



INSTITUTO TECNOLÓGICO NACIONAL DE TUXTLA  
GUTIÉRREZ.

RESIDENCIAS PROFESIONALES

INFORME TÉCNICO

“ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES INVOLUCRADOS  
EN LA SÍNTESIS DE FRUCTANOS EN CONDICIONES DE  
INDUCTORES DE ESTRÉS BIÓTICO”

INSTITUCIÓN: INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TLAJOMULCO,  
JALISCO.

ASESOR EXTERNO: DR. JUAN FLORENCIO GOMEZ LEYVA

ASESOR INTERNO: DR. VÍCTOR MANUEL RUIZ VALDIVIEZO

PRESENTA: NAVARRO SANTIZ YASMIN YUSELI

CARRERA: INGENIERIA BIOQUIMICA

TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS. FECHA.

## ÍNDICE GENERAL

Índice general	I
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	VI
Índice de graficas	
Abreviaturas	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. OBJETIVO GENERAL	3
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
5. PROBLEMAS A RESOLVER	6
6. ALCANCE Y LIMITACIONES.	7
7. FUNDAMENTO TEÓRICO.	8
8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS.....	16
9. RESULTADOS, PLANOS, GRÁFICAS, PROTOTIPOS, MAQUETAS, PROGRAMAS, ENTRE OTROS.....	36
10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
11. COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS.....	44
12. ANEXOS.....	45
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES.....	46

## INDICE DE FIGURAS

Fotografías representativas de algunas especies del género <i>Agave</i> . .....	1
Floración de <i>Agave tequilana</i> .....	2
Denominación de Origen del Tequila .....	3
Estructura propuesta para las <i>Agavinas</i> .....	4
Diferentes vías biosintéticas de fructanos en plantas superiores .....	5
Reacción de las proteínas con el reactivo <i>coomassie</i> G-250. ....	6
Agave en medio MS líquido.....	7
Plantas de agave adaptadas en invernadero .....	8
Plantas de agave en área con condiciones controladas para la aplicación de (BTH).....	9
Cortes del agave a analizar.....	10
Proceso para elaborar la curva de calibración de azúcares reductores por espectrofotometría.....	11
Proceso para elaborar la curva de calibración de azúcares reductores por espectrofotometría.....	12
Adaptación de raíz del agave.....	13
Resultados obtenidos del perfil de carbohidratos por HPTLC.....	14
Resultados de la integridad de la extracción de <i>Agave tequilana</i> control.....	15
Resultados de la integridad de la extracción de ARN total del tratamiento AS y BTH.....	16
Resultados de tratamiento de ADNAsas en el ARN total de <i>Agave tequilana</i> de los tratamientos AS Y BTH.....	17
Resultados de PCR punto final con primers para amplificar fructosil transferasa y 18s rRNA genes en <i>Agave tequilana</i> control.....	18
Resultados de PCR punto final con primers para amplificar fructosil transferasa y 18s rRNA genes en <i>Agave tequilana</i> con AS.....	19
Resultados de PCR punto final con primers para amplificar fructosil transferasa y 18s rRNA genes en <i>Agave tequilana</i> con BTH.....	20

## INDICE DE TABLAS

Clasificación de subgéneros y grupos de Agave.....	1
Componentes de la solución para preparación de la solución nutritiva.....	2
Componentes de la solución de fase móvil para mono y disacáridos.....	3
Componentes de la solución de fase móvil para oligosacáridos.....	4
Componentes de la solución reveladora.....	5
Concentraciones de la curva de calibración de 0-40 mM.....	6
Concentraciones de la curva de calibración de 0- 1 mg/mL.....	7
Cantidades necesaria para realizar el tratamiento por mg de RNA total.....	8
Cantidad que se necesita para la síntesis de la primera hebra.....	9
Componentes para obtener el productos de transcripcion inversa.....	10
<i>Primers</i> utilizados para la PCR punto final para la amplificación de <i>fructosil transferasa</i> y 18S rRNA genes en <i>Agave tequilana</i> .....	11
Cantidad de cada solución para cada reacción de amplificación de PCR punto final.....	12
Condiciones para la amplificación en PCR punto final.....	13
Resultados de concentración de fructosa en las plantas de agave en diferente estrés abiótico.....	14
Resultados de concentración de glucosa en las plantas de agave en diferente estrés abiótico.....	15
resultados de concentración de proteínas en las plantas de agave en diferente estrés abiótico.....	16
Concentraciones de ARN Total del <i>Agave tequilana</i> .....	17
Concentraciones de síntesis de la primera hebra del ADNc de <i>Agave tequilana</i> ...	18

