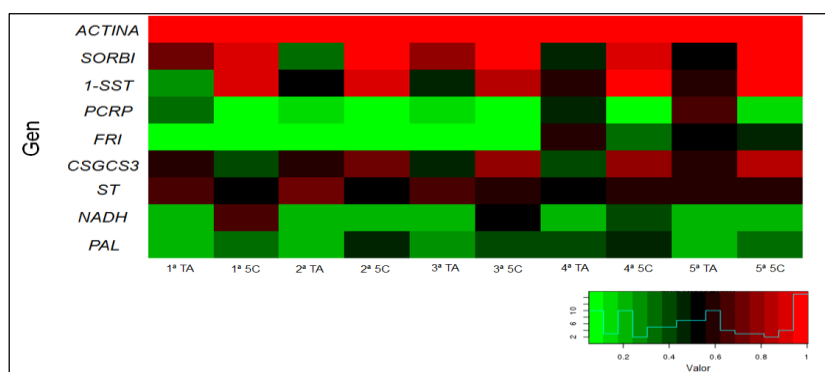
\* DDS, días después de la siembra; P., plantas; Br, brote; R, raíz; Db, disco basal; B, bulbo; Pt, pseudotallo; H, hoja

Todas las muestras se llevaron a una misma concentración de ADN (500 ng/ $\mu\text{L}$ ) para realizar los RT-PCRs.

### 7.2.3.1.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa

#### 7.2.3.1.2.1 Análisis de expresión de genes durante el almacenamiento

En la Figura 7.20 se muestra el heatmap del nivel de expresión de los 8 genes escogidos.



**Figura 7.20** Heatmap del nivel de expresión durante el almacenamiento de los dientes semilla a TA y 5 °C. En el eje de las abscisas se muestran las semanas durante el almacenamiento y en el de las ordenadas los genes analizados. A mayor expresión de un gen, más cercano a rojo; y a menor expresión, más cercano a verde

El gen *SORBIDRAFT*, se sobre expresó en la condición de almacenamiento a 5 °C durante todas las semanas. Por los datos incluidos en el NCBI, este EST parece estar involucrado en diferentes rutas metabólicas como en el metabolismo del glutatión y también se le asocia una relación con las respuestas al estrés de frío (Gupta y Deswal, 2012).

Para la sacarosa:sacarosa fructosil transferasa (1-SST), se observó una clara sobre expresión de 1-SST a las 5 semanas de almacenamiento en la condición 5C, lo que podría sugerir un inicio temprano/adelantado de la síntesis de fructanos (Ver sección 7.2.4). El que se observen expresión de genes desde etapas muy tempranas como el almacenamiento de la semilla ha sido descrita por otros autores en otras plantas; Lee y Amasino (1995) sugieren que los tratamientos de frío en la vernalización no sólo actúan sobre los genes que tienen relación con la floración, y señalan que la expresión genética durante el mismo periodo puede ser más importante que la expresión durante el desarrollo de la planta.

La expresión de la proteína putativa regulada por el frío (*PCRP*) prácticamente no fue alterada durante el almacenamiento a 5 °C, mientras que tuvo una mayor expresión en la condición de almacenamiento a TA con una tendencia a incrementarse conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento. Este hecho sugiere que las bajas temperaturas regulan de forma negativa la expresión de este gen.

La función del gen *FRIGIDA* se describe como elemento que retrasa la floración activando la expresión del gen *FLC* el cual es un represor de la floración (Choi *et al.*, 2011); De acuerdo con este concepto, las primeras tres semanas de almacenamiento la baja expresión de *FRIGIDA* no activaría el gen *FLC* y por tanto la floración no estaría reprimida; no obstante en la cuarta y quinta semana a TA hubo un incremento en la expresión de *FRIGIDA* y por ello una mayor activación de *FLC* y mayor represión de la floración en este tratamiento. Para los dientes almacenados a 5 °C, en la cuarta semana de almacenamiento también hubo un incremento en la expresión pero fue menor que TA lo cual sugiere que las plantas 5C pudieron tener una menor activación del gen *FLC* y por tanto una menor represión de la floración. Esto parece estar relacionado con los trabajos de Lee y

Amasino (1995), en líneas de *A. thaliana* mutadas con el gen *FRIGIDA*, en las cuales el efecto de la activación de este gen se ve eliminado después de 30-40 días de vernalización. También estos autores señalaron que el proceso de floración se adelanta a medida que se incrementó el tiempo de vernalización. Es posible que la expresión diferenciada de este gen durante el almacenamiento de los dientes semilla explique también la respuesta diferenciada en la aparición del escapo floral al final del ciclo de cultivo así como el adelanto del ciclo de cultivo de las plantas 5C. A este respecto, las plantas 5C adelantaron su ciclo y que el 70 % de estas plantas presentaron escapo floral. Mientras que en plantas TA el escapo solo se presentó en el 60 % de las plantas y mostraron un ciclo más largo. Este aspecto parece mostrar que las condiciones de almacenamiento de los dientes semilla alteraron la expresión de este gen que tuvo un efecto importante en el desarrollo de la planta así como en la formación del escapo floral.

El gen *CSGCS3* (cisteín sintasa *GCS3*) está implicada en la biosíntesis de cisteín sulfóxidos los cuales son compuestos precursores del aroma y sabor del ajo. El producto de este gen está involucrado en la síntesis de aliina a través de la ruta de la tio-alquilación de la O-acetilserina o cisteína (Jones et al., 2007) y de acuerdo a estos autores hay isoformas citosólicas, cloroplásticas y mitocondriales así como también puede haber expresión en hojas, bulbos y pseudotallo y se han descrito hasta cuatro isoformas dentro de las que se encuentra la *GCS3*. La expresión de este fragmento aumentó con el almacenamiento en los brotes almacenados a 5 °C. Por otro lado, la expresión en los brotes TA se mantuvo constante durante el almacenamiento. Esto pareciera sugerir que el almacenamiento a 5 °C induce una mayor síntesis de cisteín sulfóxidos o aliina. No obstante, no es seguro si esto tiene un efecto directo en el aroma de las plantas 5C puesto que los dientes semilla solo proporcionan soporte a la nueva planta durante su primera etapa de desarrollo.

Son et al., (2012), indicaron que la proteína que codifica el gen *ST* (transportador de azúcar) es transmembranal y cuyo transporte de azúcares mantiene la homeostasis y ósmosis celular. Estos mismos autores señalan que este gen fue sobre expresado durante el almacenamiento a bajas temperaturas señalando que esta respuesta pudiera implicar un mayor transporte de azúcares

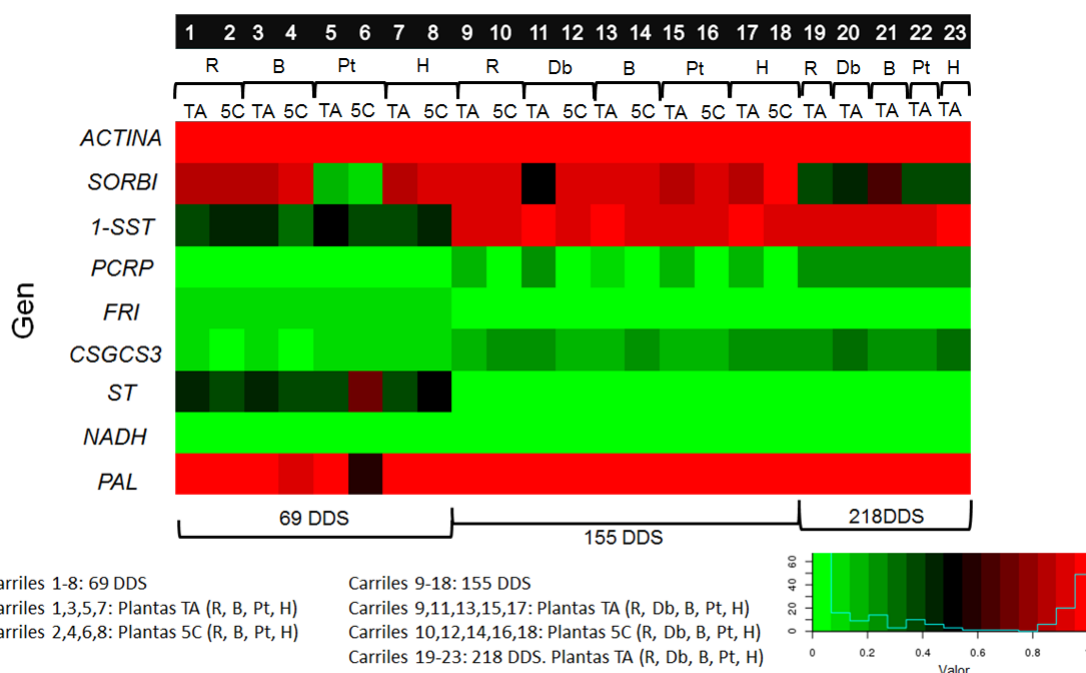
al interior de la célula en la condición de baja temperatura. De forma similar a los resultados indicados por esos autores, durante el almacenamiento a 5C incrementó la expresión conforme el periodo de este transcurrió, mientras que en la condición TA la expresión disminuyó dentro de las primeras cuatro semanas y aumentó ligeramente (por debajo de 5C) la última semana . Estos datos sugieren que el almacenamiento a 5 °C inducen una respuesta para facilitar el transporte de azúcares al interior de la célula lo cual podría generar una tolerancia a las bajas temperaturas pero al mismo tiempo un incremento en el transporte de fructanos o en su metabolismo.

La enzima que codifica *NADH deshidrogenasa 4*, participa en la respiración celular al ser parte del Complejo I, conjunto multienzimático que cataliza la transferencia de electrones del NADH a la coenzima Q (Protein Data Base Europe, 2014). López-Serrano *et al.*, (2001) indicaron que para el género *Allium*, hay diferencias en la secuencia de nucleótidos en comparación con la secuencia en otros eucariontes, lo que sugiere una modificación transcripcional específica de este género. La sobreexpresión de este EST durante el almacenamiento a 5 °C en comparación con TA, y la no expresión de este durante el desarrollo del cultivo (Figura 7.21), indica una de las diferencias más marcadas entre las plantas derivadas del almacenamiento de la semilla a las dos condiciones de temperatura.

*PAL* (fenilalanil amonio liasa) codifica para la primera enzima que participa en la ruta de los fenilpropanoides; este gen está más expresado en los brotes almacenados a 5 °C que en los TA. Esto concuerda con lo observado por Zavala-Gutiérrez (2011), y sugiere una mayor producción de compuestos fenólicos como las antocianinas en las plantas derivadas de ‘semilla’ almacenada a 5 °C, lo que fue observado por Dufo-Hurtado *et al.*, 2013.

#### 7.2.3.1.2.2 Análisis de expresión de genes durante el desarrollo del cultivo.

En la Figura 7.21 se muestra la dinámica de expresión de cada gen considerado en la sección anterior, pero analizados durante el desarrollo del cultivo (69, 155 y 218 DDS) para los siguientes órganos: raíz (R), disco basal (Db), bulbo (B), pseudotallo (Pt) y hojas (H).



**Figura 7.21** Heatmap del nivel de expresión durante el desarrollo del cultivo para los diferentes órganos: R, raíz; Db, disco basal; B, bulbo; Pt, pseudotallo; H, hojas. En el eje de las ordenadas se presentan los genes analizados. A mayor expresión de un gen, más cercano a rojo; y a menor expresión, más cercano a verde

En los tres tejidos (raíz, bulbo y hoja), *SORBIDRAFT* está más expresado en las plantas provenientes de ‘semilla’ almacenada a 5 °C en comparación con las de TA (Figura 7.21: carriles 1 y 2, raíz; 3 y 4, bulbo; 7 y 8, hojas). Sin embargo, es interesante que en el pseudotallo, la expresión disminuya en general, aunque está más expresado en las plantas de TA que las de 5C (Figura 7.21, carriles 5 y 6). Posiblemente (sin poder asegurarlo antes de realizar más estudios), este EST no es de importancia para esta parte de la planta a 69 DDS.

Hay una mayor expresión de *1-SST* en las hojas y raíces a 69 DDS (Figura 7.21: carriles 1 y 2, raíz; 7 y 8, hojas), lo cual sugiere que en esta etapa del desarrollo, hay más síntesis de fructanos (Sección 7.2.4), como mencionan Bowsher *et al.*, (2008), además la cantidad de sacarosa disminuye y se promueve la fotosíntesis; y al aumentar la fotosíntesis, hay más fotosintatos los cuales son utilizados como sustratos para sintetizar más fructanos.

Durante el primer muestreo (69 DDS, Figura 7.21: carriles 1-8), *CSGCS3* se expresa muy poco, por lo que probablemente (a reservas de futuros estudios),

en este periodo del desarrollo de la planta, ya no es necesaria su expresión. Esta tendencia también se puede observar durante los siguientes muestreos (155 y 218 DDS, Figura 7.21: carriles 9-23).

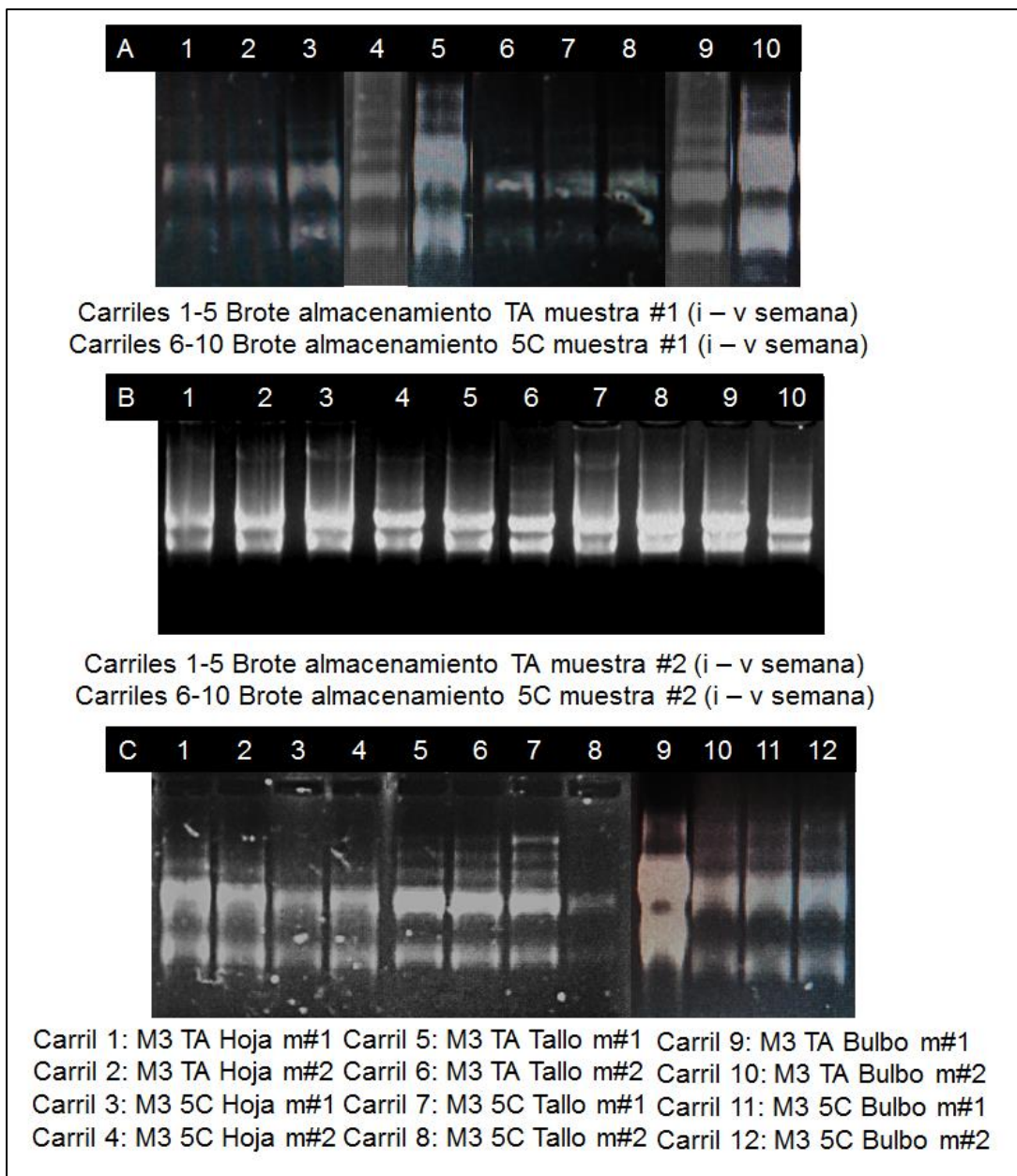
A 69 DDS la expresión de *ST* es mayor en el pseudotallo de las plantas provenientes de 'semilla' almacenada a 5 °C (Figura 7.21: carril 6) en comparación con los otros tejidos (Figura 7.21: carriles 1-8); esto sugiere que el transporte de azúcares, posiblemente fructanos esté de forma adelantada. Sin embargo, no hubo expresión de este EST a 155 y 218 DDS (Figura 7.21: carriles 8-23).

Para *PAL*, no obstante que durante el almacenamiento de la semilla, este EST estuvo mayormente expresado en los brotes almacenados a 5 °C (Figura 7.20); en todos los muestreos (69, 155 y 218 DDS), las plantas provenientes de los brotes almacenados a ambas condiciones de temperatura, muestran una expresión semejante (Figura 7.21), a excepción del pseudotallo a 69 DDS (Figura 7.21: carriles 5 y 6), tejido en el que la expresión de *PAL* es mayor en las plantas TA que las 5C.

#### 7.2.3.2 Análisis del nivel de expresión por RT-qPCR

##### 7.2.3.2.1 Extracción de ARN

En la figura 7.22 se muestra la fotografía del gel de electroforesis de agarosa al 1.2 % de la extracción de ARN para todas las muestras utilizadas para este análisis (ver Cuadro 6.5).



**Figura 7.22** Extracción de ARN para RT-qPCR.

**A.** Almacenamiento muestra #1.

**B.** Almacenamiento muestra #2.

**C.** Desarrollo de la planta - 132 DDS

#### 7.2.3.2.2 Síntesis de ADNc

En el cuadro 7.14 se indica la cuantificación del ADNc sintetizado a partir de una misma cantidad de ARN de las muestras.

**Cuadro 7.14** Cuantificación de ADNc para RT-qPCR

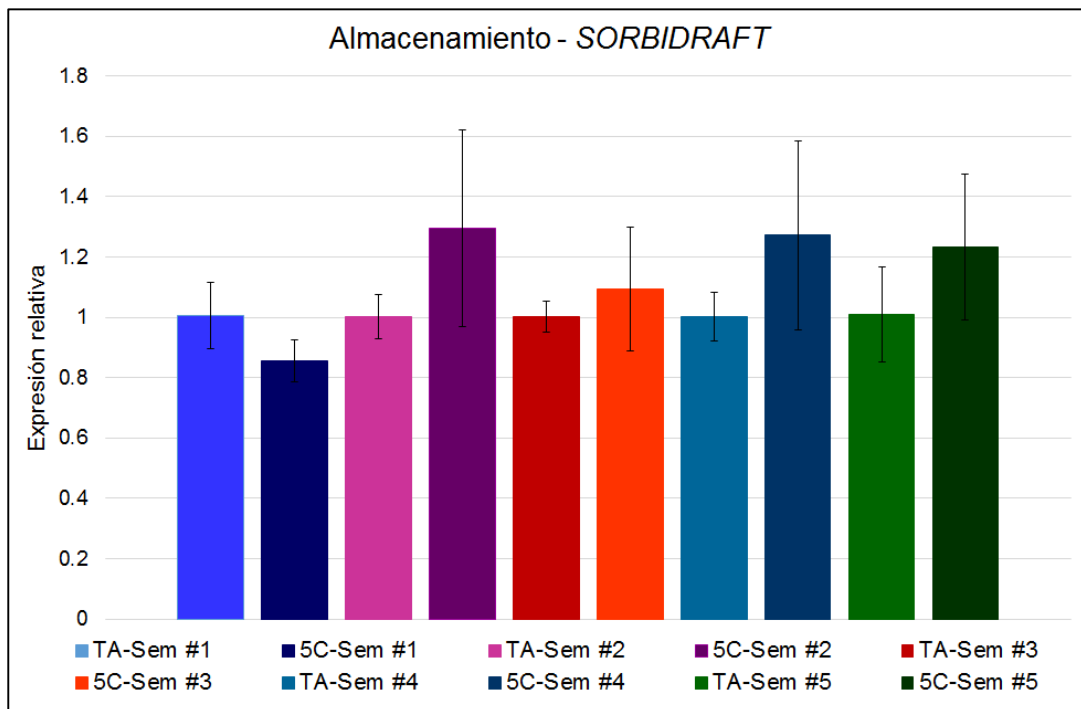
		MUESTRA	ADNc ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	
Almacenamiento – brote	TA	Semana 1	muestra 1	1.172	1.863
			muestra 2	1.108	1.85
		Semana 2	muestra 1	0.635	1.979
			muestra 2	1.034	1.85
		Semana 3	muestra 1	0.952	1.83
			muestra 2	1.03	1.84
	Semana 4	muestra 1	1.16	1.807	
		muestra 2	1.063	1.87	
	Semana 5	muestra 1	1.034	1.83	
		muestra 2	0.973	1.86	
	5C	Semana 1	muestra 1	0.887	1.812
			muestra 2	1.008	1.84
		Semana 2	muestra 1	0.866	1.771
			muestra 2	0.978	1.82
		Semana 3	muestra 1	0.846	1.769
muestra 2			0.810	1.86	
Semana 4		muestra 1	0.924	1.773	
		muestra 2	0.821	1.82	
Semana 5		muestra 1	1.224	1.773	
		muestra 2	0.929	1.83	
Muestreo No. 3 – 132 DDS	TA	Bulbo	muestra 1	1.186	1.812
			muestra 2	0.920	1.86
	5C	Bulbo	muestra 1	1.297	1.791
			muestra 2	0.945	1.84
	TA	Pseudotallo	muestra 1	1.108	1.838
			muestra 2	0.689	1.83
	5C	Pseudotallo	muestra 1	0.911	1.816
			muestra 2	0.839	1.85
	TA	Hoja	muestra 1	0.942	1.818
			muestra 2	0.938	1.86
	5C	Hoja	muestra 1	0.830	1.808
			muestra 2	0.869	1.85

DDS: días después de la siembra. La relación  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  debe ser cercano a 1.8



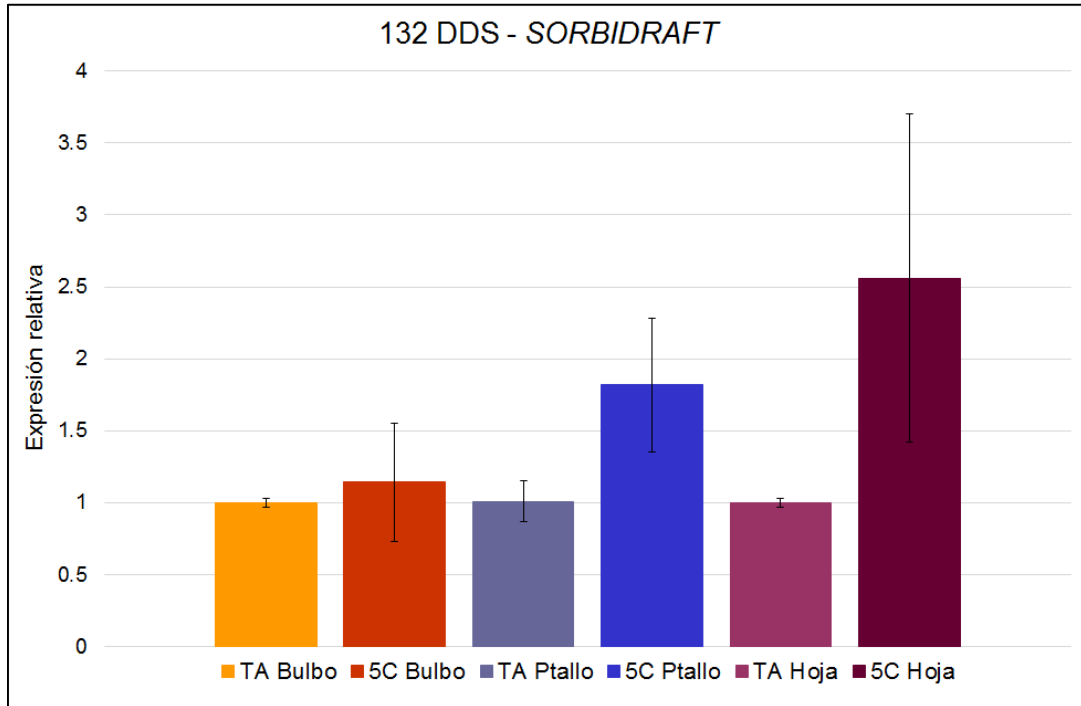
### 7.2.3.2.3 Análisis de PCR en tiempo real

Los valores obtenidos de la amplificación cuantitativa mediante la reacción de la cadena de la polimerasa se ilustran en las figuras siguientes, en las figuras 7.23 y 7.24 se muestran los resultados para la expresión del gen *SORBIDRAFT*, durante el almacenamiento y a los 132 días después de la siembra, respectivamente. Los resultados se muestran como expresión relativa en función al gen de referencia *18S*.



**Figura 7.23** RT-qPCR del gen *SORBIDRAFT* durante el almacenamiento del “diente” semilla

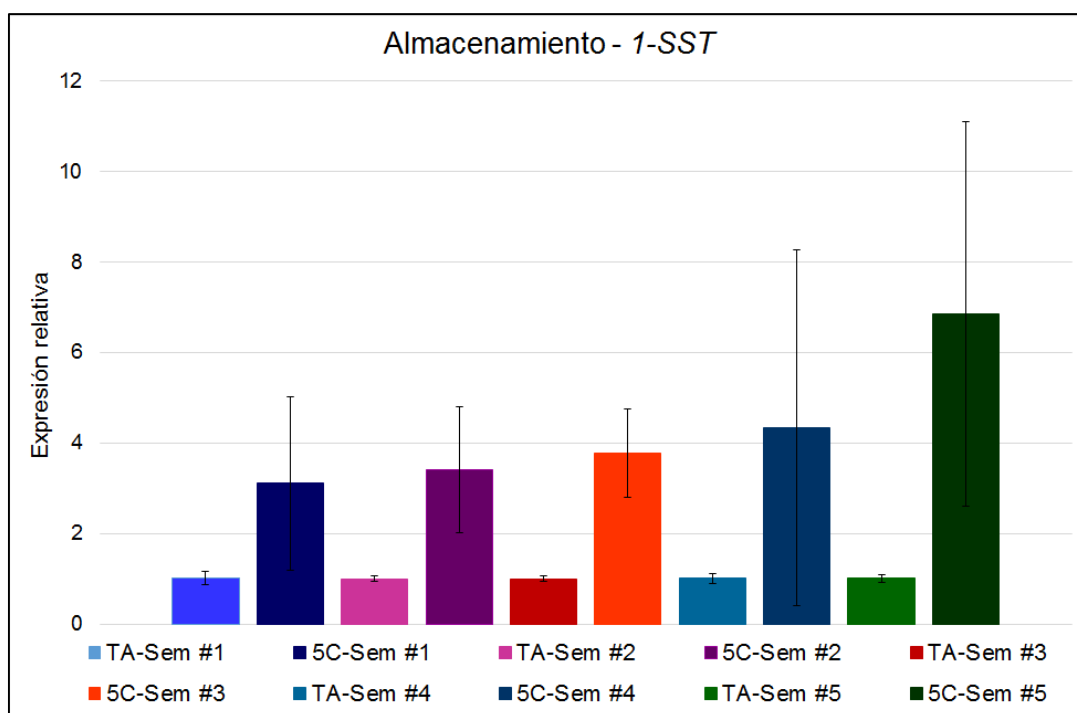
Durante el almacenamiento de los dientes “semilla”, se observa que con excepción de la semana 1, la expresión de este gen fue mayor en la condición 5C que a TA.



**Figura 7.24** RT-qPCR para el gen *SORBIDRAFT* en diferentes órganos de la planta de ajo a los 132 DDS

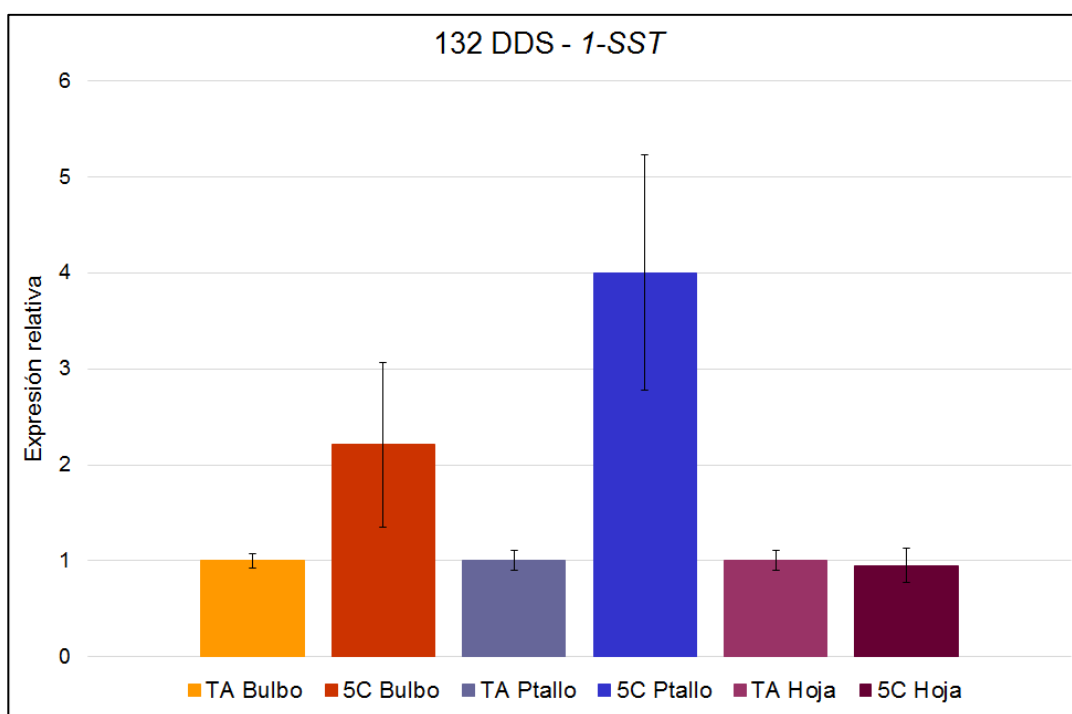
También a los 132 días después de la siembra, este gen se encontró sobreexpresado en los diferentes órganos de las plantas 5C (Figura 7.24). Si bien los datos no son totalmente iguales a los obtenidos mediante la RT-PCR, la tendencia es la misma; y aunque aún no se conoce totalmente el papel de la proteína que codifica este gen, el número de copias observado en el resultado de la SSH sugiere que es importante para la planta sometida a la condición de 5C. Gupta y Deswall (2012) observan una sobreexpresión de esta proteína en ramas de plantas *Hippophae rhamnoides* sometidas a 4 °C por 1 – 5 días, transferidas a -5 °C y finalmente mantenidas a 24 °C; aunque estos autores tampoco le asocian una función específica la ubican como un posible regulador de rutas metabólicas. Mientras que Ngara *et al.*, (2012) reporta la sobre expresión de esta proteína en plántulas de *Sorghum bicolor* sometidas a estrés salino y la ubican con posibles funciones en el metabolismo primario. Por su parte Castillejo *et al.*, (2015), también detectan esta proteína en plantas de chícharo sometidas al ataque de *Fusarium oxysporum* ubicándola con una función en el plegamiento, selección y degradación de proteínas. Estos trabajos sugieren que este gen está involucrado en respuestas al estrés.

Para la expresión del gen *1-SST*, las figuras 7.25 y 7.26 muestran dicha expresión en los brotes de los dientes semilla durante el almacenamiento a 5 °C y a los 132 DDS respectivamente. Se puede observar la expresión temprana de este gen en los brotes desde el inicio del almacenamiento y su nivel de expresión fue aumentando a medida que transcurrió el tiempo de acondicionamiento. Esto sugiere que el metabolismo de fructanos podría verse modificado desde el acondicionamiento de los dientes “semilla”.



**Figura 7.25** RT-qPCR para el gen *1-SST* durante el almacenamiento del “diente” semilla

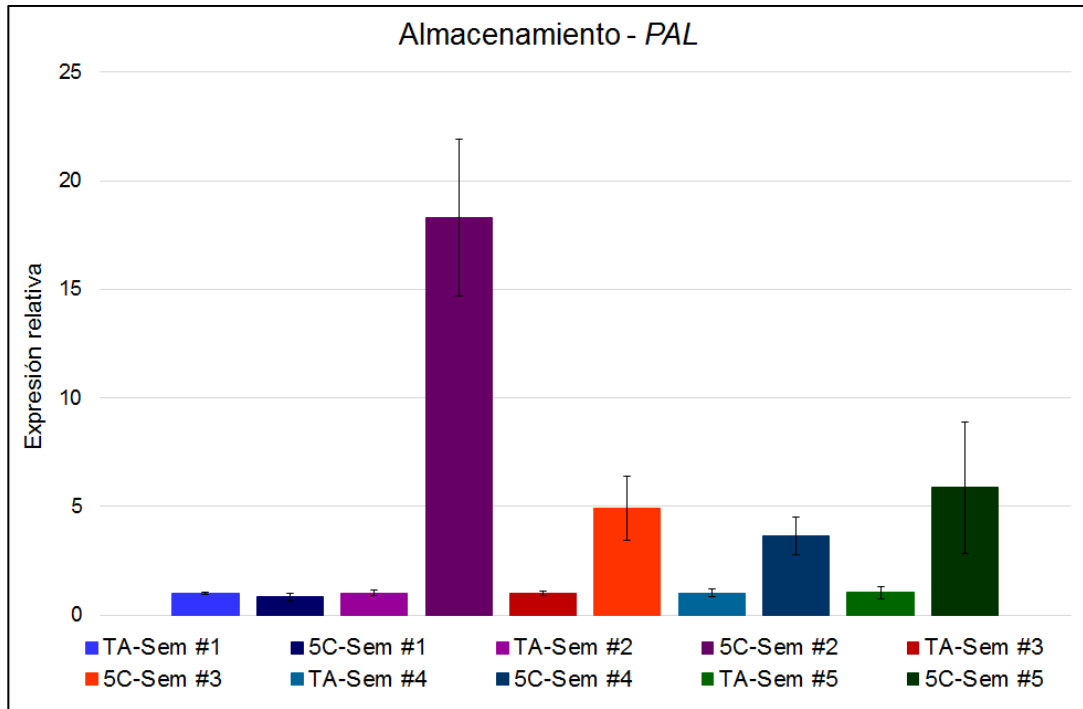
A los 132 DDS (figura 7.26), este gen se encontró sobreexpresado tanto en los bulbos como en los pseudotallos de las plantas 5C; mientras que en las hojas, la expresión fue similar en las plantas 5C como TA. López-Hernández (2010) describió un proceso adelantado de transporte de fructanos desde las hojas y pseudotallos hasta los bulbos en plantas 5C; mientras que Vázquez-Mandujano (2009) describió que el transporte de fructanos a los bulbos estaba ligado al proceso de crecimiento rápido del bulbo y que en ese punto la actividad de la *1-SST* se incrementaba. La expresión del gen de esta enzima parece confirmar esos hallazgos.



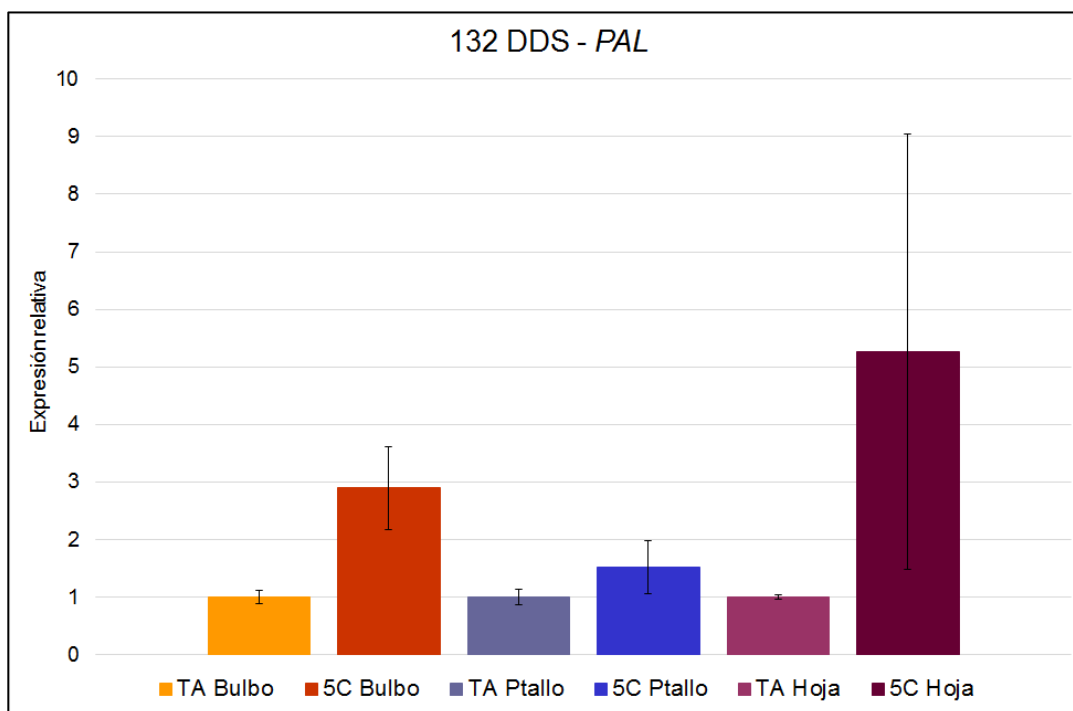
**Figura 7.26** RT-qPCR para el gen 1-SST a 132 DDS

Las Figuras 7.27 y 7.28 muestran la expresión del gen de la enzima *PAL* durante el almacenamiento de los dientes semilla a 5 °C y TA respectivamente. Se puede observar una sobre expresión de este gen desde la segunda semana de almacenamiento a 5 °C, donde alcanzó su mayor expresión. Zavala-Gutiérrez (2011) también señaló una sobreexpresión de este gen en la quinta semana de almacenamiento, los resultados aquí presentados confirman los resultados de esa autora y añaden que esta sobre expresión es máxima en la segunda semana de almacenamiento.