## 1.INTRODUCCIÓN

México es considerado centro de origen y de diversidad de los agaves. No se tiene claro cuántas especies se han documentado actualmente, algunos autores mencionan que se han reconocido entre 166 hasta 273, diferentes especies de agaves (magueyes) en el continente americano, distribuidas una pequeña parte de Estados Unidos, México, América Central y América del Sur. Se considera que el 75% de todas las especies se encuentran en nuestro país y el 55% son distintivos de aquí, lo que muestra la gran importancia biológica del territorio nacional para los agaves (Granados,1993; Illsley et al. 2004; CONABIO, 2005). Varias especies son económicamente importantes. Los agaves se han utilizado durante años para la producción de alimentos y bebidas ricas en fructosa, destilados y fibras (Mancilla-Margalli y López, 2006; García-Mendoza, 2007), entre ellas el *Agave tequilana* Weber Azul, el cual constituye la materia prima para la producción de tequila (Peña et al., 2004). Los fructanos son polímeros de fructosa que se sintetizan en la vacuola como respuesta a una acumulación de sacarosa en este organelo. Las *fructosiltransferasas* (FT), enzimas que participan en su metabolismo, adicionan residuos de *b-D-fructofuranosa* a una unidad de sacarosa utilizada como aceptor inicial. Los cinco tipos estructurales de fructanos descritos hasta ahora, son resultado de las distintas formas en que las diversas enzimas transfieren los residuos de fructosa. La *1-sacarosa:sacarosa-fructosiltransferasa* (*1-SST*), es la enzima inicial que transfiere una unidad de fructosa de una molécula de sacarosa a otra. La *1-kestotriosa* así formada (*G-F-F*), es el metabolito central utilizado por las demás FT en la síntesis de fructanos superiores. La *1-fructan:fructan-fructosil-transferasa* (*1-FFT*) elonga el polímero mediante enlaces  $\beta(2-1)$ , generando el *fructano* conocido como inulina; la *6-SFT* sintetiza *levanos*, esto es, polímeros lineales con enlaces  $\beta(2-6)$  o introduce este tipo de enlace en una molécula de *inulina* existente, produciendo los *graminanos* o fructanos ramificados; por su parte, la *fructan:fructan-6-glucosafructosiltransferasa* (*6G-FFT*) transfiere residuos de fructosa al carbono 6 de la glucosa, generando los denominados *neofructanos* (inulina- o levano-neoserie, dependiendo del enlace), caracterizados por tener una unidad de glucosa entre dos moléculas de fructosa. Finalmente, en el metabolismo de estas biomoléculas, además participan la *fructan exohidrolasa* (*FEH*) y la *invertasa* vacuolar (*Inv-V*). La primera enzima degrada los polímeros hidrolizando la fructosa localizada en un extremo; mientras que el papel de la *Inv-V* es controversial en el análisis metabólico de estos carbohidratos, ya que es capaz de sintetizar o hidrolizar algunos fructanos dependiendo de las condiciones de reacción. Este trabajo tiene como objetivo determinar el perfil de expresión de la *fructosa II transferasa* y enzimas de estrés en plantas de agave bajo condiciones simuladas de estrés abiótico. Ya que algunos autores relacionan la cantidad de fructanos acumulados en las plantas con la resistencia a condiciones hostiles.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

El agave es un ejemplo de las plantas que pertenece al 15 % que almacenan fructanos; sin embargo, a pesar de ser uno de los pocos cultivos cuyos fructanos son utilizados industrialmente, su relevancia bioquímica y fisiológica ha sido escasamente estudiada. Debido a que estas plantas no han podido desarrollarse adecuadamente debido a las condiciones desfavorables, por lo que han desarrollado diferentes mecanismos para responder a estas condiciones estresantes. La protección de fructanos a plantas bajo estrés abiótico, fuertemente apoyada por la resistencia observada en plantas transgénicas, insinúa una importante relación de este carbohidrato en la capacidad de los agaves para crecer en ambientes hostiles.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de expresión de la *fructosa II transferasa* y enzimas de estrés en plantas de agave bajo condiciones simuladas de estrés abiótico.

### 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar plantas de agave en condiciones de invernadero.
- Someter plantas de *Agave tequilana* a estrés abiótico.
- Analizar el perfil de carbohidratos presentes en los diferentes estreses.
- Cuantificación de proteínas de los diferentes tratamientos de tallo y hoja.
- Analizar la actividad enzimática de la peroxidasa.
- Obtener un ARN total de calidad para obtener ARNm aceptables.
- Amplificación de ADNc por medio de PCR punto final.

## **5. PROBLEMAS A RESOLVER**

Los principales problemas a resolver durante el desarrollo de las actividades del proyecto fueron:

Seleccionar los mejores agaves en medio líquido para adaptarlos a invernadero y llevar acabo el desarrollo de la planta.

Monitorear el riego de los agaves y evitar cualquier tipo de contaminación como ejemplo la mosquita blanca.

Someterlos bajo estrés en las mismas condiciones aplicando adecuadamente todo el foliar del agave

Evitar la contaminación de las muestras de agave a analizar de tal manera que esto no afecte los resultados.

Seleccionar un método adecuado que nos permita determinar los carbohidratos presentes en las muestras de agave a analizar

Extraer y determinar las proteínas adecuadamente de los agaves sometidos a diferente estrés abiótico.

Determinar la actividad enzimática (peroxidasa ) de los agaves a diferentes estrés.

Comparar los resultados obtenidos de las diferentes pruebas ´para analizar que tratamientos se obtuvieron mejores resultados.

## **6. ALCANCE Y LIMITACIONES**

### **Alcances**

Adaptar las plantas de agave de medio solido a liquido evitando cualquier contaminación para seleccionar las mejores para la aclimatación.

Adaptar los agaves en invernadero y asperjar de manera equitativa la solución en el foliar de los agaves.

La investigación a realizar se enfoca en la determinación del perfil carbohidrático y de proteínas de las muestras de agave analizadas.

## **Limitaciones**

La investigación se enfoca en someter a estrés las plantas de *Agave tequilana* y con los análisis de determinación de proteínas, carbohidratos y actividad enzimática relacionar y analizar los datos.

El estudio solo se limitó a una sola especie y a dos tipos de estrés abiótico debido al tiempo para realizar la investigación.

El análisis de la actividad enzimática se realizó únicamente para la peroxidasa debido a que no se tiene los reactivos necesarios.

## **7. FUNDAMENTO TEÓRICO**

### **1. Agavaceae**

La familia *Agavaceae* fue creada en 1836 por el botánico australiano Stephen Endlicher incluyendo el género *Agave* y *Furcraea*. El género agave abarca alrededor de 166 hasta 273 especies, en México se encuentra la mayor parte, considerándose, así como su centro de origen y domesticación (Gentry, 1982; García-Mendoza, 1998; García M., 2007; Eguiarte y Souza, 2007).

El crecimiento de los que integran esta familia se localiza desde el nivel del mar hasta 3000 m, siendo mayor su presencia entre 1500 y 2000 m sobre el nivel del mar (García-Mendoza, 2004). La palabra *Agave* cuyo nombre viene del griego "noble" y del latín "admirable", fue descrito inicialmente por Linneo en 1753 (Gentry, 1982).

Esta familia ha sido difícil de clasificar, dada la amplia distribución, presencia de híbridos, tiempo de aparición de floración (8-50 años) (Peña-Álvarez et al., 2004), propiedades de tejido y compuestos químicos (Nobel, 1998). Actualmente, la clasificación dada por Dahlgren, Clifford y Jeo (1985) es la más aceptada. En un análisis de *monocotiledoneas* basado en el número cromosomal, análisis anatómico, químico, biogeográfico y cladístico, proponen al orden *Asparagales* con 30 familias, incluyendo *Agavaceae*, *Nolinaceae*, *Asparagaceae*, *Dracaenaceae*, *Alliaceae* y *Amarillidaceae*, etc (tabla 1). (Ojeda y Ludlow, 1995; Eguiarte, 1995).

En la subfamilia *Agavoideae*, el género *Agave* es el más importante y fue dividido por Gentry (1982) en dos subgéneros y grupos de acuerdo a su inflorescencia (tabla 1).

tabla 1. Clasificación de subgéneros y grupos de *Agave*.

Subgénero	Grupo	Características	No. Especies	Ejemplos
Littaea	<i>Amolae*</i>	acaulescentes	8	<i>attenuata, bakeri, pedunculifera, chrysoglossa, ocahui, vilmoriniana, yuccaeifolia</i>
	<i>Choritepalae*</i>	Especies pequeñas, tepalos separados.	3	<i>bracteosa, ellemeeitana, guengola.</i>
	<i>Filiferae*</i>	Hojas largas filiferas, limitados a la Sierra Madre Occidental	7	<i>colimana, felgeri, filifera, geminiflora, multiflora, ornithobroma, schidigera</i>
	<i>Marginatae</i>	pequeñas flores, largos tepalos	21	<i>albomarginata, ensifera, ghesbreghtii, horrida, kerchovei, lechuguilla, lophanta, pelona, pumilla</i>
	<i>Parviflorae</i>	Pequeñas flores altamente especializada alto contenido de sapogeninas	4	<i>parviflora, polianthiflora, schotti, toumeyana</i>
	<i>Polycephalae*</i>	hojas y flores de suave succulencia, dientes pequeños	5	<i>celsii, chiapensis, pendula, polyacantha, warelliana</i>
	<i>Striatae*</i>	hojas aserradas, flores y tepalos pequeños	3	<i>dasyliroides, striata, stricta</i>
	<i>Urcerolate</i>	tamaño pequeño, flores pequeñas en forma de urna.	2	<i>arizonica, utahensis</i>
Agave	<i>Americanae</i>	flores amarillas de pedicelo largo	6	<i>americana, franzosini, lurida, oroensis, scabra, scaposa</i>
	<i>Campaniflorae</i>	rosetas cortas, hojas largas verdes	3	<i>aurea, capensis, promontorii</i>
	<i>Crenatae</i>	margenes mamilados, panícula estrecha	7	<i>bovicornuta, calodonta, cupreata, hookeri, inaequidens, jaiboli, maximiliana</i>
	<i>Deserticolae</i>	hojas rígidas fibrosas, lanceoladas, y dientes débiles, panícula delgada	10	<i>avellanidensis, cerulata, deserti, gigantensis, margaritae, mckelveyana, moranni, sobria</i>
	<i>Ditepalae</i>	panícula abierta, tepalos cortos dimorficos	10	<i>applanata, chrysantha, colorata,</i>