A los 132 DDS, se observó que la expresión de *PAL* en los diversos tejidos analizados fue mayor en plantas 5C respecto de las plantas TA (Figura 7.28). Observándose una diferencia más marcada en las hojas (5 veces más expresión), y en los bulbos (3 veces mayor expresión). Estos datos soportan las observaciones indicadas por nuestro grupo de trabajo (Dufoo-Hurtado *et al.* 2013) en que hemos informado un mayor contenido de fenoles y antocianinas en bulbos de la misma variedad sometida a los mismos tratamientos de acondicionamiento señalados en este estudio.



**Figura 7.27** RT-qPCR para expresión del gen *PAL* en brotes de dientes “semilla” durante el almacenamiento a dos condiciones de temperatura



**Figura 7.28** RT-qPCR para expresión del gen *PAL* a 132 DDS

No obstante, este tipo de análisis en ajo ya se ha reportado para genes relacionados a la floración (Kamenetsky *et al.*, 2015; Neta *et al.*, 2011), este trabajo es el primero que analiza genes relacionados a la síntesis de fructanos y fenil propanoides.

#### 7.2.4 Comparación y correlación de los datos de expresión genética con el contenido de carbohidratos

Dado que los análisis de expresión mostraron diferencias importantes en la expresión del gen *1 SST* en los dos tipos de condiciones de acondicionamiento, se recuperaron los análisis de fructanos obtenidos por López-Hernández (2010) en la temporada 2009-2010. Este análisis es válido ya que esta autora trabajó la misma variedad utilizada en el presente estudio y también fue sometida a los mismos tratamientos de acondicionamiento aquí señalados y el material fue sembrado en la misma zona de cultivo. A los datos de esta autora se les hizo un análisis más detallado que incluyó la separación de los carbohidratos simples, el contenido de fructanos totales, el contenido de fructooligosacáridos y el contenido de fructanos de peso molecular mayor que DP 5. Este análisis permitió reunir los siguientes resultados:

Los cambios en el contenido de fructanos en los bulbos y en los pseudotallos durante todo el ciclo de cultivo fueron estudiados para observar el efecto del almacenamiento a 5 °C de los dientes “semilla” en comparación con los mismos órganos de las plantas TA. El análisis estadístico entre ambos tratamientos mostró que el factor temperatura no tuvo un efecto significativo en el contenido de fructanos (32.4 y 28.8 % para plantas 5C y TA, respectivamente). Sin embargo, como era de esperarse, el contenido de fructanos en los bulbos fue significativamente más alto (41.5 %) en este tipo de tejido que en los pseudotallos (18.7%). Las interacciones de estos dos factores confirman los mismos resultados, mostrando que los bulbos de ambas condiciones de almacenamiento del diente “semilla” presentan valores más altos (36.4 y 46.6 %, TA y 5C respectivamente) que aquellos de los pseudotallos (18.8 %, TA y 17.6 % para 5C) sin observar diferencias entre ambos tratamientos. Estos resultados prueban que los bulbos presentan una mayor capacidad para almacenar carbohidratos que los pseudotallos.

Con el fin de observar lo que sucede en la planta durante el desarrollo y si el tratamiento de almacenamiento presenta un efecto general a nivel de órganos, se realizó una ANOVA bloqueando la variable del tiempo (Cuadro 7.15); sólo a 52 DDS el contenido de fructanos fue mayor en las plantas cuyas ‘semillas’ habían sido almacenadas a 5 °C (36.4 %) que las plantas provenientes de ‘semilla’ almacenada a TA (28.9 %). Esto muestra que efectivamente la actividad de acumulación de fructanos se encuentra más activa en las primeras etapas de desarrollo de las plantas 5C. En los siguientes periodos de muestreo no se observó ningún efecto del tratamiento. Por otro lado, a través del desarrollo del cultivo se observó un aumento del contenido de fructanos en los bulbos y una disminución en los pseudotallos; lo que indica que un proceso de transporte de estos carbohidratos desde los pseudotallos a los bulbos se lleva a cabo durante este periodo.

**Cuadro 7.15** Contenido de fructanos en diferentes periodos y tejido de plantas de ajo generadas de dientes ‘semilla’ almacenadas a TA o 5 °C durante 5 semanas

<i>Factor/DDS</i>	<i>53</i>	<i>102</i>	<i>137</i>	<i>157</i>	<i>194</i>
<i>Tratamiento</i>					
5 °C	36.4 <sup>a</sup>	31.9 <sup>a</sup>	28.2 <sup>a</sup>	30.5 <sup>a</sup>	
TA	28.9 <sup>b</sup>	18.1 <sup>a</sup>	26.3 <sup>a</sup>	25.0 <sup>a</sup>	27.9
<i>Tejido vegetal</i>					
Bulbo	37.9 <sup>a</sup>	35.0 <sup>a</sup>	40.9 <sup>a</sup>	45.2 <sup>a</sup>	48.4
Pseudotallo	27.4 <sup>b</sup>	24.9 <sup>b</sup>	13.6 <sup>b</sup>	10.4 <sup>b</sup>	
<i>Tratamiento*tejido vegetal</i>					
5 °C*Bulbo	39.0 <sup>a</sup>	35.4 <sup>a</sup>	46.1 <sup>a</sup>	56.0 <sup>a</sup>	54.2 <sup>a</sup>
TA*Bulbo	36.8 <sup>a</sup>	34.7 <sup>a</sup>	35.6 <sup>ab</sup>	34.4 <sup>b</sup>	36.6 <sup>ab</sup>
5 °C*Pseudotallo	33.8 <sup>a</sup>	20.7 <sup>a</sup>	6.4 <sup>b</sup>	5.03 <sup>c</sup>	
TA*Pseudotallo	20.9 <sup>b</sup>	29.2 <sup>a</sup>	20.8 <sup>ab</sup>	15.7 <sup>bc</sup>	19.2 <sup>b</sup>

Letras diferentes entre la misma columna y factor, indican diferencias significativas (Tuckey P<0.05).  
Temperatura ambiente (TA), Días después de la siembra (DDS).

El análisis estadístico de las interacciones tratamiento\*tejido vegetal dentro de periodo de 157 DDS, mostró que en los bulbos de plantas 5C contenían más fructanos que los bulbos de plantas TA (Cuadro 7.15); no obstante, también se observa una tendencia de acumulación de estos carbohidratos en las plantas 5C (39 – 54%) mientras que en las plantas TA este contenido cambio muy poco (34 a 36%). Por otro lado, el contenido de estos carbohidratos en los pseudotallos de las plantas 5C disminuyó drásticamente dentro del mismo periodo (33.8 a 5.03%) en comparación con los pseudotallos de las plantas TA (20.9 a 15.7%). Esto parece indicar que los procesos de transporte de fructanos desde los pseudotallos a los bulbos en las plantas 5C es más intenso respecto del mostrado por las plantas TA. Es posible también señalar que al momento de la cosecha de las plantas 5C el contenido de fructanos en los pseudotallos era casi 4 veces más bajo (5.03%) que el contenido de estos carbohidratos en los pseudotallos de las plantas TA al momento de su cosecha (19.2%). Estos datos nuevamente se correlacionan con los análisis de expresión de 1 SST. También puede mostrar que en las plantas 5C, al haber un mayor transporte de fructanos desde los pseudotallos a los bulbos, aquellos agotan sus reservas desde los 137 DDS



mientras que en las plantas TA las reservas de los pseudotallos se agotan a una menor velocidad lo cual permite el mayor crecimiento mostrado por estas plantas al final de su ciclo de cultivo lo cual parece explicar el menor crecimiento de las plantas 5C y bulbos alcanzado al final del ciclo de cultivo.

#### 7.2.4.1 Cambios en el contenido de carbohidratos simples y fructooligosacáridos (FOS)

El análisis de carbohidratos simples y fructooligosacáridos de hasta un grado de polimerización (DP) 5 por HPAEC-PAD mostró cambios asociados a los tratamientos de aclimatación de los dientes “semilla” (Figura 7.29). Las hojas de plantas TA; mostraron un contenido importante de sacarosa a lo largo del ciclo, que disminuyó durante el desarrollo (desde 48 hasta 28 mg 100 g<sup>-1</sup>) mientras que la fructosa se incrementó desde los 53 DDS hasta la cosecha (2.4 a 36 mg 100g<sup>-1</sup>); las hojas de las plantas 5C, también mostraron un alto contenido de sacarosa con una tendencia a incrementarse hasta alcanzar los valores más altos a los 137 DDS (62.7 mg 100 g<sup>-1</sup>) que disminuyeron drásticamente en la cosecha de las plantas (5.8 mg 100 g<sup>-1</sup>); la fructosa mostró un incremento más moderado (desde 2 hasta 12 mg 100 g<sup>-1</sup>) que el mostrado por las plantas TA. Estos datos muestran una mayor capacidad de síntesis o acumulación de sacarosa en las hojas de las plantas 5C hasta los 137 DDS pero esta capacidad disminuyó drásticamente cuando se inició el crecimiento rápido de los bulbos y se presentó la diferenciación de los dientes.



**Figura 7.29** Contenido de carbohidratos simples y fructooligosacáridos de bajo peso molecular durante el desarrollo del cultivo

Los contenidos de glucosa fueron notablemente menores en hojas de plantas TA oscilando entre 0.2 a 3.7 mg 100 g<sup>-1</sup> para el periodo de 53 a 194 DDS; observándose el mayor contenido a los 102 DDS; las hojas de las plantas 5C mostraron oscilaciones más amplias (0.3 a 7.7 mg 100 g<sup>-1</sup>) y en un periodo más corto de crecimiento (53 a 137 DDS) registrándose el mayor contenido a los 137 DDS. Es posible que los mayores contenidos de glucosa en las hojas observados a los 137 DDS, en plantas 5C, indiquen una menor capacidad de uso de glucosa generada en fotosíntesis para transformarla a sacarosa o fructosa.

Asociado con este comportamiento el contenido de fructooligosacáridos también mostró diferencias importantes; las hojas de plantas TA mostraron bajos contenidos de 1-kestosa (1.8 a 2.6 mg 100 g<sup>-1</sup>), neokestosa (2 a 6 mg 100 g<sup>-1</sup>) y nistosa (0 a 2 mg 100 g<sup>-1</sup>) mientras que las hojas de plantas 5C mostraron

contenidos más altos de 1-kestosa (de 6 a 11.4 mg 100 g<sup>-1</sup>) y de neokestosa (5.7 a 8.9 mg 100 g<sup>-1</sup>). Estos datos muestran que el acondicionado a 5°C induce una mayor acumulación temporal de estos fructooligosacáridos en las hojas en comparación con las hojas de las plantas TA probablemente este efecto sea debido a una mayor inducción de las enzimas 1 SST (Figura 7.21) y 6G FFT responsables de la formación de 1-kestosa y de neo kestosa respectivamente.

También los pseudotallos mostraron diferencias importantes en los contenidos de estos carbohidratos simples y FOS; los pseudotallos de plantas RT mostraron contenidos importantes de sacarosa a los 53 y 102 DDS (24.6 a 44.6 mg 100 g<sup>-1</sup>) que después disminuyeron drásticamente a los 137 y 157 DDS para nuevamente incrementarse a los 194 DDS (41.9 mg 100 g<sup>-1</sup>). Por su parte los pseudotallos de las plantas 5C presentaron contenidos más bajos de sacarosa dentro de los 53 hasta 137 DDS (4.5 a 5.7 mg 100 g<sup>-1</sup>) los cuales se incrementaron notablemente a los 157 DDS (28.8 mg 100 g<sup>-1</sup>). El contenido de fructosa en los pseudotallos de plantas TA oscilaron entre 11 mg 100g<sup>-1</sup> a los 53 DDS y disminuyeron hasta los 157 DDS (0.6 mg 100g<sup>-1</sup>) para nuevamente incrementarse significativamente a los 194 DDS (37.8 mg 100g<sup>-1</sup>); mientras que en los pseudotallos de plantas 5C, la fructosa no se detectó dentro del periodo de 53 a 137 DDS y se registró un contenido alto a los 157 DDS (49.5 mg 100 g<sup>-1</sup>).

Por otro lado, el contenido de 1-kestosa en los pseudotallos de plantas TA fue disminuyendo a medida que transcurrió el ciclo de cultivo (6.7 hasta 3.4 mg 100g<sup>-1</sup>), la neokestosa mostró fluctuaciones de 7 a 8 mg 100g<sup>-1</sup> a los 53 y 102 DDS, disminuyó a los 137 DDS y nuevamente se incrementó desde 6 hasta 11 mg 100g<sup>-1</sup> los días 157 y 194 DDS y la nistosa se mantuvo aproximadamente constante mientras que el FOS DP5 se incrementó de 0.1 hasta 3.2 mg 100 g<sup>-1</sup>. Para los pseudotallos de las plantas 5C, los valores de 1-kestosa se mantuvieron altos (7.2 a 8.8 mg 100g<sup>-1</sup>) y después disminuyeron a 3.0 y 2.9 mg 100g<sup>-1</sup> a los 53 y 102 DDS; mientras que la neo kestosa se incrementó de 3.1 a 9.9 mg 100g<sup>-1</sup> de los 53 a 137 DDS y volvió a disminuir a los 157 DDS (0.2 mg 100g<sup>-1</sup>); la nistosa se incrementó a los 102 DDS y disminuyó posteriormente, en tanto que el FOS DP5 disminuyó ligeramente desde 1.84 a 0.88 mg 100g<sup>-1</sup>. Estos datos muestran que este órgano presenta procesos de síntesis y transformación de los FOS en

los que aparentemente se sintetizan FOS más complejos a partir de compuestos más simples como la 1-kestosa y neo kestosa; no obstante, también es posible observar que este proceso se ve acelerado en las muestras procedentes de plantas 5C.

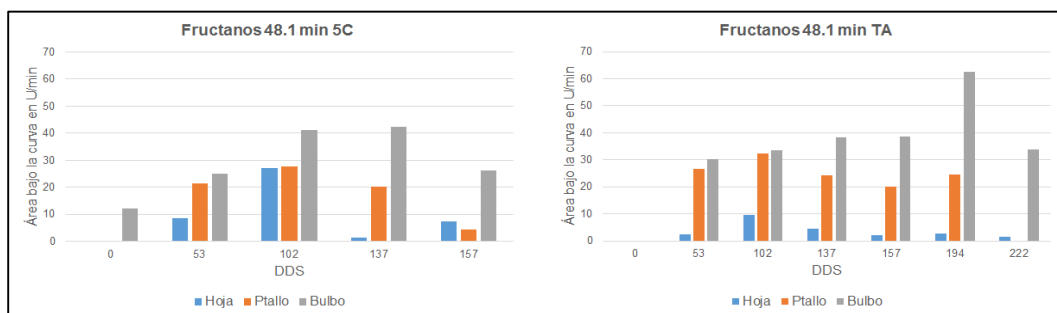
Al igual que las hojas y los pseudotallos, los bulbos también mostraron diferencias importantes en sus contenidos de azúcares simples y FOS; los bulbos de plantas TA mostraron incrementos de sacarosa durante el periodo de 52 hasta 137 días (7.4 hasta 43.7 mg 100 g<sup>-1</sup>) que después disminuyeron drásticamente hasta los 194 DDS en que nuevamente se incrementó hasta 18.2 mg 100g<sup>-1</sup>. Por su parte los bulbos de las plantas 5C presentaron valores de 11. 1 y 19.8 mg 100g<sup>-1</sup> a los 53 y 157 DDS y no se registraron contenidos a los 102 y 137 DDS. La presencia de este azúcar en el bulbo seguramente está relacionado al proceso de síntesis de fructanos en esos órganos la cual parece estar modulado por la longitud del ciclo de cultivo; es decir en las plantas TA con un ciclo más amplio las fluctuaciones de sacarosa se dieron en tiempos más largos mientras que en las plantas 5C estas fluctuaciones ocurrieron en un tiempo más corto.

No se detectaron contenidos de fructosa y glucosa en bulbos de plantas TA mientras que en los bulbos de plantas 5C no mostraron contenidos de glucosa y si mostraron contenidos de fructosa a los 53 DDS (12.1 mg 100g<sup>-1</sup>) y 0.6 mg 100g<sup>-1</sup> a los 157 DDS lo cual puede estar relacionado a procesos de síntesis o reestructuración de fructanos. Los contenidos de FOS en las plantas TA aumentaron a lo largo del ciclo de cultivo observándose los mayores contenidos a los 194 DDS; mientras que en los bulbos de plantas 5C también mostraron esta misma tendencia pero con menores contenidos respecto de las plantas TA.

#### 7.2.4.2 Cambio en el perfil de fructanos durante el desarrollo del cultivo

De forma simultánea al análisis de carbohidratos simples y FOS; las muestras se dejaron correr hasta 48.1 minutos en el equipo HPAEC-PAD registrándose las áreas bajo la curva de los picos detectados en el intervalo de tiempo de retención > 21.5 min (pico del DP5) hasta 48.1 min; después se calculó la sumatoria de todas las áreas detectadas en cada órgano analizado, condición de acondicionamiento de los dientes semilla y fecha de muestreo. Aunque los

datos registrados son unidades de área bajo las curvas, estos datos señalan de forma directa los cambios del conjunto de fructanos con peso molecular mayor al DP5 durante el desarrollo de la planta (Figura 7.30). Las hojas de plantas de ambas condiciones de acondicionamiento mostraron capacidad para almacenar fructanos de peso molecular mayor que el DP5 en las primeras etapas de desarrollo de la planta alcanzando un máximo a los 102 DDS aunque alcanzó diferentes niveles en ambos tipos de planta ( $27 \text{ U min}^{-1}$  y  $9.6 \text{ U min}^{-1}$  para plantas 5C y TA respectivamente), y disminuyó en las subsecuentes fechas de muestreo indicando posibles cambios del metabolismo y transporte de estos carbohidratos a los pseudotallos y bulbos. Las hojas de plantas 5C mostraron una mayor capacidad de acumulación de estos carbohidratos respecto de las hojas de plantas TA.



**Figura 7.30** Contenido de fructanos de alto peso molecular durante el desarrollo del cultivo

Los pseudotallos también mostraron un aumento en la acumulación de estos carbohidratos en las primeras etapas de desarrollo de la planta y fue máxima a los 102 DDS desde donde disminuyó hasta la fecha de cosecha de los bulbos. No obstante, se observaron diferencias entre las diferentes condiciones de acondicionamiento de la "semilla, los pseudotallos 5C mostraron sus valores más bajos en el momento de la cosecha ( $4.3 \text{ U min}^{-1}$ ) en comparación a esos órganos de las plantas TA que mostraron valores seis veces más altos ( $24.6 \text{ U min}^{-1}$ ). Estos datos parecen indicar que la capacidad de almacenamiento de estos carbohidratos se mantiene más tiempo en los plantas TA y que en las plantas 5C esta capacidad se agota en el las últimas etapas de desarrollo y diferenciación de los bulbos.

Las bulbos de las plantas TA mostraron un incremento constante en la acumulación de estos carbohidratos desde los 53 DDS hasta el término del ciclo de cultivo (194 DDS) donde se registraron los valores máximos ( $62.6 \text{ U min}^{-1}$ ). De manera interesante, el contenido de estos carbohidratos disminuye después de la cosecha hasta alcanzar valores de  $34 \text{ U min}^{-1}$  planteando la duda de que ocurre con estos carbohidratos; en dos muestras de extractos de fructanos de bulbos que se dejaron correr hasta por 66 min se observó la presencia de un pico con un área muy importante (datos no mostrados) que señalaba la presencia de fructanos de mayor peso molecular, nosotros hipotetizamos que los fructanos acumulados hasta el momento de la cosecha son re metabolizados y convertidos a fructanos de mayor peso molecular durante el procesos de curado de los bulbos.

Por otro lado, los bulbos de las plantas 5C, también mostraron un incremento en la acumulación de fructanos desde los 53 DDS hasta los 137 DDS donde registraron su valor máximo ( $42.5 \text{ U min}^{-1}$ ), y se redujeron en el momento de la cosecha ( $26.2 \text{ U min}^{-1}$ ). Esta reducción parece similar a la observada en los bulbos de plantas TA en el proceso de curado; no obstante, este proceso se presentó durante la etapa de diferenciación de los bulbos 5C. Es posible que las causas de esta reducción se deba a diferentes factores como el mismo proceso de diferenciación de los bulbos, así como el menor número y ancho de hojas y menor diámetro de los pseudotallos en este tipo de plantas (y por ello menor capacidad fotosintética y menor capacidad para acumular fructanos) y por ello también una menor disponibilidad de transporte de fructanos desde los pseudotallos a los bulbos. Los anteriores datos también señalan que la acumulación de fructanos en los bulbos de plantas 5C se acelera durante los primeros 137 DDS pero se interrumpe debido a la participación de los factores señalados.

A efecto de correlacionar estos resultados con los estudios de expresión del gen de la 1 SST; se puede volver a recordar que hubo diferencias de expresión del gen de la 1 SST entre los brotes de dientes semilla acondicionadas a  $5^\circ\text{C}$  y TA; observándose sobre expresión de este gen en los brotes de dientes acondicionados a 5C respecto de los observados en los dientes “semilla” mantenidos a TA (Figuras 7.20 y 7.25); esta sobreexpresión fue máxima en las

dos últimas semanas de acondicionamiento a 5 °C. Posteriormente y durante el desarrollo, a los 155 DAS, los bulbos y hojas de las plantas TA mostraron mayores niveles de expresión de este gen en comparación a los niveles observados en los tres órganos de las plantas 5C. De igual forma, al momento de la cosecha de las plantas TA (194 DAS) el nivel de expresión de este gen fue mayor al mostrado por los órganos de las plantas 5C (155 DAS). Estos datos parecen mostrar, que la capacidad de las plantas 5C para sintetizar fructanos se induce desde la primera semana de acondicionamiento a 5C siendo más alta en las dos últimas semanas pero esta capacidad fue notablemente disminuida al momento de la cosecha; de forma contrastante los órganos de las plantas TA mantuvieron alta la expresión de esta enzima lo cual puede indicar que la actividad de síntesis de fructanos en estas plantas se mantuvo hasta el momento de la cosecha. Estos datos se correlacionan con los procesos de acumulación de fructanos señalados anteriormente explicándose porque en las plantas 5C se interrumpe la acumulación de fructanos en los bulbos mientras que en las plantas TA esta capacidad esta activa y explica porque los bulbos de estas plantas muestran mayor peso y tamaño de los bulbos.

Los datos indicados en esta sección confirman las observaciones señaladas en la expresión de la enzima 1 SST y también que el metabolismo de fructanos se ve modificado por el acondicionamiento a 5 °C

#### 7.2.5 Análisis del transcriptoma mediante secuenciación masiva (RNA-seq)

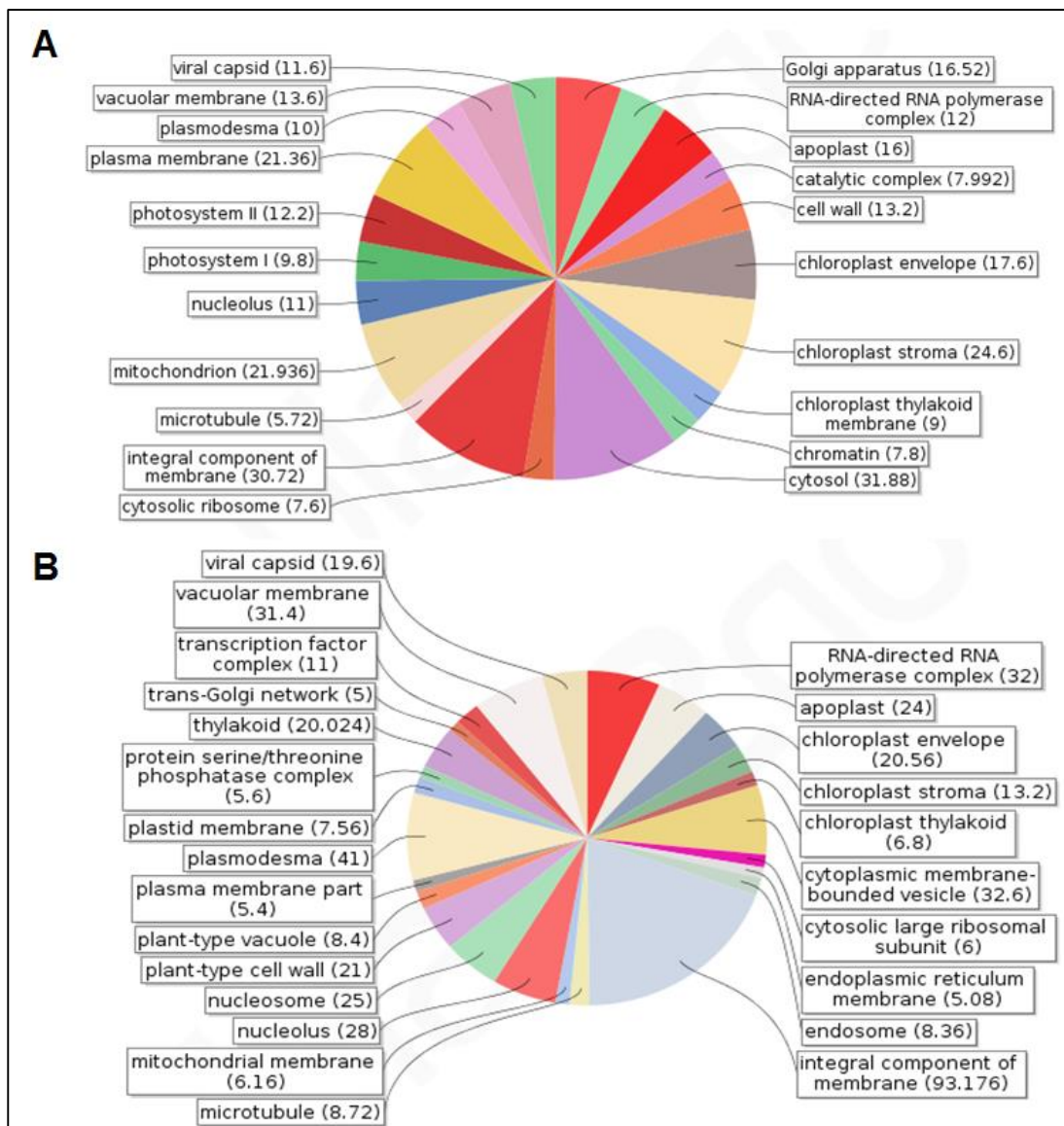
Este tipo de análisis secuencial de última generación nos permite conocer todos los genes que se están expresando dada una condición determinada, y por lo tanto, tener una idea de lo que está pasando molecularmente en ese momento.

El análisis bioinformático realizado a través de los programas Fast QC Report, Trinity, edge R y Blast2go determinó un total de 483 128 transcritos con un tamaño > 200 pb para ambas condiciones de almacenamiento; de los cuales, 7 033 se expresaron diferencialmente, siendo el 49.14 % sobreexpresados (UP) y el 50.86 % reprimidos (DOWN) para la condición de almacenamiento a 5 °C.

Sun *et al.* (2012) reportaron un análisis de transcriptoma profundo para brotes almacenados a temperatura ambiente durante 2 y 16 semanas del cultivar Cangshan 15, un total de 127 933 transcritos. Mientras que Kamenetsky *et al.* (2015) realizaron un análisis de RNA-seq para ajo fértil (clon #87), comparando varios tejidos de la planta, estos autores indicaron que el total del transcriptoma obtenido fue de 240 000 contigs (segmentos de ADN superpuestos que representan un gen ensamblado). No obstante de la existencia de 2 bases de datos de secuenciación del transcriptoma de ajo, más la reportada en este proyecto, este es el primer trabajo en el que se presenta la comparación entre genes expresados diferencialmente en dos condiciones de temperatura de almacenamiento.

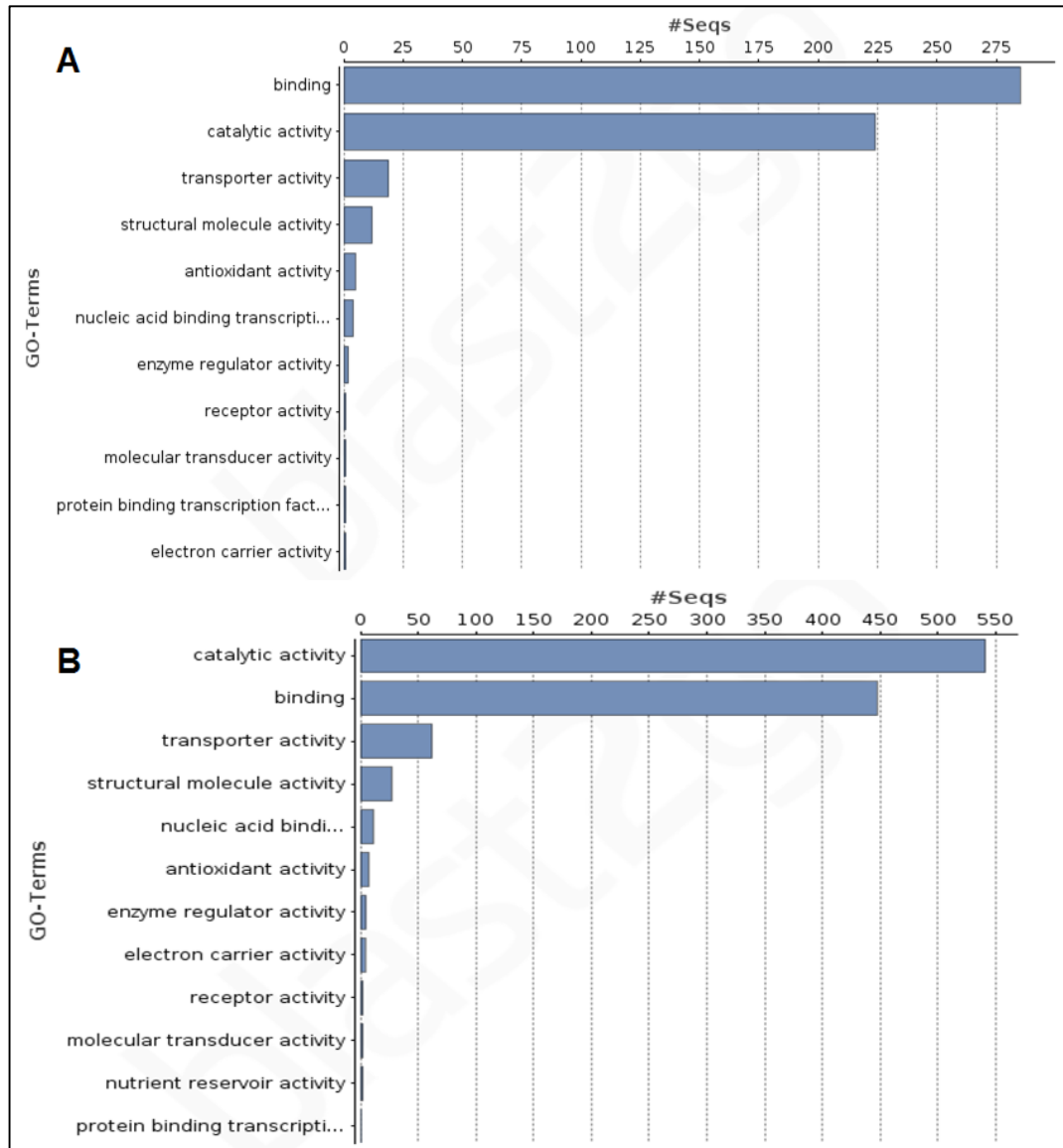
Respecto de la expresión de transcritos asociados a diferentes componentes celulares (figura 7.31), el número de transcritos sobre expresados (33 %) fue menor que el número de transcritos sub expresados (67 % de 2042 transcritos). Los componentes celulares más afectados o con mayor número de transcritos sub expresados fueron los asociados a los componentes integrales de la membrana, a la membrana vacuolar, al plasmodesmo y a las vesículas ligadas a la membrana citoplásmica. Estos datos sugieren que las membranas son las más afectadas por el acondicionamiento a 5 °C





**Figura 7.31** Clasificación transcritos expresados diferencialmente – Componente celular. **A.** Transcritos up. **B.** Transcritos down

La figura 7.33 muestra los niveles de los transcritos sobre y sub expresados de acuerdo a la función biológica; el número de transcritos sobre expresados fue menor que los transcritos sub expresados. La función biológica más afectada por el acondicionamiento a 5 °C (mayor número de transcritos sub expresados) es la actividad metabólica seguida por la actividad de ligado y la actividad de transporte. Como respuesta a estos efectos se observó una sobre expresión de transcritos asociados a los procesos de ligado y actividad metabólica.



**Figura 7.32** Clasificación transcritos expresados diferencialmente – Función molecular. **A.** Transcritos up. **B.** Transcritos down

Tomando en conjunto estas clasificaciones de este estudio, se puede indicar que los efectos principales que tiene el acondicionamiento a 5 °C se encuentra a nivel de membranas y sus proteínas asociadas a las rutas metabólicas.

Hasta este momento, se tiene la homología de los transcritos expresados diferencialmente mediante la anotación y comparación con genes ortogonales utilizando el programa blast2go. En el cuadro 7.16 se describen las proteínas codificadas por los genes hasta ahora analizados, los cuales están incluidos en el grupo de los sobre expresados.