				<i>flexispina, fortiflora, murpheyi, palmeri</i>
<i>Hiemiflorae</i>	flores agrupadas en forma esférica en una panícula delgada	12		<i>atrovirens, congesta, hiemiflora, hurteri, lagunae, pachycentra, potatorum</i>
<i>Marmoratae*</i>	pocas hojas escabrosas, espina pequeña	4		<i>gypsophila, marmorata, nayaritensis, zebra</i>
<i>Parryanae</i>	roseta globosa, compacta, hojas cortas, anchas, dientes conspicuos hacia la hoja	6		<i>gracilipes, guadalajarana, havardiana, neomexicana, parrasana, parryi</i>
<i>Rigidade</i>	hojas delgadas rígidas, dispuestas en espiral, bracteadas pequeñas, abiertas poco ramificadas	12		<i>aktites, angustifolia, cantala, fourcroydes karwinskii, macroacantha, tequilana</i>
<i>Salmianae</i>	largas rosetas verdes suculentas forma piramidal en la base de la panícula	5		<i>macroculmis, mapisaga, salmiana, tecta, ragusae</i>
<i>Sisalanae</i>	hojas lanceoladas, carnosas, verdes	5		<i>desmettiana, kewensis, neglecta, sisalana, weberi,</i>
<i>Umbelliflorae</i>	Panícula umbelada sostenida por un tallo suculento	2		<i>shawii, sebastiana</i>

Clasificación propuesta por Gentry (1982), \* grupos endémicos de México de acuerdo a García-Mendoza (1992).

### 1.1 Agave

Los agaves se consideran plantas perennes monocárpicas que realizan el Metabolismo *Ácido Crasuláceo (CAM)*, el cual es una de las tres vías fotosintéticas para la asimilación del CO<sub>2</sub> atmosférico y consiste en la fijación y almacenamiento temporal del CO<sub>2</sub> ocurre durante la noche y este es almacenado en forma de ácidos grasos (Nobel, *et al.*, 1998). que es la característica de la mayoría de los xerófilos (Pimienta-Barrios *et al.*, 2005). Sus hojas comúnmente son duras y rígidas (Figura 3), aunque también hay especies de hojas laxas. Muchos agaves, en sus hojas contienen una espina terminal y/o prominentes dientes marginales rectos o curvados, minúsculos o largos y planos o redondeados, siendo todas estas características útiles en la clasificación taxonómica; aunque el color de los dientes y las espinas pueden variar con la edad (Gentry, 1998; Irish, 2000). Sus tallos generalmente son pequeños, y son raras las especies que forman troncos de tamaño considerable. El largo tiempo en que la planta comienza a florecer favorece que la propagación de la especie sea principalmente asexual a través de la generación de rizomas o hijuelos. Sin embargo, la edad y frecuencia con que los agaves comienzan a producir hijuelos también es variable: a *A. tequilana* le toma 3 años y *A. deserti* los produce después de los 13 años (Nobel y Quero, 1986). Las flores de las formas paniculadas son más resistentes que las formas espigadas, influyendo esto en el tipo de animales que las polinizan,

siendo murciélagos y pájaros en el primer caso y pequeños insectos en el segundo (Parsons y Darling, 2000).



FIGURA 1. Fotografías representativas de algunas especies del género *Agave*. En la siguiente imagen se puede observar que la morfología entre estas especies es variable, en tamaño de la roseta, en la forma y largo de las hojas. (Fotografías de William Cetzal Ix).

#### 1.1.1 *Agave tequilana* Weber var. **Azul.**

*A. tequilana* es una planta carnosa, fibrosa, de color azul o verde grisáceo de tallo grueso y corto que alcanza de 30 a 50 cm en la madurez. La floración se inicia con el cambio de la estructura foliar de la roseta, el cual el órgano floral llega a medir de 5 a 6 m y es densamente ramificado con 20 a 25 umbelas largas; Con la floración se consigue la reproducción sexual y la formación de bulbilos (Valenzuela,1997). Las pencas se extienden radialmente con una longitud de 90 a 120 cm de largo por 8 a 12 cm de ancho, son lanceoladas, acuminadas, cóncavas, más anchas en medio, volviéndose angostas y más gruesas hacia la base; con un margen regularmente dentado y espinas aplanadas de 1 a 2 cm de largo. *A. tequilera* alcanza su madurez fisiológica entre los 8 y 12 años. Para fines comerciales, la inflorescencia se corta cuando comienza a emerger; de esta

manera los carbohidratos destinados a la emergencia floral son ahora acumulados en el tallo.

### **Floración de *Agave tequilana***

La floración del agave inicia con el cambio de la estructura foliar de la roseta, que se expande para captar más luz, además pierde turgencia por las pérdidas de humedad. El brote del eje floral es rodeado por hojas que son más largas que anchas (hojas acintadas), de color verde pálido. Al terminar el crecimiento del quiote se lleva acabo el desarrollo de los brazos o pedúnculos, donde se diferencian los agrupamientos florales. Con la floración se consigue la reproducción sexual y la formación de bulbilos (Valenzuela, 1997).



Figura 2. Floración de *Agave tequilana*. a) Eje floral o quiote, b) Agrupamientos florales.

*Agave tequilana* Weber var. *Azul* florece de los seis a los doce años de edad, dependiendo del lugar donde se cultive y del manejo agronómico (Valenzuela, 1997).

### **Tallo**

Durante tiempos de sequías severas, los tallos llegan a reducir su tamaño, provocando delgadas fisuras en el suelo alrededor de la base de la planta. Esto aumenta la utilidad de la forma de roseta al canalizar el agua cuando llueve (Irish, 2000).