**Cuadro 7.16** Proteínas asociadas a los transcritos sobre-expresados diferencialmente

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GO's <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c2631_g1_i1	Proteína de choque térmico clase II	335	10	5.06E-33	79.3	1	P: respuesta al estrés	
c4491_g1_i1	Proteína no caracterizada LOC103848776 (predicción)	866	10	7.39E-09	47.5	0		
c5107_g1_i1	Proteína hipotética VITISV_041315	1892	10	3.06E-27	57.5	3	F: unión de ácidos nucleicos P: integración del ADN F: unión iones de zinc	
c8055_g1_i1	Subunidad cloroplástica del centro de reacción del fotosistema I	903	10	4.14E-101	89.4	2	C: centro de reacción del fotosistema I P: fotosíntesis F: unión de metales iónicos	
c8389_g1_i1	Proteína no caracterizada LOC103495177 (predicción)	1002	4	2.44E-12	54.5	4	F: unión de ácidos nucleicos P: integración del ADN F: unión iones de zinc	

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GOs <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c9019_g1_i1	Familia proteínica mip18 parecida a at1g68310	1489	10	6.25E-11	82.1	0		
c9953_g1_i1	Proteína no caracterizada LOC103716548 (predicción)	733	10	2.55E-27	59.6	2	F: unión metales iónicos F: unión iones de zinc P: respuesta al estrés	
c10121_g1_i1	superóxido dismutasa Cu Zn	747	10	1.81E-12	52.8	3	P: respuesta a químicos P: respuesta celular a estímulos	
c10809_g1_i1	Proteína hipotética PBOR_30375	630	1	9.21E-07	78	0		
c11128_g1_i1	Peptidil-prolil tipo isomerasa, 70 kDa	510	10	2.99E-17	68.7	0		
c12252_g1_i1	Dominio LOB con proteína tipo 41	862	10	5.92E-72	79.3	0		
c12323_g1_i1	Proteína tipo cloroplástica de unión a clorofila a-b	573	10	1.91E-97	91.4	6	C: cloroplasto C: fotosistema II C: componente integral de la membrana F: unión a clorofila	

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GOs <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c12557_g1_i1	Poliproteína tipo copia	1030	10	3.03E-74	66.6	2	P: fotosíntesis, recolección de luz P: unión proteína-cromóforo F: unión P: proceso celular C: envoltura del cloroplasto	
c13268_g1_i1	Proteína de choque térmico 70	591	10	3.21E-114	99.5	4	F: unión a ATP P: respuesta al calor P: respuesta al ion cadmio (Cd <sup>2+</sup> ) C: parte de la célula F: actividad metiltioadenosina nucleosidasa	
c14304_g1_i2	Proteína tipo 5 - metiltioadenosina S-adenosil homosisteína nucleosidasa 1	816	10	1.33E-09	78.4	7	P: proceso biosintético del etileno P: proceso biosintético de L-metionina a partir de S-adenosil homocisteína	(3.2) glicosilas as

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GOs <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c15349_g1_i1	Serina treonina cinasa con un probable receptor tipo Irr	359	10	2.39E-21	63.0	1	P: respuesta a aguas profundas P: proceso metabólico de arginina P: proceso metabólico de prolina F: actividad transferasa, transferencia de grupos que contienen fósforo F: unión a fosfato piridoxal	
c16369_g1_i1	Parcial	180	10	7.22E-35	94.4	3	F: actividad allin liasa P: proceso metabólico	(4.4) carbón-azufre liasas
c16472_g1_i1	Proteína sin caracterizar LOC104214865 (predicción)	362	1	1.04E-07	55	0		
c16859_g1_i1	Fosfolipasa a	477	10	3.98E-14	82.1	1	P: proceso metabólico de lípidos	
c17579_g1_i1	Proteína no caracterizada	1688	10	5.11E-17	51.8	0		

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GO's <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c18198_g1_i1	LOC104232162 (predicha) Proteína tipo cloroplástica de unión a clorofila II a-b	321	10	4.89E-29	93.6	2	C: membrana P: fotosíntesis, recolección de luz	
c19733_g1_i1	Proteína de la familia de las isocorismatasa hidrolasas	872	10	4.56E-77	76.2	2	F: actividad hidrolasa P: proceso metabólico	
c19821_g1_i1	Proteína hipotética VITISV_011510	2044	10	2.43E-22	46.2	4	F: unión a ácidos nucleicos P: integración del ADN F: unión a iones de zin C: mitocondria F: unión a ARN P: replicación del ADN dependiente de ARN	
c21866_g1_i1	Contiene un domino de transcriptasa reversa	5697	10	2.09E-84	61.8	3	F: actividad de ADN polimerasa dirigida a ARN	
c23245_g1_i1	Proteína argonauta mel1	292	10	3.94E-17	66.6	1	F: unión a ácidos nucleicos	
c23587_g1_i1	Proteína no caracterizada de baja	1992	2	2.70E-07	49.5	0		

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GO's <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c24466_g1_i1	calidad LOC104435745 (predicción) Proteína tipo miosina 11, isoforma x1	380	10	4.05E-09	70.2	0		
c26001_g1_i1	Proteína no caracterizada LOC103441657 (predicción)	306	10	1.19E-16	57.5	0		
c26695_g1_i1	Zinc metaloproteasa ftsh dependiente de ATP tipo mitocondrial cloroplástica	246	10	1.60E-11	82.9	13	C: mitocondria C: envoltura mitocondrial C: membrana F: actividad peptidasa dependiente de ATP F: actividad metaloproteasa F: unión a ATP P: proteólisis P: respuesta al calor P: respuesta a alta intensidad de luz P: proceso catabólico	(3.6) actuando en anhídrido s ácidos (3.4) actuación en enlaces peptídico s (peptidas as hidrolasa s)



Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GOs <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c30638_g1_i2	Proteína no caracterizada LOC104647883 (predicción)	2309	10	4.20E-31	54.9	10	P: proceso biosintético de glucosinolato P: regulación de la localización de proteína P: proteólisis dependiente de ATP	
c33229_g1_i2	gag pol	2238	10	6.05E-34	62.7	1	F: unión	
c35868_g1_i2	Arginina n-metiltransferasa 7	241	10	2.93E-10	79.5	2	F: actividad de metiltransferasa P: metilación de proteína	
c37365_g1_i1	Proteína hipotética VITISV_041315	213	3	3.93E-08	69.33	2	F: unión a ácidos nucleicos P: integración del ADN	
c37419_g1_i1	Copia tipo proteína retrotransposoma	1045	10	3.69E-25	62	3	F: unión a ácidos nucleicos P: integración del ADN F: unión al ion zinc	

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GOs <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c38244_g1_i1	Proteína sin caracterizar LOC103711556 (predicción)	1245	10	6.63E-52	52.2	2	F: unión a iones metálicos F: unión a iones de zinc	
c40732_g1_i1	Proteína ribosomal 40s tipo s6	507	10	7.91E-11	65	2	C: citosol C: ribosoma	
c40876_g1_i2	Proteína sin caracterizar LOC103869784 (predicción)	1967	10	1.47E-96	58.1	0		
c41056_g1_i1	Proteína afp3 familia ninja	1255	10	8.84E-37	79.1	0		
c41230_g1_i1	Factor de elongación 1 (parcial)	280	10	2.88E-19	99.4	6	F: actividad de factor de elongación de la traducción F: actividad GTPasa F: unión al GTP P: proceso catabólico del GTP C: ribosoma P: regulación de la elongación traduccional	(3.6) Acción sobre anhídridos ácidos
c42022_g1_i1	Proteína sin caracterizar	263	10	7.23E-12	58	3	F: unión a ácidos nucleicos	

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GOs <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
	LOC104594965 (predicción)						P: integración de ADN F: unión a iones de zinc C: mitocondria C: parte de la membrana	
c42317_g1_i1	Atp8	579	10	4.81E-42	73.3	3	F: actividad de transportador membranal	
c43558_g1_i1	Proteína no caracterizada LOC103976853 (predicción)	1149	10	5.09E-120	84.9	0		
c43902_g1_i1	Proteína no caracterizada LOC103712310 (predicción)	931	3	6.37E-14	43.33	0		
c44021_g1_i1	Proteína de la familia de las hidrolasas	1049	10	2.13E-160	90.9	4	F: actividad de hidrolasa P: proceso metabólico P: de-etiolación P: respuesta a karriquinas	
c46079_g1_i1	Proteína cognada a una de choque térmico 70 kDA (expresada)	570	10	7.98E-58	90.4	14	C: pared celular, membrana de la vacuola, aparato	

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GOs <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c46540_g1_i1	Centro de reacción del fotosistema I tipo subunidad cloroplástica	801	10	3.01E-63	87	4	de Golgi, membrana plasmática, plasmodesmo, envoltura del cloroplasto, ribosoma citosólico, apoplasto F: unión a proteasas, a ATP P: respuesta al calor, a virus, al ion cadmio, karriquinas C: fotosistema, tilacoide del cloroplasto F: unión a la clorofila P: fotosíntesis	
c46822_g1_i2	Proteína no caracterizada LOC102623579 (predicción)	2648	10	2.27E-10	56.5	0		
c47123_g1_i2	Dominio SPX que contiene una proteína	1022	10	0.00E+00	87.5	3	C: mitocondria, componente	

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GOs <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
	de membrana_17046 (parecido)						integral de la membrana P: transporte transmembranal	
c47385_g1_i2	Proteína no caracterizada LOC104220969 (predicción)	2346	10	5.22E-35	52.5	0		
c48160_g1_i2	Serina treonina cinasa sap3 (parecida)	685	10	2.35E-56	82.1	5	F: actividad de serina/treonina cinasa, unión a ATP P: fosforilación de proteínas, respuesta al estrés osmótico, proceso metabólico de la familia de aa serina	(2.7) transferencia de grupos que contienen fósforo
c48219_g1_i1	dehidrina cor410 (trigo_cold regulated protein)	834	10	2.84E-12	56.1	2	P: respuesta al agua y a estrés	
c48385_g1_i1	Proteína no caracterizada LOC104417924 (predicción)	2352	10	3.67E-18	52.9	0		

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GOs <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c48453_g1_i2	Proteína no caracterizada LOC104090981 (predicción)	1973	10	7.38E-21	53.3	1	F: unión al DNA	
c48657_g1_i2	Peroxidasa catiónica tipo SPC4	1283	10	4.17E-17	76.6	1	F: unión, actividad oxidoreductasa F: unión a DNA, unión a cromatina	
c49426_g2_i1	Factor de transcripción rax2 (parecido a )	1352	10	1.39E-65	84	5	P: respuesta a giberelinas, respuesta a ácido salicílico C: cromatina P: proceso metabólico	
c49526_g1_i2	Galacturonosil transferasa 7 isoforma x1 (probable)	2067	10	0.00E+00	72.3	2	F: actividad de transferasa, transfiriendo grupos glicosílicos	

<sup>1</sup>GOs, genes ortogonales anotados y/o descritos; P, proceso biológico; F, función molecular; C, componente celular

De las 56 homologías presentadas en el cuadro anterior, se destacan las siguientes:

- *Proteína de choque térmico clase II*, también conocida como chaperona, la cual es expresada en respuesta al estrés. Reportada en tomate silvestre (*Solanum peruvianum*), soya (*Glycine max*), y chícharo (*Pisum sativum*) (UniProt, 2015). Este tipo de proteínas se encuentran altamente conservadas en todos los organismos, tienen un papel en el desdoblamiento/plegamiento de proteínas, ensamblaje de complejos multiproteicos, transporte de proteínas a su compartimento celular correcto, control del ciclo celular, señalización y protección de la célula contra estrés/apoptosis (Li y Srivastava, 2003).
- *Proteína ribosomal 40S (s6)*, como su nombre lo indica, es un constituyente estructural del ribosoma, esta proteína está involucrada en la regulación de la traducción y en la fisiología del organismo y de la célula (Magnuson *et al.*, 2012). Se ha observado que también regula el tamaño de la célula, su proliferación, y la homeostasis de la glucosa, quizá regulada por fitohormonas (UniProt, 2015; Turck *et al.*, 2004); además de su participación en el proceso de desarrollo requerido para la correcta organización de los meristemas radicales laterales en Arabidopsis (Horiguchi *et al.*, 2003).
- *Familia de proteínas ninja – AFP3*, esta actúa como regulador negativo de la respuesta a ABA y al estrés. Muestra hipersensibilidad a la sal y una pequeña hipersensibilidad a la glucosa (UniProt, 2015).
- *Factor de elongación 1 (parcial)*, una de las cuatro subunidades que componen la traducción de los organismos eucariontes. Cataliza la unión de aminoacil-tRNA al sitio-A del ribosoma en una forma dependiente de GTP durante la síntesis de proteínas, aunque también parecería que participa en procesos no traduccionales. Los factores de elongación, en general están presentes en el ciclo celular; en el ribosoma, facilita la elongación traduccional desde la formación del primer enlace peptídico hasta el último (UniProt, 2015). La sobre expresión de este gen en el brote a la quinta semana, sugiere una producción temprana de proteínas.

- *Cinasa SAPK3 serina/treonina*, las cinasas, familia de enzimas que modifican una sustancia al fosforilarla están reportadas como participantes en las cascadas de señalización y en los mecanismos de aclimatación al frío (Janská *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2010). La sobre expresión de este gen, supondría que las células del brote detectan de alguna manera el frío y utilizan este tipo de enzimas como respuesta al estrés.

- *Dehidrina COR410*, los genes regulados por el frío también han sido indicados como participantes en el mecanismo de aclimatación al frío (Janská *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2010), lo cual, salvo previa validación, tiene sentido que este gen esté sobre expresado en la condición de 5 °C.

- *Factor de transcripción (TF) RAX2*, los factores de transcripción son pequeñas moléculas de proteínas que se pueden unir a las proteínas o a los ácidos nucleicos y regular la expresión de genes y/o la post-traducción de proteínas (UniProt, 2015). TF es un activador de la transcripción que se le atribuye un papel positivo en la regulación de los meristemos axilares, su formación y desarrollo especialmente durante la florescencia. Es posible que esto esté correlacionado positivamente con la obtención de plantas con escape floral (70 %).

En el cuadro 7.17 se muestran algunas de las homologías encontradas para los transcritos reprimidos en la condición de 5 °C.



**Cuadro 7.17** Proteínas asociadas a los transcritos reprimidos diferencialmente

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GOs <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c185_g1_i1	Proteína tgb1	133	10	2.94E-21	81.8	5	F: función de helicasa, unión a ATP P: transporte, proceso metabólico, proceso viral	(3.6) Acción sobre ácidos anhídridos
c1103_g1_i1	Predicción: proteína no caracterizada LOC104217544	2866	10	6.98E-96	51.7	1	P: desarrollo del polen	
c1335_g1_i1	Transporte de sulfatos de baja afinidad 3-like	2332	10	0	78.5	4	C: membrana F: actividad de transportador transmembranal de sulfatos P: transporte de sulfatos, transporte transmembranal	
c1488_g1_i1	Dominio burp que contiene una proteína 3-like	240	10	1.1E-23	71.5	0		

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GO's <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c2116_g1_i1	Proteína 1-like, familia mate efflux	1885	10	0	78.3%	10	C: componente integral de la membrana F: actividad de transportador transmembranal de citrato	
c4510_g1_i1	Proteína mpv17	1166	10	4.92E-83	80.6	2	P: respuesta celular al ion hierro C: envoltura del cloroplasto, componente integral de la membrana	
c5101_g1_i1	UDP-glucosiltransferasa 74f2-like	1789	10	2.1E-169	66.5	3	F: actividad UDP-glucosiltransferasa P: proceso de los ácidos monocarboxílicos, proceso metabólico	(2.4) glicosiltransferasas

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GOs <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c5906_g1_i1	Citocromo p450 78a4-like	1768	10	0	74.7	2	que contiene compuestos con benzeno F: actividad oxidoreductasa, unión con iones metálicos	
c7421_g1_i1	Predicción: proteína sin caracterizar LOC100827443	422	8	7.5E-10	58.38	1	C: mitocondria	
c7711_g1_i1	ADP-factor de ribosilación, proteína agd12-like activadora de GTPasa	1186	10	4.9E-131	74.3	2	F: unión a iones metálicos P: regulación de actividad GTPasa	
c8798_g1_i1	GDSL lipasa esterasa at3g26430-like	790	10	1.6E-99	72.6	1	F: actividad hidrolasa que actúa sobre enlaces éster	
c8807_g1_i1	NAD-deshidrogenasa subunidad beta dependiente de isocitrato	366	10	2.6E-24	87.5	4	F: unión al ion Mg <sup>2+</sup> , actividad de isocitrato deshidrogena	(1.1) Actúa sobre el grupo de donadores CH-OH

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GO's <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
							sa (NAD <sup>+</sup> ), unión al NAD P: ciclo de ácido tricarboxílico	(3.6) actúa sobre ácidos anhídridos (3.7) transferencia de grupos que contienen fósforo (2.1) transferencia de grupos de un carbono
c8878_g1_i2	Familia de proteínas glicoproteínas isoforma 1 ricas en hidroxiprolina	2538	10	0	77.0	1	P: reubicación el cloroplasto	
c9293_g1_i1	Proteína de choque térmico kda clase i	655	10	4.24E-22	66.3	0		
c9376_g1_i1	Proteína FLX like-2	2211	10	2.2E-103	73.4	0		
c9799_g1_i1	Nodulina temprana like-1	917	10	4.0E-54	81.5	3	F: unión al ion cobre, actividad de acarreador de electrones P: transporte de electrones	

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GO's <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c10058_g1_i1	ATPasa subunidad catalítica $\alpha$ tipo-v	875	10	1.6E-84	97.3	16	C: vacuola, pared celular, aparato de Golgi, membrana plasmática, plasmodesmo, cubierta del cloroplasto, transportador de protones ATPasa-V, apoplasto F: unión de proteasa, unión al ATP, actividad de ATPasa transportador a de protones (mecanismo rotacional), P: organización Golgi, desarrollo del	(3.6) actúa sobre ácidos anhídridos

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GOs <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c10063_g1_i1	Parecida a NADH-citocromo b5 reductasa	1198	10	1.4E-165	91.6	5	<p>polen  repuesta al estrés salino,  hidrólisis de ATP  acoplado a transporte de protones,  fosforilación oxidativa  C: retículo endoplasmático,  membrana plasmática,  pared celular tipo vegetal  F: actividad oxidoreductasa  P: cadena de transporte de electrones</p>	
c10140_g1_i1	Proteína hipotética SORBIDRAFT_02g013190	510	10	1.6E-09	59.4	0		

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GO's <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c12299_g1_i1	Proteína blanco para xklp2-a-like	846	10	5.8E-28	58.4	3	C: huso, microtúbulo P: división nuclear mitótica F: unión al ARN, actividad de ADN	
c12402_g1_i1	Predicción: proteína no caracterizada LOC104446716	466	10	3.2E-23	58	3	polimerasa P: replicación del ADN dependiente de ARN C: mitocondria, vacuola, estroma del cloroplasto, tilacoide, envoltura del cloroplasto	
c12667_g1_i1	Ribonucleasa uk114-like	786	10	1.5E-53	84.1	8	F: actividad deaminasa P: proceso metabólico,	

Nombre	Descripción	Tamaño (pb)	# Hits	Valor E	Similitud promedio (%)	# GOs <sup>1</sup>	GO's <sup>1</sup>	Función enzimática
c12777_g1_i1	Factor de transcripción erf038-like sensible a etileno	812	10	4.6E-45	65	5	respuesta al ion cadmio P:regulación de la transcripción, transcripción C: núcleo F: actividad de factor de transcripción que se une a una secuencia específica de ADN	
c13741_g1_i1	Calmodulina 5	891	10	3.1E-91	91.5	2	C: núcleo F: unión al ion Ca <sup>2+</sup>	
c14134_g1_i1	TSL cinasa isoforma x1	1169	10	1.2E-28	50	0		

<sup>1</sup>GOs, genes ortogonales anotados y/o descritos; P, proceso biológico; F, función molecular; C, componente celular



El análisis completo de los resultados obtenidos con la secuenciación masiva del transcriptoma de ajo, nos dará un panorama ampliado de lo que pudiera estar pasando, al conocer con relativa seguridad la función de las proteínas cuyos genes se observaron expresados diferencialmente.

## VIII. CONCLUSIONES

Aunque las variables de crecimiento analizadas en campo y condiciones de temperatura semi-controlada no fueron comparables, en ambos casos se observó un adelanto en el ciclo de desarrollo de las plantas 5C.

Se obtuvieron bancos substractivos de genes de dientes almacenados a 5 °C y TA y de órganos de plantas durante el desarrollo.

Los genes sobre expresados y detectados por la técnica SSH? en la condición de 5 °C permitió explicar la inducción del escapo floral, el cambio en el metabolismo de los fructanos y la acumulación de compuestos fenólicos y antocianinas descritos en otros trabajos de este mismo laboratorio.

En este sentido, este trabajo permitió señalar lo siguientes aspectos:

La sobre expresión del gen 1 SST; en los brotes de dientes 5C respecto de TA; en las dos últimas semanas de acondicionamiento, parece indicar que desde el acondicionamiento hay un cambio en el metabolismo de fructanos.

No obstante, esta condición cambió a los 155 DDS y en la cosecha, los bulbos y hojas de las plantas TA mostraron mayores niveles de expresión de este gen en comparación con las plantas 5C. Lo cual explica los mayores tamaños de bulbos de las plantas TA respecto de las plantas 5C.

Los datos de expresión se correlacionaron con los procesos de acumulación de fructanos y explican porque en las plantas 5C se interrumpe la acumulación de fructanos en los bulbos al final de su ciclo de cultivo mientras que en las plantas TA mantienen activo el proceso de acumulación de fructanos hasta el momento de la cosecha.

La expresión diferenciada del gen *FRIGIDA* en los dientes semilla TA y 5C parece explicar también la expresión diferenciada de aparición del escapo floral al final del desarrollo del cultivo así como también es posible que este gen tenga efecto en el adelanto del ciclo de cultivo de las plantas 5C.

La expresión del gen SORBIDRAFT parece estar ligado a una respuesta al estrés de frío; aunque no es posible definir con certeza su participación en este proceso.

La secuenciación masiva de genes, permitió señalar que los efectos principales que tiene el acondicionamiento a 5 °C se encuentran ubicados a nivel de membranas y a las proteínas asociadas a las rutas metabólicas.

## IX. REFERENCIAS

- Aggarwal K. y K. H. Lee (2003). Functional genomics and proteomics as a foundation for systems biology. *Briefings in functional genomics and proteomics*. 2 (3), 175-184.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y D. J. Lipman. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215, 403-410.
- Apolinário, A. C., Goulart de Lima Damasceno, B. P., Esberard de Macêdo Beltrão, N., Pessoa, A., Converti, A. y J. A. da Silva. (2014). Inulin-type fructans: a review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymers*. 101, 368-378.
- Bandara, M. J., Krieger, K., Slinkard, A. E. y K. K. Tanino (1999). Pre-plant chilling requirements for cloving of spring-planted garlic. *Canadian Journal of Plant Science*. 379-384.
- Barry, P. (2007). Genome 2.0. Mountains of new data are challenging old views. *Science News*. 172, 154-156.
- Baumgartner, S., Dax, T. G., Praznik, W. y H. Falk (2000). Characterization of the high-molecular weight fructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.). *Carbohydrate Research*. 328, 177-183.
- Beadle, G. W. y E. L. Tatum (1941). Genetic control of biochemical reaction in *neurospora*. *Genetics*. 27, 499-506.
- Bowsher, C., Steer, M. y A. Tobin. (2008). *Plant Biochemistry*. New York: Garland Science. 446 p.
- Brewster, J. L. (1994). *Onions and other vegetable alliums*. Wallingford. UK: CAB International.
- Browse, J. y Z. Xin (2001). Temperature sensing and cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology*. 4, 241-246.

- Burba, J.L., 2007. Manejo de Semilla de ajo frigioinducida. Proyecto Ajo INTA 088. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental La Consulta, Argentina. pp. 13.
- Bustin, S. A. (2010). Why the need for qPCR publication guidelines? – The case for MIQE. *Methods*. 50, 217-226.
- Castillejo M. A., Bani M., y Rubiales D. (2015). Understanding pea resistance mechanisms in response to *Fusarium oxysporum* through proteomic analysis. *Phytochemistry*. (En prensa: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.01.009> )
- Catalá, R., Díaz, A. y J. Salinas (2012). Chapter 19 – Molecular responses to extreme temperatures. En: *Plant biotechnology and agriculture: Prospects for the 21st century*. Edit: A. Altman y P. M. Hasegawa. Elsevier. 287-307.
- Cavagnaro, P. F. y C. R. Galmarini. (2007). Garlic. En: *Genome mapping and molecular breeding in plants. Volume 5: vegetables*. Ed. C. Kole. 349-364.
- Chandrashekar, P. M., Prashanth, K. V. H. e Y. P. Venkatesh (2011). Isolation, structural elucidation and immunomodulatory activity of fructans from aged garlic extract. *Phytochemistry*. 72, 255-264.
- Choi, K., Kim, J., Hwang H-J., Kim, S., Park, C. y S. Y. Kim. (2011). The FRIGIDA complex activates transcription of *FLC*, a strong flowering repressor in *Arabidopsis*, by recruiting chromatin modification factors. *The Plant Cell*. 23, 289-303.
- Darbyshire B y R. J. Henry (1981). Differences in fructan content and synthesis in some *Allium* species. *New Phytol*. 87, 249-256.
- Del Pozo L., A., y M. I. González A. (2005). Developmental responses of garlic to temperatura and photoperiod. *Agricultura Técnica (Chile)*. 65 (2), 119-126.

- Diatchenko, L., Lau, Y. F. C., Campbell, A. P., Chenchik A., Moqadam, F., Huang, B., Luckyanov, S., Luckyanov, K, Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. y P. D. Siebert. (1996). Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific DNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 93 (13), 6025-6030.
- Ernst, M. K., Chatterton, N. J., Harrison, P. A. y G. Matitschka. (1998). Characterization of fructan oligomers from species of the genus *Allium* L. *Journal of Plant Physiology*. 153, 53-60.
- Galaz-Pérez. E. A. (2008). Efecto de factores ambientales precosecha en el desarrollo de la planta, bulbificación y acumulación de fructanos en ajo. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 106 p.
- Gerstein, M. B., Bruce, C., Rozowsky, J. S., Zheng, D., Du J., Korbel, J. O., Emanuelsson, O., Zhang, Z. D., Weissman, S. y M. Snyder. (2007). What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Research*. 17, 669-681.
- Grabherr, M. G., Hass, B. J., Yassour, M., Levin, J. L., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N. y A. Regev. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*. 29 (7)
- Graham L. S. y Sticklen M. B. (1994) Plant chitinases. *Canadian Journal of Botany* 72(8): 1057-1083.
- Green, M. R. y J. Sambrook. (2012). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 4<sup>a</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Estados Unidos de América. pp. 2028.

- Gupta, R. y R. Deswal. (2012). Low temperatures stress modulated secretome analysis and purification of antifreeze protein from *Hippophae rhamnoides*, a himalayan wonder plant. *Journal of proteome research*. 11: 2684-2696.
- Guy, C. L., Huber, J. L. A. y S. C. Huber. (1992). Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiol*. 100, 502-508.
- Gvozdanović-Varga, J., Vasić, M., Červenski, J. y D. Bugarski (2004). Genotype and environment effects on yield and quality of winter garlic. *Genetika*. 36 (2), 161-170.
- Hanelt, P. (1990). Taxonomy, evolution and history. En: *Onions and allied crops I*. Rabinowitch, H. D. y J. L. Brewster (eds.) Florida, CRC Press. pp. 1-26.
- Heldt, H.W. y F. Heldt. *Plant Biochemistry*. 4a Ed. Academic Press. United Kingdom. 2010.
- Heredia-García, E. y F. Delgadillo-Sánchez. (2000). *El Ajo en México. Origen, mejoramiento genético, tecnología de producción*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. León, Gto. México. 102 pp.
- Hisano, H., Kanasawa, A., Yoshida, M., Humphreys, M. O., Iizuka, M., Kitamura, K. y T. Yamada (2008). Coordinated expression of functionally diverse fructosyltransferase genes is associated with fructan accumulation in response to low temperatures in perennial ryegrass. *New Phytologist*. 178, 766-780.
- Horiguchi, G., Kodama, H. y K. Iba. (2003). Mutations in a gene for plastid ribosomal protein S6-like reveal a novel developmental process required for the correct organization of lateral root meristem in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 33 (3), 521-529.

- Integrated Taxonomy Information System, ITIS (2015). <http://www.itis.gov/>
- Jangam, G. B., y S. L. Badole. (2014). Chapter 46 – Garlic (*Allium sativum*): role in metabolic disorder. En Watson, R. R., Preedy, V. R. y S. Zibadi (eds.) Polyphenols in human health and disease. Volumen 1, 611-614.
- Janská, A., Maršík, P., Zelenková, S. y J. Ovesná. (2010). Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment? Plant Biology. 12, 395-405.
- Jaramillo, J. V. (1994). Allium genetic resources in Latin America: situation and prespectives. Acta Horticulturae. 358, 147-149.
- Jeong B-R y T. L. Housley. (1990). Fructan metabolism in wheat in alternating warm and cold temperatures. Plant Physiol. 93, 902-906.
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R. y C. Dean. (2000). Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. Science. 290: 344-347.
- Jones M.G., Collin H.A., Tregova A., Trueman L., Brown L., y Cosstick R.. (2007). The Biochemical and Physiological Genesis of Alliin in Garlic. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology. 1(1) 21-24
- Kaeser, W. (1983). Ultrastructure of storage cells in Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.) vesicle formation during inulin synthesis. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 111, 253-260.
- Kamenetsky, R., Faigenboim, A., Mayer, E. S., Michael, T. B., Gershberg, C., Kimhi, S., Esquira, I., Shalom, S. R., Eshel, D., Rabinowitch, H. D. y A. Sherman. (2015). Integrated transcriptome catalogue and organ-specific profiling of gene expression in fertile garlic (*Allium sativum* L.). BMC Genomics. 16 (12), 1-15.
- Kamenetsky, R. (2007). Garlic: Botany and horticulture. En Jules Janick (ed.) Horticultural Reviews. 33, 123-172.



- Kamenetsky, R., Shafir, I. L., Zemah, H., Barzilay, A. y H. D. Rabinowitch (2004). Environmental control of garlic growth and florigenesis J. Amer. Soc. Hort. Sci. 129 (2), 144-151.
- Kaplan, F., Kopka, J., Sung, D. Y., Zhao, W., Popp, M., Porat, R. y C. L. Guy (2007). Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of col-regulated gene expression with modifications in metabolite content. The Plant Journal. 50, 967-981.
- Karp, Gerlad. (2009). Biología celular y molecular. Conceptos y aplicaciones. Capítulo I, Introducción al estudio de la biología celular y molecular. 5ª Edición. McGraw-Hill. México
- Krebs, J. E., Goldstein, E. S. y S. T. Kilpatrick. (2014). Genes XI. 11va Ed. Jones & Bartlett Learning. Estados Unidos de Norteamérica. pp. 940.
- Kusch, U., Greiner, S., Steininger, H., Meyer, A. D., Corbière-Divialle, H., Harms, K. y T. Rausch (2009). Dissecting the regulation of fructan metabolism in chicory (*Cichorium intybus*) hairy roots. New Phytologist. 184, 127-140.
- Laere, A. y W. Van den Ende. (2002). Inulin metabolism in dicots: chicory as a model example. Plant, cell and environment. 25, 803-813.
- Ledesma, A., Nuñez, S. B. y J. A. Argüello. (1997). Bulbing physiology in garlic (*Allium sativum* L.) CV. "Rosado Paraguayo" II. Characterization of ontogenic stages by shoot growth dynamics and its relation to bulbing. Acta Hort. 433, 405-416.
- Lee, I. y R. M. Amasino. (1995). Effect of vernalization, photoperiod, and light quality on the flowering phenotype of Arabidopsis plants containing the *FRIGIDA* gene. Plant Physiology. 108, 157-162.
- Li, Z., y P. Srivastava. (2003). Heat shock proteins. Current protocols in immunology. A.1T.1-A.1T.6

- Liang, P. y A. B. Pardee. (1992). Differential display of eukaryotic Messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*. 257 (5072), 967-971.
- Lisitsyn, N., Lisitsyn, N. y M. Wigler. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science*. 259 (5097), 946-951.
- Lister, R., Gregory, B. D. y J. R. Ecker. (2009). Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes and beyond. *Current opinion in Plant Biology*. 12, 107-118
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*. 25, 402-408.
- Lomas-Soria, C. (2012). El consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto en genes expresados diferencialmente en riñón de ratas diabéticas. Tesis de Doctorado en Ciencias de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 142 p.
- López-Hernández, L. E. (2010). Efecto del almacenamiento a baja temperatura y aplicación de paclobutrazol a bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) cv. 'Coreano' en su crecimiento, calidad de cosecha y perfil de fructanos. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 90 p.
- López-Serrano, M., M. del Campo, E., Sabater, B. y M. Martín. (2001). Primary transcripts of *ndhD* of Liliaceae and Aloaceae require editing of the start and 20<sup>th</sup> codons. *Journal of Experimental Botany*. 52 (354): 179-180.
- Losso, J. N. y S. Nakai (1997). Molecular size of garlic fructooligosaccharides and fructopolysaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45 (11), 4342-4346.

- Lue, M. Y. (2002). Cloning of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase gene from garlic. Enviado a las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ.
- Mann, L. K. (1952). Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. HILGARDIA. A Science Published by the California Agricultural Experiment Station. 21 (8), 195-251.
- Marchler-Bauer, A., Zheng, C., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lanczycki, C. J., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D. y S. H. Bryant. (2013). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. Nucleic Acids Research. 41, D348-D352.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. Annual review of Genomics and Human Genetics. 9, 387-402.
- Martínez-Noël, G., Tognetti, J. A. y H. G. (2001). Protein kinase and phosphatase activities are involved in fructan synthesis initiation mediated by sugars. Planta. 213, 640-646.
- Mathew, D., Forer, Y., Rabinowitch, H. D. y Kamenetsky R. (2011). Effect of long photoperiod on the reproductive and bulbing processes in garlic (*Allium sativum* L.) genotypes. Environmental and Experimental Botany. 71, 166-173.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. y K. G. Ahern. 2002. Bioquímica. Capítulo 4, ácidos nucleicos. Pearson Educación. Madrid.
- McCallum, J., Clarke, A., Pither-Joyce, M., Shaw, M., Butler, R., Brash, D., Scheffer, J., Sims, I, van Heusden, S., Shigyo, M., y M. J. Havey. (2006). Genetic mapping of a major gene affecting onion bulb fructan content. Theor Appl Genet. 112, 958-967.
- Mujica H. y M. Pérez de Camacaro. (2006). Características físicas y químicas de ajo cosechado en dos estados de madurez y almacenado en condiciones ambientales. Bioagro. 18 (3), 171-175.

- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 262 (4), 56-61, 64-65.
- Müller-Esterl, W. (2011). *Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. Ed. Reverté. Barcelona. p. 79.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y H. Erlich. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 51, 263-273.
- National Center for Biotechnology Information, NCBI (2015). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Neta, R., David-Schwartz, R., Peretz, Y., Sela, I., Rabinowitch, H. D., Flaishman, M. y R. Kamenestky. (2011). Flower development in garlic: the ups and downs of *gaLFY* expression. *Planta*. 233, 1063-1072.
- Ngara R., Ndimba R., Borch-Jensen J., Nørregaard Jensen O., y Ndimba B. (2012). Identification and Profiling of Salinity Stress-Responsive Proteins in Sorghum bicolor Seedlings. *J. of Proteomics*, 75: 4139-4150
- Nurwantoro, Bintoro, V. P., Legowo, A. M., Purnomoadi, A. y B. E. Setiani. (2015). Garlic antioxidant (*Allium sativum* L.) to prevent meat rancidity. *Procedia Food Science*. 3, 137-141.
- Olvera Carranza, C., Ávila Fernández, A., Bustillo Armendáriz, G. R. y A. López-Munguía. (2015). Chapter 15 – Processing of fructans and oligosaccharides from agave plants. En Preedy, V. R. (ed.) *Processing and impact on active components in food*. p. 121-129.
- Oono, Y., Seki, M., Satou, M., Iida, K., Akiyama, K., Sakurai, T., Fujita, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. y K. Shinozaki. (2006). Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* genes during cold acclimation and deacclimation using microarrays. *Functional & Integrative Genomics*. 6: 212-234.
- Paterson, A. H., Bowers, J. E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., Haberer, G., Hellsten, U., Mitros, T., Poliakov, A.,

- Schmutz, J., Spannagl, M., Tang, H., Wang, X., Wicker, T., Bharti, A. K., Chapman, J., Feltus, F. A., Gowik, U., Grigoriev, I. V., Lyons, E., Maher, C. A., Martis, M., Narechania, A., Ollilar, R. P., Penning, B. W., Salamov, A. A., Wang, Y., Zhang, L., Carpita, N. C., Freeling, M., Gingle, A. R., Hash, C. T., Keller, B., Klein, P., Kresovich, S., McCann, M. C., Ming, R., Peterson, D. G., Rahman, M., Ware, D., Westhoff, P., Mayer, K. F. X., Messing, J. y D. S. Rokhsar. (2009). The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature*. 457, 551-556.
- Peshev, D. y W. Van den Ende. (2014). Fructans: Probiotics and immunomodulators. *Journal of Functional Foods*. 8, 348-357.
- Pontis, H. (2004). De nucleótidos azúcares a estrés en plantas. Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal. <http://www.safv.com.ar/index.htm>
- Portela, J. A. (1996). El Ambiente como regulador del desarrollo de las plantas. Su efecto sobre el ajo. *Avances en Horticultura*. 1 (1), 19-40.
- Protein data base Europe (Junio, 2014). <http://www.ebi.ac.uk>.
- Rahim, M. A. y R. Fordham. (1988). Effect of storage temperatura on the initiation and development of garlic cloves (*Allium sativum* L.). *Scientia Horticulturae*. 37, 25-38.
- Rahim, M. A. y R. Fordham. (2001). Environmental manipulation for controlling bulbing in garlic. *Acta Horticulturae*. 555: 181-188.
- Reddy, P. S., Reddy, D. S., Sharma, K. K., Bhatnagar-Mathur, P. y V. Vadez. (2015). Cloning and validation of reference genes for normalization of gene expression studies in pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] by quantitative real-time PCR. *Plant Gene*. 1, 35-42.
- Renneberg, R. (2012). *Biología para principiantes*. Ed. Reverté. Barcelona. p. 26.

- Rotem, N., Shemesh, E., Akad, F., Edelbaum, O., Kamenetsky, R., Rabinowitch H. D. y I. Sela. (2004). FRIGIDA (*Allium sativum*). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=45594382>
- Sanger, F., Nicklen, S. y A. R. Coulson. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74 (12), 5463-5467.
- Shouk, R., Abdou, A., Shetty, K., Sarkar, D. y Eid, A. H. (2014). Mechanisms underlying the antihypertensive effects of garlic bioactives. *Nutrition Research*. 34, 106-115.
- Singh, U. P., Prithiviraj, B., Sarma, B. K., Singh M. y A. B. Ray (2001). Role of garlic (*Allium sativum* L.) in human and plant diseases. *Indian Journal of Experimental Biology*. 39, 310-322.
- Son, J-H., Park, K-C., Lee, S-I., Kim, H-H., Kim, J-H., Kim, S-H. y N-S. Kim. (2012). Isolation of cold-responsive genes from garlic, *Allium sativum*. *Genes & Genomics*. 34: 93-101.
- Sprenger, N., Bortlik, K., Brandt, A., Boller, T., y A. Wiemken. (1995). Purification, cloning, and functional expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 92, 11652-11656.
- Stitt, M. y V. Hurry (2002). A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology*. 5, 199-206.
- Strand, A., Foyer, C. H., Gustafsson, P., Gardeström P. y V. Hurry. (2003). Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant, Cell and Environment*. 26, 523-535.
- Suleira, H. A. R., Butt, M. S., Khalid, N., Sultan, S., Raza, A., Aleem, M. y M. Abbas. (2015). Garlic (*Allium sativum*): diet based therapy of 21st

century—a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 5 (4), 271-278.