### **Hoja**

La jugosidad de sus pencas es una de las características más distintiva de los agaves; estas contienen un parénquima esponjoso especializado de paredes

delgadas. Estas células almacenan agua y ayudan a amortiguar los cambios de reserva de agua en el suelo. Por su gran capacidad de almacenamiento, la longevidad de las pencas (hasta 15 años o mayormente durante todo el desarrollo de la planta) le concede al agave la ventaja de almacenar suficientes suministros para el florecimiento (Irish, 2000). La proporción volumen: área foliar es un índice útil que nos dice la capacidad de almacenar agua en las hojas; pencas con gran volumen y menor área foliar tienen más agua disponible para la transpiración. Así, el singular tamaño de los agaves influye en el uso eficiente de agua (ganancia de peso seco por unidad de transpiración) que finalmente afecta su distribución: los agaves de mayor tamaño se encuentran en la región sur-centro de México, zona con mayor humedad que la región norte (Woodhouse et al., 1983; Linton y Nobel, 2001). Por otra parte, la disposición en roseta de las hojas, les permiten a los agaves coleccionar el agua de lluvia hacia el tallo; además que la sombra formada por las mismas, reduce la evaporación y protege el órgano floral (Gentry, 1998). Aunque esto disminuye la frecuencia de intercambio gaseoso, también disminuye la pérdida de agua por transpiración (Nobel, 1988). La cutícula cerosa que cubre las pencas, es otra adaptación para prevenir la pérdida excesiva de agua. Otro tipo de adaptación morfológica de los agaves es el pequeño diámetro de sus vasos conductores y su baja densidad en las hojas.

## **Importancia económica y científica**

### **Importancia económica**

Las diversas variedades de agave encontradas en territorio mexicano, se han usado desde tiempos inmemoriales en la elaboración de bebidas alcohólicas. Las variables que afectan las características de los agaves, como temperatura, humedad, ciclo natural y precipitación pluvial, hacen que los productos obtenidos en cada región sean de propiedades únicas (Iniguez- Covarrubias et al., 2001a). De acuerdo al proceso, las bebidas alcohólicas pueden ser fermentadas o destiladas. Dentro de las bebidas destiladas, destaca el tequila, En los últimos años el tequila ha pasado de ser una bebida nacional, a ser un producto de reconocimiento con un importante crecimiento en el mercado internacional, además sea considerado símbolo de fusión cultural, pues fueron los españoles quienes, a su arribo, introdujeron la práctica de destilación al proceso de fermentación que ya practicaban las culturas prehispánicas (Mancilla-Margalli, 2000). El agave de mayor importancia en las industrias tequileras como materia prima para la elaboración de tequila es el Agave tequilana Weber azul por sus cualidades y exclusividad cuyos tallos cortados en mitad son cocidos y su jugo es extraído por desgarramiento de la pulpa. Si el tequila es mixto, se le adiciona hasta un 49% de azúcares de otras fuentes (caña o melaza) o solo los azúcares propios del agave si la bebida es 100%. Para la fermentación, se inocula la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (20 a 50 x 10<sup>6</sup> células/ mL) y posteriormente

el mosto obtenido, es destilado una primera vez (destrozamiento) en alambiques de cobre para separar las vinazas (levaduras, azúcares no fermentables, minerales, sólidos) de otros compuestos, y una segunda vez (rectificación), para concentrar los alcoholes en el cuerpo del destilado (45 a 50 °GL) y separar las cabezas y colas. Este producto es envasado como tequila blanco o puede ser reposado en barriles de roble blanco o encino por un año o más para producir respectivamente, el tequila reposado o añejo (Cedeño, 1995; Bautista-Justo et al., 2001; López y Dufour, 2001). Otras bebidas alcohólicas provenientes del destilado de jugos de agaves fermentados, incluyen mezcal, bacanora, sotol y, recientemente, henequén.

Los estados con Denominación de Origen Tequila en el país son: Jalisco, Michoacán, Nayarit, Tamaulipas y Guanajuato. De acuerdo al DOT (Determinación de Origen Tequila) determino que, hasta fecha actual, comprende 180 municipios: el TDO, a la fecha actual, comprende 180 municipios:

- todos los municipios del Estado de Jalisco, es decir 124,
- 8 municipios de Nayarit,
- 7 municipios de Guanajuato,
- 30 municipios de Michoacán y
- 11 municipios de Tamaulipas.

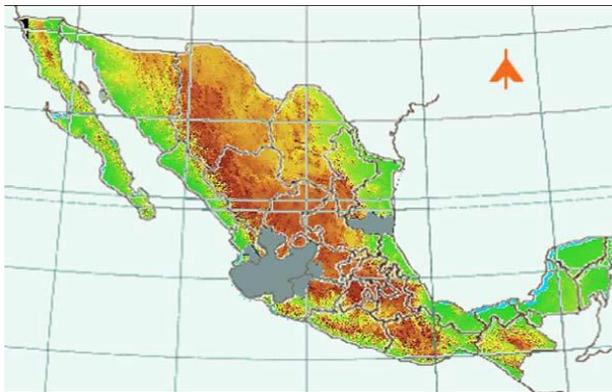


Figura 3. Denominación de origen del Tequila

En el caso particular del *Agave tequilana W. variedad Azul*, es la única planta reconocida para producir tequila, por su concentración de azúcares reductores totales (ART), que se concentran en la piña y en menor grado en la hoja (CESAVEG, 2018).