- Sun, X., Zhou, S., Meng, F., Liu, S. (2012). De novo assembly and characterization of the garlic (*Allium sativum*) bud transcriptome by Illumina sequencing. *Plant Cell Reports*. 31, 1823-1828.
- Takagi, H. (1990). Garlic *Allium sativum* L. En: Onions and allied crops. Boca Raton, Florida, CRC Press. Vol. 3, pp. 109-157.
- Takagi, H. e Y. Qu. (1995). Effects of light quality, photoperiod and cold treatment on In vitro bulbing of garlic shoot tip. *Acta Horticulturae* 393, 181-188.
- Thorsteinsson, B., Harrison, P. A. e N. J. Chatterton. (2002). Fructan and total carbohydrate accumulation in leaves of two cultivars of timothy (*Phleum pratense* Vega and Climax) as affected by temperature. *Journal of Plant Physiology*. 159 (9), 999-1003.
- Tognetti, J. A., Salerno, G. L., Crespi, M. D. y H. G. Pontis. (1990). Sucrose and fructan metabolism of different wheat cultivars at chilling temperatures. *Physiologia Plantarum*. 78, 554-559.
- Tsukamoto, S., Okamoto, K., Inanaga, J. e Y. Karasaki (2008). Purification, characterization and biological activities of a garlic oligosaccharide. *J. UOEH*. 30 (2), 147-157.
- Tuan, P. A., Park, N. I., Li, X., Xu, H., Kim, H. H. y S. U. Park. (2010). Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in the phenylpropanoid biosynthesis pathway in garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (20): 10911-10917.
- Turck, F., Zibermann, F., Kozma, S. C., Thomas, G. y F. Nagy. (2004). Phytohormones participate in a S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 134 (4), 1527-1535.

- Uehara, N., Sasaki, H., Aoki, N. y R. Ohsugi. (2009). Effects of the Temperature lowered in the daytime and night-time on sugar accumulation in sugarcane. *Plant Prod. Sci.* 12(4), 420-427.
- Ulloa, J. A., Espinosa Andrews, H., Cruz Rodríguez, G. K., Rosas Ulloa, P., Ulloa Rangel, B. E. y J. C. Ramírez Ramírez. (2010). Los fructanos y su papel en la promoción de la salud. *Revista Fuente.* 2 (5), 57-62.
- UniProt consortium. (2015). <http://www.uniprot.org/>
- Utrilla-Vázquez, M. (2008). Efecto del almacenamiento de la “semilla” y del metil jasmonato en el desarrollo y calidad de bulbos de ajo (*Allium sativum* L.). Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 140 p.
- Valluru, R. y W. Van den Ende. (2008). Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany.* 59 (11), 2905-2916.
- Van Damme, E. J. M., Willems, P., Torrekens, S., Van Leuven, F. y W. J. Peumans. (1993). Garlic (*Allium sativum*) chitinases: characterization and molecular cloning. *Physiologia Plantarum* 87(2): 177-186.
- Vázquez-Mandujano, D. G. (2009). Actividad de la sacarosa-sacarosa-1-fructosil transferasa y su relación con la acumulación de fructanos durante el desarrollo del ajo. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 108 p.
- Velculescu, E. V., Zhang L., Volgestein, B., Kinzler W. K. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science*, 270 (5235), 484-487.
- Vereyken, I. J., Chupin, V., Demel, R. A., Smeekens, S. C. M. y B. D. Kruijff (2001). Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (ABA) – Biomembranes.* 1510 (1 y 2), 307-320.



- Verspreet, J., Dornez, E., Van den Ende, W., Delcour, J. A. y C. M. Courtin. (2015). Cereal grain fructans: structure, variability and potential health effects. *Trends in Food Science & Technology*. 43 (1), 32-42.
- Vijn, I. y Smeekens, S. (1999). Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology*. 120, 351-359.
- Warade, S. D. y K. G. Shinde (1998). Garlic. En: Salunkhe, D. K. y S. S. Kadam, eds. *Handbook of vegetable science and technology. Production, composition, storage and processing*. Food Science and Technology. 86, 397-413.
- Wilhelm, B. T. y J-R. Landry. (2009). RNA-seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods*. 48, 249-257.
- Yadav, S. K. (2010). Cold stress mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 30, 515-527.
- Yun, H-M., Ban, J. O., Park, K-R., Lee, C. K., Jeong, H-S., Han, S-B. y J. T. Hong. (2014). Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic. *Pharmacology & Therapeutics*. 142, 183-195.
- Zavala-Gutiérrez, K. G. (2011). Estudio de los cambios del perfil transcriptómico en brotes de ajo (*Allium sativum* L.) cv. 'Coreano' procedentes de "semillas" almacenadas a diferentes temperaturas. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 89 p.

## X. ANEXOS

### Anexo A. Extracción de ARN (RNeasy Plant Mini Kit de Quiagen, 2006)

I. A la muestra molida y pesada se le adicionaron 450  $\mu$ L de regulador RLT (previamente adicionado con  $\beta$ -mercaptoetanol). Se le dio un vórtex.

II. El lisado fue transferido inmediatamente a una columna lila (QIA shredder spin) en un tubo colector de 2 mL. Se centrifugó a 12,000 rpm o máxima velocidad por 2 minutos.

III. Se transfirió con cuidado el filtrado a un tubo eppendorf nuevo, cuidando de no perturbar el pellet al fondo del tubo.

IV. Según el volumen obtenido en el paso anterior, se adicionaron 0.5 volúmenes de etanol (100 %). Se mezcló suavemente por pipeteo (5-6 veces).

V. Se pasó la muestra y cualquier precipitado formado ( $\sim$  600  $\mu$ L) a una columna rosa (RNeasy spin) colocada en un tubo colector (2 mL). se llevó a cabo una centrifugación a 10,000 rpm por 15 segundos. El filtrado fue descartado.

VI. Se añadieron 350  $\mu$ L de regulador RW1 a la columna (de preferencia en el centro de la matriz) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos. Se Desechó el filtrado.

VII. A una alícuota de ADNasa libre de ARNasas (10  $\mu$ L) se le añadieron 70  $\mu$ L de regulador RDD. Se realizó un mezclado suave y un short (la enzima es sensible al daño mecánico).

VIII. Estos 80  $\mu$ L se añadieron a la columna rosa (sobre la matriz) y se incubó a temperatura ambiente por 15-30 minutos.

IX. Pasado el tiempo, se añadieron 350  $\mu$ L de regulador RW1 a la columna. Se centrifugó a 10,000 rpm por 15 segundos y se descartó el filtrado.

X. La columna rosa fue transferida a un tubo colector nuevo y limpio (2 mL) y se le adicionaron 500  $\mu$ L de regulador RPE (asegurarse de que el buffer haya sido diluido con etanol antes de ser utilizado). Se llevó a cabo una centrifugación a 10,000 rpm durante 15 segundos y se desechó el filtrado.

XI. Una última centrifugación a la columna con el tubo colector vacío a 12,000 rpm por 2 minutos eliminará cualquier residuo del regulador RPE.

XII. Se transfirió la columna a un tubo colector con tapa (1.5 mL) y se adicionaron directamente sobre la membrana de la columna 30  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Esto fue incubado por 5 minutos y centrifugado a 12,000 rpm durante 1 minuto.

Al término se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.2 %, a un voltaje de 70 volts por no más de 20 minutos.

Anexo B. Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (PCR-select™ cDNA subtraction kit, Clontech, 2007)

Cadena sencilla

- I. Se mezcló lo siguiente

<b>Reactivo</b>	<b>(<math>\mu</math>L)</b>
ARN total (~ 2 ng)	3
Oligo de síntesis de ADNc (10 $\mu$ M)	1
Agua estéril	0
Volumen total	<u>4</u>

- II. Se combinaron suavemente por pipeteo (5-6 veces) y se les dio un short.

- III. La mezcla se incubó a 70 °C durante 2 minutos en un termociclador.

- IV. Al término, se dejó enfriar en hielo por dos minutos.

- V. A continuación se añadieron a cada mezcla de reacción, los siguientes reactivos.

<b>Reactivo</b>	<b>Por reacción (<math>\mu</math>L)</b>
Regulador 5X de 1ª cadena	2
Oligo de síntesis de ADNc (10 $\mu$ M)	1
Agua estéril	1
DTT	1
Transcriptasa reversa SMART	1
Volumen total	<u>6</u>
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<u>10</u>

- VI. Se les aplicó un vórtex suave y un short.

- VII. Se incubaron las reacciones a 42 °C por 1.5 horas en el termociclador.

## Síntesis de la doble cadena

VIII. Sin sacar las muestras del termociclador mas que para mezclar por pipeteo y centrifugar, se añadieron los siguientes componentes a cada reacción de primera cadena,

<b>Reactivo</b>	<b>Por reacción (<math>\mu</math>L)</b>
Agua estéril	48.4
Regulador 5X de 2 <sup>a</sup> cadena	16.0
Mezcla de dNTP (10 mM)	1.6
Coctel enzimático 20X para 2 <sup>a</sup> cadena	4.0
Volumen total	<hr/> 70.0
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<hr/> <b>80.0</b>

IX. Se combinaron mediante por pipeteo y un short.

X. Estas muestras fueron incubadas a 16 °C por espacio de 2 horas en el termociclador.

XI. Pausando el termociclador (se tienen 10 minutos para continuar con las condiciones programadas) y de forma rápida pero con cuidado, se añadieron a cada tubo de reacción 2  $\mu$ L (6 u, 3 u/ $\mu$ L) de T4 ADN polimerasa. Se mezcló bien por pipeteo y un short.

XII. La mezcla se incubó a 16 °C durante 30 minutos.

XIII. Al término de este tiempo, se añadir 4  $\mu$ L de EDTA  $\mu$ L/Glu 20 X para finalizar la reacción.

XIV. A continuación se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 % para observar el producto de síntesis de ADNc (~80 V / 20 minutos).

Purificación producto de síntesis (ADNc de doble cadena). PureLink PCR (Invitrogen)

I. Se añadieron 4 volúmenes de regulador de unión con isopropanol agregado a cada muestra. Se mezclaron con la punta de una pipeta.

II. Se transfirió esta mezcla a una columna PureLink® en un tubo colector de 2 mL.

III. Se llevó a cabo una centrifugación a 10,000 rpm durante 1 minuto, y se descartó el filtrado.

IV. La columna fue lavada con 650 µL de regulador de lavado (WB).

V. Se centrifugó la columna a 10,000 rpm por 1 minuto y el filtrado fue desechado.

VI. Inmediatamente se centrifugó la columna con el tubo recolector vacío a máxima velocidad (13,300 rpm) durante 3 minutos, de esta manera se removieron los residuos del WB.

VII. Se colocó la columna a un tubo nuevo de 1.7 mL para elución:

VIII. Se eluyó el ADNc purificado con 50 µL de regulador de elución (EB), añadiendo el buffer en el centro de la matriz de la columna.

IX. Se incubó la columna a temperatura ambiente por 1 minuto. Y se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos.

#### Digestión del ADNc

I. Este paso se realizó con el fin de generar fragmentos de ADNc más cortos y con extremos rasurados los cuales serán necesarios para las etapas posteriores dentro del análisis SSH.

II. En un tubo PCR estéril se combinó (mediante vórtex y short) lo siguiente.

<b>Reactivo</b>	<b>μL</b>
ADNc purificado	43.5
Regulador 10 X de la enzima de restricción	5
Enzima de restricción Rsa I	1.5
Volumen total	<u>50</u>

III. La mezcla se incubó a 37 °C durante 90 minutos.

IV. Al término del tiempo de incubación se agregaron 2.5 μL de EDTA/Glucógeno para terminar la reacción.

V. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 % para verificar la eficiencia de la enzima, junto a estas muestras se analizaron los ADNc que no fueron digeridos (2.5 μL de los 6 μL apartados después de la purificación).

#### Purificación del ADN digerido

I. Antes de ligar las muestras a los adaptadores, se purificó el ADNc digerido; para ello se agregaron 50 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló por vórtex y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos a temperatura ambiente, esto para que se separaran las fases.

II. Con extrema precaución se recolectó la capa superior y se colocó en un tubo eppendorf nuevo, limpio y estéril.

III. Se añadieron 50 μL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

IV. Se repitieron los dos últimos pasos.

V. A la mezcla se le añadieron 25 μL de NH<sub>4</sub>OAc y 187.5 μL de etanol 95 %.

VI. Se realizó de nuevo el paso II,

VII. Y con mucho cuidado se desechó el sobrenadante.

VIII. A continuación se recubrió suavemente el pellet con 200 μL de etanol 80 %

IX. Se llevó a centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante.

X. El pellet se dejó secar al aire libre por 15-20 minutos.

XI. Cuando todo el etanol se evaporó, el pellet fue disuelto en 10  $\mu\text{L}$  de agua estéril.

#### Ligación a los adaptadores

I. Cada ADNc del tester se dividió en 2 alícuotas separadas, una de ellas fue ligada al adaptador 1 y la segunda al adaptador 2R. Para ello, se diluyó 1  $\mu\text{L}$  de ADNc digerido y purificado con 5  $\mu\text{L}$  de agua estéril.

II. A continuación se preparó la mezcla de ligación, combinando los siguientes reactivos:

<b>Reactivo</b>	<b>Por reacción (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Agua estéril	3
Regulador 5X de ligación	2
T4 ADN ligasa	1
Volumen total	<hr/> 6

III. Para cada tester experimental se mezclaron los siguientes componentes en tubos de PCR (cuidar de seguir el orden mostrado):

<b>Componente</b>	<b>Tubo # 1 c/adaptador 1</b>	<b>Tubo # 2 c/adaptador 2R</b>
ADNc	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
Adaptador 1	2 $\mu\text{L}$	-
Adaptador 2R	-	2 $\mu\text{L}$
Mezcla de ligación	6 $\mu\text{L}$	6 $\mu\text{L}$
Volumen final	<hr/> 10 $\mu\text{L}$	<hr/> 10 $\mu\text{L}$

IV. De estas mezclas de reacción se tomó una pequeña porción de cada una y se combinaron obteniéndose ADNc ligado a los dos adaptadores, a lo que



se le llamó *control no sustraído*, este servirá de comparación al final del análisis de la hibridación sustractiva en condiciones de supresión.

V. La mezcla se incubó a 16 °C por toda la noche, en total 15 horas con 10 minutos.

VI. Al término de la incubación, se añadió 1 µL de EDTA/Glucógeno 20X para terminar la ligación.

VII. Las muestras se calentaron a 72 °C durante 5 minutos para inactivar la enzima, y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.

#### Primera y segunda hibridación

I. Para cada sustracción fueron incorporados los siguientes reactivos en tubos de PCR en el orden mostrado:

<b>Componente</b>	<b>Tubo #</b>	<b>Tubo #</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>
ADNc driver	1.5	1.5
Tester ligado al adaptador 1	1.5	-
Tester ligado al adaptador 2R	-	1.5
Regulador de hibridación 4X	1.0	1.0
Volumen final	4.0	4.0

Se mezclaron por pipeteo y short.

II. Los tubos se pusieron en un termociclador y se incubaron a 98 °C por 1 minuto y medio en un termociclador y después a 68 °C durante de 8 horas.

III. En la segunda hibridación, nuevas moléculas son formadas, las cuales consisten en ADNc expresados diferencialmente con diferentes adaptadores ligados a cada extremo terminal. Para ello, es muy importante no desnaturalizar las muestras de la primera hibridación y preparar de antemano las que sí se desnaturalizan.

IV. Para desnaturalizar el driver, se mezclaron los siguientes reactivos en un tubo de PCR nuevo y estéril.

Tubo 1  
1  $\mu$ L driver  
1  $\mu$ L Regulador de  
hibridación 4X  
2  $\mu$ L de agua estéril  
Volumen total: 4  $\mu$ L

V. Un poco antes de que culminen las 8 horas de la primera hibridación se incubó el tubo del paso anterior a 98 °C durante 1.5 minutos en un termociclador.

VI. Cuando se cumplieron las ocho horas de la hibridación, se removió el driver desnaturalizado del termociclador y,

VII. Se mezcló simultáneamente el driver con las muestras hibridadas 1 y 2, lo cual asegura que ambas muestras sean mezcladas sólo en presencia del driver recién desnaturalizado.

VIII. Esta mezcla se incubó a 68 °C por toda la noche (~15 horas).

IX. Al término de este periodo, se añadieron 20  $\mu$ L de regulador de dilución y se calentó a 68 °C durante 7 minutos. Con este último paso, la hibridación sustractiva se ha llevado a cabo. El producto puede guardarse a -20 °C hasta su uso, o realizar la amplificación inmediatamente.

#### Amplificación exponencial mediante PCR

I. Para preparar los templados para la primer PCR, se tomó una alícuota de 1  $\mu$ L de cada ADNc hibridado y diluido (paso IX de la segunda hibridación).

II. Antes de hacer la PCR, se preparó la mezcla de reacción, combinando los siguientes reactivos en el orden correspondiente:

<b>Reactivo</b>	<b>μL por reacción</b>
Agua estéril	19.05
Regulador de reacción 10 X para Taq pol.	2.5
Mezcla de dNTP (10 mM)	0.5
Oligo PCR 1	1.0
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0.75
Templado	1.0
Taq polimerasa	0.2
Volumen final	25.0

III. Estas sustancias se mezclaron por pipeteo y short.

IV. Se incubaron a 75 °C por 5 minutos en el termociclador para que los adaptadores se extiendan y,

V. De inmediato se comenzó con los ciclos de PCR bajo las condiciones estipuladas en el manual.

VI. Al término de este, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 2 %, utilizando un volumen de carga de 8 μL.

VII. Inmediatamente y si hay presencia de bandas amplificadas, se procede con el segundo PCR, para lo cual se diluyeron 3 μL de cada producto del primer PCR en 27 μL de agua estéril.

VIII. Para preparar la mezcla de reacción se agregaron los siguientes reactivos en el orden mostrado.

<b>Reactivo</b>	<b>µL por reacción</b>
Agua estéril	18.05
Regulador de reacción 10 X para Taq pol.	2.5
Oligo anidado 1	1.0
Oligo anidado 2R	1.0
Mezcla de dNTP (10 mM)	0.5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0.75
Templado (producto 1er PCR diluido)	1.0
Taq polimerasa	0.2
Volumen final	<hr/> 25.0

IX. Los componentes se mezclaron por pipeteo y short.

X. Y se comenzó el termociclador como se indica en el manual del kit.

XI. Al término, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 2 % durante 30 minutos a 80 volts.

XII. Los productos se almacenaron a -20 °C hasta su posterior utilización (ligación y clonación de células competentes).

Anexo C. Purificación productos de PCR (Wizard PCR preps DNA purification System, Promega)

I. Se transfirieron de 30-300  $\mu$ L del producto de PCR a un tubo eppendorf.

II. Sobre la muestra se colocaron 100  $\mu$ L del regulador de purificación directa y se mezcló por vórtex.

III. Después se le adicionó 1 mL de resina y se mezcló por vórtex 3 veces en un periodo de 60 segundos (3 pulsos x 20”).

IV. Se preparó una columna Wizard® por cada producto de PCR o muestra a purificar. Se retiró el émbolo de una jeringa de 3 mL. La jeringa se unió a la extensión Luer-Lok® de la columna.

V. Se pipeteó la mezcla de resina + ADNc al interior de la jeringa. Se insertó el émbolo lentamente y se presionó para hacer pasar la mezcla a través de la columna.

VI. Se quitó la columna de la jeringa, se removi6 el émbolo y se volvió a colocar la columna. Se pipetearon 2 mL de isopropanol 80 % en la jeringa y se hicieron pasar a través de la columna (lavados).

VII. Se retiró la jeringa y se columna se transfirió a un tubo eppendorf. Se centrifugó la columna a 11,000 rpm durante 2 minutos para secar la resina.

VIII. Se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga nuevo, limpio y estéril. Se adicionaron 20  $\mu$ L de agua, se incubó a temperatura ambiente por espacio de 60 segundos y se centrifugó a 11,000 rpm durante 1 minuto. Se retiró y desechó la columna. El ADN purificado se almacenó en el tubo a -20 °C.

#### Anexo D. Ligación al vector pGem TEasy (Promega)

Debido a que los cambios bruscos de temperatura afectan el rendimiento del regulador de ligación rápida 2X, este se dejó descongelar por sí solo.

I. Combinar los siguientes reactivos en el orden mostrado:

Regulador de ligación rápida 2X	5 $\mu$ L
Vector pGEM T Easy	1 $\mu$ L
Producto de PCR (ADN purificado, 5C)	1 $\mu$ L
T4 ADN ligasa	1 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	2 $\mu$ L
Volumen total	<u>10 <math>\mu</math>L</u>

II. Se incubó la mezcla a 4 °C durante aproximadamente 20 h.

III. Al término del tiempo de ligación, se almacenó a -20 °C hasta la, transformación de células competentes.

Anexo E. Transformación de células competentes (One Shot<sup>®</sup> MAX Efficiency DH10B-T1<sup>®</sup>, Invitrogen)

I. Se dejó descongelar (5 minutos) en hielo un vial con 50  $\mu$ L de células One Shot<sup>®</sup> por transformación, por lo que se descongelaron 2 viales, uno para el banco sustractivo de fragmentos de genes sobre-expresados (5C) y otro para el banco sustractivo de los reprimidos.

II. Se pipetearon 3  $\mu$ L de cada ligación directamente en las células competentes y se mezcló suavemente, sin vórtex ni pipeteo. Lo que sobró de la reacción de ligación se almacenó a -20 °C.

III. Se incubó el vial en hielo por espacio de 30 minutos.

IV. Después, por 30 segundos exactos, se incubó en un baño de 42 °, sin mezclar ni agitar.

V. Inmediatamente después se puso en hielo.

VI. Y se añadieron 250  $\mu$ L de medio S.O.C. (en campana).

VII. Para permitir que las células se recuperen, se incubó con agitación a 37 °C y 225 rpm durante 60 minutos.

VIII. Al término de este tiempo, se esparcieron de 20-200  $\mu$ L de cada transformación en cajas Petri con medio LB + Ampicilina 100 + X-gal + IPTG previamente atemperadas a 37 °C.

IX. Incubar a 37 °C durante toda la noche.

## Anexo F. Transformación de células electrocompetentes (TOP 10

### Electrocompetent Cells, Invitrogen)

I. Antes de transformar las células competentes se atemperaron a 37 °C durante 30-40 minutos cajas Petri con agar LB + Ampicilina 100 + X-gal + IPTG.

II. Se adicionaron 2 µL de la ligación vector-producto de SSH a un vial de células electrocompetentes (50 µL).

III. La transformación se realizó conforme lo descrito en el manual del electroporador (*Eppendorf Eporator*<sup>®</sup>):

- i) Se retiró la celda de su empaque y se dejó enfriar por 15-20 min a -20 °C, después mantener en hielo antes de su utilización.
- ii) Se llenó la celda con la mezcla (células competentes – ligación vector-producto, de tal manera que no hubiera burbujas en el espacio entre los electrodos.
- iii) Se puso la celda en su montura, y esta se introdujo en el Eporator<sup>®</sup>.
- iv) Se aplicó el voltaje requerido para *E. coli* (1700 V). Y se removió la montura del electroporador.

IV. Se añadió, lo más rápidamente posible, 250 µL de medio S.O.C, mezclando suavemente (sin pipeteo ni vórtex).

V. Esta solución fue transferida de la celda a un tubo de microcentrífuga tratando de retirar toda la muestra de la celda de electroporación.

VI. Se agitaron las células transformadas por al menos 60 minutos a 37 °C a 150 rpm.

VII. Terminado el tiempo, se sembraron 50, 100 y 150 µL de cada transformación y se dejaron incubando durante aproximadamente 16 horas a 37 °C.



Anexo G. Extracción ADN plasmídico (miniprep, Sambrook [Green y Sambrook, 2012])

Después de haber crecido cada clona individualmente, se procedió a recolectar las células, utilizando no más 5 mL de medio y centrifugando a 13,000 rpm durante 5 minutos. Cuando se obtiene la pastilla (células cosechadas):

- I. Se resuspendió la pastilla en 100  $\mu$ L de solución 1 mediante vórtex.
- II. Cuando la pastilla estuvo bien disuelta, se agregaron 200  $\mu$ L de solución 2 (lisis), mezclando por inversión de 4-6 veces. Se dejó incubar la mezcla por no más de 5 minutos.
- III. Se agregaron 150  $\mu$ L de la solución 3 (neutralizadora). Se mezcló por inversión y se incubó en hielo por un espacio entre 3 y 5 minutos.
- IV. Al término del tiempo, se realizó una centrifugación a máxima velocidad durante 15 minutos.
- V. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, estéril y debidamente etiquetado.
- VI. Se le agregaron 2 volúmenes de isopropanol y la mezcla se dejó reposar a -20 °C durante 30 minutos para aumentar el rendimiento.
- VII. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a máxima velocidad por 15 minutos, y se desechó el sobrenadante.
- VIII. Se realizó un lavado con etanol (1 mL), mezclando por inversión y una centrifugación a máxima velocidad por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla hasta que el etanol se evapore.
- IX. Después de 40-50 minutos, la pastilla se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua de ampolleta con ARNasa. Se mezcló vigorosamente. Y se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.2 %.

## Anexo H. Digestión con enzima de restricción Eco R1 (Promega)

Para comprobar la presencia del inserto en la ligación vector-producto SSH, el ADN plasmídico fue tratado con la enzima de restricción Eco RI así:

I. En un tubo de PCR nuevo y estéril se combinó lo siguiente:

<b>Reactivo</b>	<b>µL por reacción</b>
Agua de ampolleta estéril	16.3
Regulador de la enzima de restricción (H)	2
BSA acetilado, 10 µg/ µL	0.2
ADN plasmídico	1
Enzima de restricción	0.5
Volumen final	<hr/> 20

II. La mezcla se incubó a 37 °C durante 3 horas.

III. Al término del tiempo de incubación se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.2 %.

Anexo I. Extracción de ADN plasmídico (PureYield™ plasmid miniprep system, Promega)

Las clonas que presentaron inserto se volvieron a incubar de forma individual durante 16 horas con el objetivo de extraer el ADN plasmídico mediante columna:

I. Mediante centrifugaciones a 13,000 rpm durante 5 minutos, se recolectaron las células de 5 mL de medio.

II. La pastilla se resuspendió en 600  $\mu$ L de agua estéril.

III. A esta mezcla, se le añadieron 100  $\mu$ L de regulador de lisis mezclando por inversión. La solución cambió de azul opaco a azul claro (esto indica que la lisis está completada).

IV. No dejando pasar más de 3 minutos se agregaron 350  $\mu$ L de la solución de neutralización (fría), mezclando por inversión hasta que toda la mezcla quede amarilla.

V. Se llevó a centrifugar a 13,000 rpm durante 3 minutos. Al término, se transfirió el sobrenadante a una mini-columna PureYield™ sobre un tubo colector.

VI. Se volvió a realizar una centrifugación a 13,000 rpm por 30 segundos, de esta forma, el ADN plasmídico se liga a la membrana de sílice.

VII. Se desechó el sobrenadante y la columna se volvió a poner en el tubo colector.

VIII. A continuación se añadieron 200  $\mu$ L del lavado de remoción de endotoxinas sobre la membrana de la columna, centrifugando a 13,000 rpm por 30 segundos.

IX. Sin vaciar el tubo colector, se agregaron 400  $\mu$ L de la solución de lavado e inmediatamente se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos.

X. Se desechó el tubo colector y la columna se transfirió a un tubo eppendorf nuevo, limpio y etiquetado.

XI. Con sumo cuidado, sobre la matriz de la columna se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de regulador de elución y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto.

XII. Pasado este tiempo, se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 segundos para eluir el ADN plasmídico.

XIII. El producto obtenido se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que se llevó a cabo la secuenciación.

Anexo J. Síntesis de ADNc primera cadena (First Strand cDNA synthesis kit, ThermoScientific)

La síntesis de la primera cadena del ADN complementario se realizó partiendo de la misma cantidad de ARN para todas las muestras y se siguieron las indicaciones así descritas:

I. Después de haber dejado descongelar las muestras de ARN y los reactivos, se combinan estos siguiendo el orden que se muestra a continuación.

<b>Reactivo</b>	
Templado ARN	~ 265 ng/ $\mu$ L
Oligo (dT)18	0.5 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	Hasta 4 $\mu$ L
Volumen total	<hr/> 5.5 $\mu$ L

II. Se mezclaron por pipeteo y short. En un termociclador se incubaron a 65 °C por 5 minutos.

III. Inmediatamente después se agregaron los siguientes reactivos en el orden en que indica.

<b>Reactivo</b>	<b><math>\mu</math>L</b>
Regulador de reacción 5X	2
Inhibidor de RNAsas RiboLock	0.5
Mezcla de dNTP's (10 mM)	1
Transcriptasa reversa M-MuLV	1
Volumen total	<hr/> 4.5
Volumen final	<hr/> 10

IV. Todo se mezcló suavemente y se dio un short. Después se incubó a 37 °C durante 60 minutos.

V. Para terminar la reacción se calentaron las muestras a 70 °C por 5 minutos.

## Anexo K. Análisis RT-qPCR

Después de comprobar la integridad y la cuantificar el ARN se procedió a sintetizar el ADNc realizando los siguientes pasos:

- I. En tubos de PCR agregar los siguientes reactivos:

<b>Reactivo</b>	<b>μL</b>
ARN	2 μg
Oligo dT (0.5 μg/μL, ThermoScientific)	1
dNTPs (10 mM)	1
Agua DEPC	↑ 20

- II. Mezclar por pipeteo e incubar a 65 °C durante 10 minutos en un termociclador.

- III. Terminado el tiempo de incubación agregar a cada tubo:

<b>Reactivo</b>	<b>μL</b>
Regulador 5X de primera cadena (ThermoScientific)	4
DTT 0.1 M	2

- IV. Mezclar bien e incubar en termociclador por 2 minutos a una temperatura de 42 °C.

- V. Adicionar inmediatamente 0.5 μL de la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (ThermoScientific), mezclar por pipeteo e incubar a 42 °C por 50 minutos. Después aumentar la temperatura a 70 °C durante 15 minutos para inactivar la enzima.

- VI. Cuantificar el ADNc.

Anexo L. Determinación de las mezclas de reacción para 1-SST, SORBIDRAFT, PAL y el de referencia 18S

I. Para realizar esta verificación se llevaron a cabo 4 matrices (una por gen), con 9 diferentes combinaciones de concentración de oligonucleótidos (Cuadro M.1).

II. Cada combinación se realizó por triplicado, por lo tanto se realizaron 27 reacciones por matriz, con las cuales se llenaron placas MicroAmp® Fast-Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0.1 mL) (Life Technologies).

III. Después de llenar las placas (Figura M.1), 2 en total, cada una se selló con MicroAmp Optical Adhesive Film PCR Compatible DNA/RNA RNase Free (Applied Biosystems).

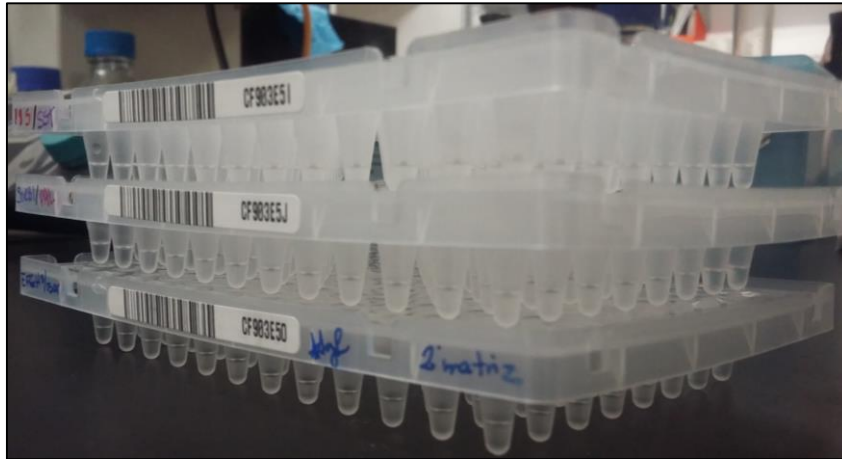
IV. Cada placa se llevó por separado al LAMBAMA para su análisis mediante el equipo de PCR tiempo real 7500 FAST de Applied Biosystems (previamente se llenó y envió la solicitud del servicio); cada corrida se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando los programas determinados por el equipo.

V. Después de aproximadamente 2 horas, se obtuvieron los resultados para cada placa, estos fueron analizados con el programa del equipo, 7500 software v 2.0 (Applied Biosystems, 2007) y, según estos, se decidió usar la mezcla de reacción con un mejor desempeño para cada par de oligonucleóticos.

**Cuadro L.1** Matriz de mezclas de reacción

<b>COMPONENTE</b>	<b>μL</b>	<b>μL</b>	<b>μL</b>
	MIX 1	MIX 2	MIX 3
	150/150 μm	300/150 μm	900/150 μm
SYBER mix (ThermoScientific)	10	10	10
Oligo sentido (–Fwd)	0.3	0.6	1.8
Oligo antisentido (–Rev)	0.3	0.3	0.3
cDNA (200 ng)	4	4	4
H <sub>2</sub> O	↑ 20	↑ 20	↑ 20
<b>COMPONENTE</b>	MIX 4	MIX 5	MIX 6
	150/300 μm	300/300 μm	900/300 μm
SYBER mix (ThermoScientific)	10	10	10
Oligo sentido (–Fwd)	0.3	0.6	1.8
Oligo antisentido (–Rev)	0.6	0.6	0.6
cDNA (200 ng)	4	4	4
H <sub>2</sub> O	↑ 20	↑ 20	↑ 20
<b>COMPONENTE</b>	MIX 7	MIX 8	MIX 9
	150/900 μm	300/900 μm	900/900 μm
SYBER mix (ThermoScientific)	10	10	10
Oligo sentido (–Fwd)	0.3	0.6	1.8
Oligo antisentido (–Rev)	1.8	1.8	1.8
cDNA (200 ng)	4	4	4
H <sub>2</sub> O	↑ 20	↑ 20	↑ 20





**Figura L.1** Placas para RT-qPCR

Anexo M. Extracción de ARN para análisis RNA-seq (TRIZOL<sup>®</sup>, [Life Technologies] + SV total RNA isolation system, [Promega])

I. Brote de la quinta semana de almacenamiento para cada condición de temperatura fue molido en nitrógeno líquido utilizando un mortero limpio, estéril y congelado.

II. El polvo se colocó en un tubo eppendorf debidamente etiquetado (cantidad ~100 mg).

III. Mantener en congelación la muestra hasta la adición del Trizol<sup>®</sup> (1 mL de Trizol/100 mg muestra).

IV. Homogeneizar mediante vórtex e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

V. Agregar 200  $\mu$ L de cloroformo y agitar vigorosamente por ~15 segundos. Incubar a temperatura ambiente durante 2-3 minutos.

VI. Centrifugar a 13 000 rpm por 15 minutos a una temperatura de refrigeración.

VII. Transferir la fase incolora a un tubo eppendorf limpio, estéril y libre de ARNasas.

VIII. Adicionar un volumen igual de etanol 95 %. Mezclar por pipeteo y transferir la mezcla y cualquier precipitado a una columna spin column assembly.

IX. Centrifugar a 13 000 rpm por 1 minuto. Desechar el filtrado.

X. Agregar 600  $\mu$ L de la solución de lavado. Centrifugar a 13 000 rpm por 1 minuto. Descartar el filtrado.

XI. Preparar la mezcla de incubación con ADNasa, añadir cada reactivo que se enlista a continuación en el orden mostrado a un tubo eppendorf, agitar suavemente.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad μL</b>
Yellow Core Buffer	40
MnCl <sub>2</sub> 0.09 M	5
DNase I	5

XII. Aplicar esta mezcla directamente sobre la membrana de la spin basket. Incubar por espacio de 10 minutos a temperatura ambiente.

XIII. Agregar 200 μL de la solución DNase-stop a la columna y centrifugar a  $10 \times 10^3$  rpm durante 1 minuto.

XIV. Adicionar 600 μL de la solución de lavado. Centrifugar a 13 000 rpm por 1 minuto. Vaciar el tubo colector y adicionar a la columna 200 μL de solución de lavado. Centrifugar a 13 000 rpm durante dos minutos.

XV. Descartar el filtrado y volver a centrifugar a las mismas condiciones con la columna vacía para evitar residuos de alcohol.

XVI. Transferir la columna a un tubo eppendorf nuevo y etiquetado para la elución:

XVII. Añadir 100 μL de agua libre de ARNasas. Centrifugar a 13 000 por espacio de un minuto.

XVIII. Cuantificar el ARN obtenido mediante un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, 2009) y comprobar la integridad del producto mediante un gel de agarosa desnaturalizante al 1.2 % (w/v). conservar las muestras a -70 °C.