## Importancia científica

Investigaciones realizadas en algunas especies de agave, han demostrado que estas plantas son fuente natural de saponinas (hecogenina, smilagenina, tiogeninas), saponinas (clorogenina), esteroides, terpenos, vitaminas y otros principios medicinales. En los años 50 varias compañías farmacéuticas y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), cuantificaron el contenido de saponinas en algunas especies, encontrándose niveles entre 0.5 y 4.5% en especies como *A. vilmoriana*, *A. cerulata*, *A. lechuguilla*, *A. lophanta*, *A. colimani* y *A. schidigera*; mientras que las especies con alto contenido de fibra como *A. sisalana*, *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* presentan menor cantidad (de 0 a 0.5%; Gentry, 1998). En la medicina tradicional mexicana, por ejemplo, se han hecho uso de *A. lechuguilla* como antirreumático, antiinflamatorio, desinfectante en mordeduras de víboras y remoción de coágulos sanguíneos; *A. intermixta*, se utiliza como antiartrítico, antituberculoso y anticarcinógeno (Sáenz, et al., 2000); las pencas de *A. americana* y *A. salmiana* se utilizan como expectorante, cicatrizante, diurético, para dolores estomacales, cardíacos y escorbuto; *A. vilmoriana* se usa como antiinflamatorio y antifúngico, y de esta especie, recientemente, se caracterizaron dos esteroides denominados agamenósido y agavegenina (Jin et al., 2004). *D. wheeleri* también presenta algunas propiedades medicinales como antitusivo y en tratamientos de cefaleas (Gioanetto y Franco, 2004).

## Fructanos

Los fructanos son el principal producto fotosintético de los agaves, en el cual fue reportado que se encuentran dos tipos de fructanos principalmente, *graminanas* y un segundo grupo son las llamadas *agavinas* (Figura 4) cuya estructura molecular, aun no ha sido elucidada totalmente, pero poseen una unidad interna de  $\alpha$ -D- glucopiranososa unida a los enlaces ramificados por la unidad de fructanos que se encuentran en el agave, formados por oligoméricos o poliméricos constituidos por unidades  $\beta$ -fructofuranosil que se acumulan principalmente en su tallo (López et al., 2003). La mayoría de los carbohidratos se encuentran como polisacáridos de fructosa derivados de la sacarosa de elevado peso molecular; algunos son constituyentes estructurales y otros almacenes de energía y carbono (Mancilla-Margalli, 2000). Los fructanos se han clasificado en seis grupos dependiendo del tipo de enlace entre los residuos de fructosilo y la posición de la glucosa (Vijn y Smeekens, 1999; Mancilla-Margalli y López, 2006). El almidón es el carbohidrato de reserva más ampliamente distribuido, seguido de sacarosa, glucomanos y fructanos, siendo este último de gran interés en el desarrollo del presente trabajo. El primer reporte de la presencia de este carbohidrato en agaves fue en 1888 (Suzuki, 1993), y aunque no existen antecedentes científicos que comprueben la participación de este compuesto en la adaptación de los agaves en condiciones hostiles, investigaciones en otras plantas modelo lo sugieren. En la actualidad se

reconoce que los fructanos se encuentran en el 15% de plantas superiores (« 45,000 especies), representados principalmente por familias altamente evolucionadas. Además, los fructanos también se encuentran en algunos hongos (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*), algas (*Acetabularia*) y en varios taxa bacterianos (*Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Aceobacter*, *Streptococcus* y *Actynomices*) (Vijn y Smeekens, 1999).

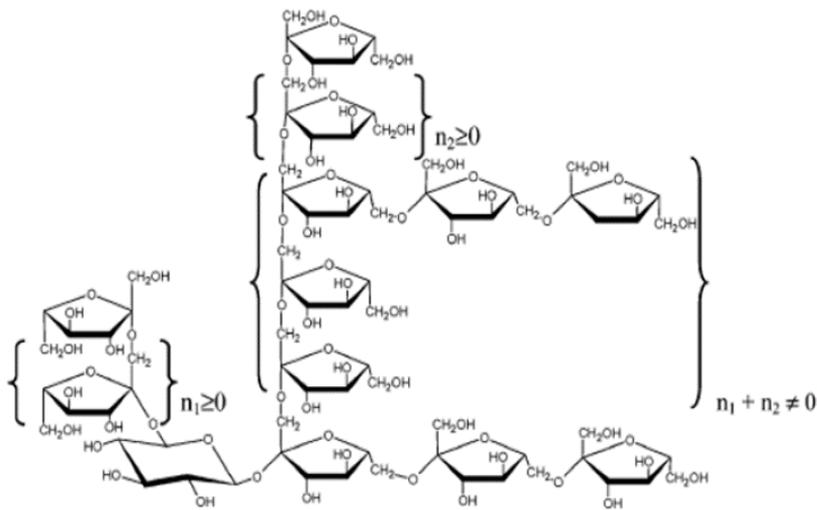
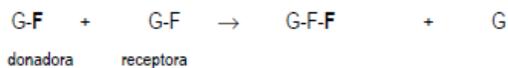


Figura 4. Estructura propuesta para las agavinas

### Síntesis de fructanos

Los fructanos se sintetizan en la vacuola como respuesta a la acumulación de sacarosa (Suc) este organelo, por la acción de una serie de enzimas conjuntamente denominadas *fructosiltransferasas* (FT). De acuerdo al modelo clásico de Edelman y Jefford (1968), la síntesis de *inulina* en *H. tuberosus*, inicia con la enzima *sacarosa: sacarosa 1-fructosiltransferasa* (1-SST, E.C.2.4.1.99) que transfiere irreversiblemente unidades de Fru de una molécula de Suc donadora a otra Suc receptora a través de un enlace *b* (2-1) (Gupta y Kaur, 2000; Figura 15):



Una segunda enzima, la *fructan: fructan 1-fructosiltransferasa* (1-FFT, E.C.2.4.1.100), prolonga la cadena transfiriendo reversiblemente unidades de Fru de un fructano a otro o incluso a Suc, que también actúa como aceptor de Fru:



De la diversidad estructural en *monocotiledoneas*, es evidente la participación de otras *FT* en la síntesis de enlaces *b(2-6)* y ramificaciones. Satyanarayana (1976a) reporto actividad 1-SST en una fracción cromatografía de *Agave vera cruz*, y la presencia de 1-FFT fue también sugerida para explicar la síntesis in vitro de 1,1-kestotetraosa (*DP4 inulina* o *Nys*) e *IOS* superiores formados después de tiempos mayores de incubación (Satyanarayana, 1976b); sin embargo, durante el ensayo enzimático no hubo formación de fructanos basados en 6*G-Kes* ni estructuras con enlaces *b(2-6)* ni moléculas ramificadas como se observa in vivo (Satyanarayana, 1976c). Dorland *et al.* (1977) discutieron la posible actividad para una *fructosil-transferencia* al C6 de la *Glc* de 1-*Kes* o fructanos superiores (formación de neofructanos). Este tipo de actividad denominada *fructan:fructan 6-glucosa fructosiltransferasa* (6*G-FFT*) fue primeramente descrita en cebolla (Henry y Darbyshire, 1980) y ajo (Darbyshire y Henry, 1981), y posteriormente purificada de raíces de esparrago (Shiomi 1981; 1982). La actividad característica de esta enzima es la formación de *FOS* con residuos de *Glc* interna por la transferencia de Fru de la 1-*Kes* o *IOS* a *Suc* o *IOS* formando un enlace *b(2-6)* sobre el C6 de la *Glc* (Ritsema y Smeekens, 2003; Ueno *et al.*, 2005). Esta reacción es reversible: la 6*G-FFT* transfiere Fru de la 6*G-Kes* a la *Suc* formando 1-*Kes*, aunque a una velocidad mucho menor (Shiomi, 1982):



Los enlaces *b(2-6)* de *graminanos* y *levanos* presentes en *Poaceae*, se forman por acción de la *sacarosa: fructan 6-fructosiltransferasa* (6-*SFT*, *E.C. 2.4.1.10*). Esta enzima utiliza *Suc* como donador de Fru a una amplia variedad de fructanos de diferente estructura y DP, formando exclusivamente enlaces *b(2-6)*. La 6-*SFT* a diferencia de la 1-*FFT*, usa fructanos como *fructosil-*

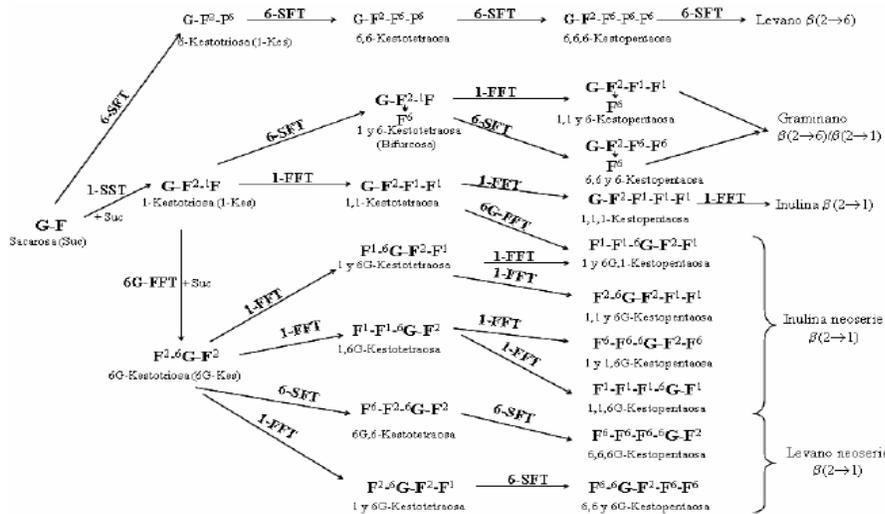
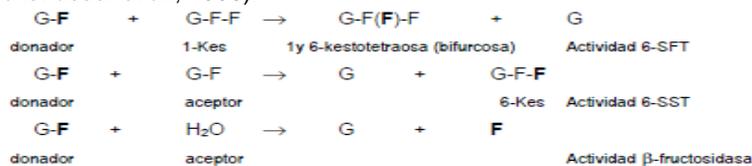
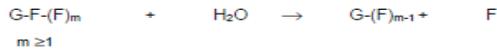


Figura 5. Diferentes vías biosintéticas de fructanos en plantas superiores. En plantas que sintetizan fructanos, la acumulación vacuolar de sacarosa induce la síntesis de *de novo* de la 1-SST y acumulación de 1-kestotriosa. La acción de diferentes *fructosiltransferasas* sobre este metabolismo genera la diversidad estructural encontrada de manera específica en cada especie.

aceptores pero no como donadores (Duchateau et al., 1995); esta característica no es trivial, ya que la *fructosil-transferencia* de Suc a fructanos es exergónica e irreversible (Figura 5). Al parecer, la 1-Kes es el metabolito central a partir del cual se forman las diversas estructuras por acción de distintas FT, lo que implica que la 1-SST es ubicua en las plantas que almacenan fructanos. Sin embargo, la presencia de 6-Kes principalmente en gramíneas, ha sugerido la existencia de una 6-SST, actividad aun no confirmada. Chatterton y Harrison (1997) apoyaron esta idea al observar que *Poa* amplia crecida en un régimen de 10/5°C día/noche presentó exclusivamente levanos pero nunca 1-Kes. Por otra parte, la expresión heteróloga de la 6-SFT en tabaco (Sprenger et al., 1995 y 1997) evidenció que en presencia únicamente de Suc, la 6-SFT actúa como *invertasa* (78%) pero también usa la Suc como aceptor formando la 6-Kes (20%) e incluso también actúa como 1-SST al sintetizar 1-Kes (15%). La característica de *transferasa* de esta enzima cambia significativamente de acuerdo al sustrato (Duchateau et al., 1995; Hochstrasser et al., 1998):



En el proceso de degradación de fructanos participan la *1-FFT* y las *fructan exohidrolasas (FEH, E.C.3.2.1.80)*. La *1-FFT* transfiere Fru de fructanos a la Suc o fructanos con DP menor; mientras que las FEH con actividad exolítica hidrolizan la Fru del extremo reductor del sustrato, disminuyendo en uno su DP (De Roover et al., 1999; Van den Ende et al., 2004):



Basado en la diferencia de energía libre de los enlaces glicosídicos, las *FEH* exhiben especificidad de sustrato, por lo que se clasifican como *1-FEH* o *6-FEH* si hidrolizan preferentemente enlaces *b(2-1)* o *b(2-6)*, respectivamente (Henson y Livingston, 1996). Recientemente, se caracterizó en trigo la *6-kestosa exohidrolasa (6-KEH)*, una FEH altamente específica a la *6-Kes*, y a diferencia de todas las demás, no es inhibida por Suc (Van den Ende et al., 2005). Así mismo, en achicoria existen isoformas (*1-FEH I*, *1-FEH IIa*, *1-FEH IIb*) con diferentes puntos isoeléctricos (pI), propiedades cinéticas y patrón de expresión. La clasificación de las FEH como E.C.3.2.1.80 es inexacta, pues esto refiere a las *b-fructofuranosidasas*, enzimas capaces de hidrolizar fructanos y Suc; mientras que las *FEH* son inactivas ante Suc e inactivadas por este mismo metabolito (De Coninck et al., 2005). Algunas *FEH* son solubles en la vacuola mientras que otras insolubles interactúan con la pared celular. Hasta hace poco se creía que la *FEH* asociada a la pared celular no tenía contacto con su sustrato; sin embargo, Livingston y Henson (1998) demostraron la presencia de fructanos en el apoplasto de avena.

## **PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS.**

Para el desarrollo y elaboración del presente proyecto se realizaron una serie de actividades las cuales están descritas a continuación de forma detallada especificando los procedimientos para su realización.

### **Actividades realizadas**

Actividades realizadas en la presente investigación se describen a continuación.

#### **Establecimiento *in vitro* de *A. tequilana* Weber var. *Azul*.**

El medio Murashige y Skoog (MS) es el medio más conocido. El medio MS es apto para la mayoría de las especies, por lo que es de amplia utilización, excepto para las más sensibles a la salinidad ya que se caracteriza por tener una elevada concentración salina. En esos casos puede recurrirse a otros medios o diluirlos. Para las plantas de agave se utilizó tanto medio líquido como sólido.

#### **Adaptación de agave a condiciones de invernadero**

La adaptación en de los nuevos individuos en un invernadero, para enfrentar con éxito su establecimiento en el campo. Varios autores (Martínez et al., 2005; Abreu et al., 2007; Monja-Mio, 2015) coinciden al señalar que dentro de las características que presentan están su baja capacidad fotosintética debido a los bajos contenidos de pigmentos. Adaptación de agaves obtenidas *in vitro*. La aclimatación de las plantas es la etapa decisiva debido al estrés al que son sometidas las plantas, de ella depende el éxito o fracaso de todo el proceso (Ortiz, 2000; Olmos et al., 2004). Durante la aclimatación hay condiciones de menor humedad relativa, mayor variación de temperatura, alta irradiación, y menor disponibilidad de nutrimentos, por lo que se debe considerar: 1) su establecimiento dentro de un invernadero; usar sustratos con buena retención de humedad, buen drenaje y aireación. El cual se utilizó tierra y tezontle para mejorar la humedad de los agaves.

#### **Aplicación de solución nutritiva para agaves.**

Para mejorar la calidad del agave fue necesario agregar una solución nutritiva con nitrato de magnesio ( $MgNO_3$ ), sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ), fosfato de potasio ( $K_2PO_4$ ), nitrato de calcio ( $CaNO_3$ ), nitrato de amonio ( $NH_4NO_3$ ) que son nutrientes primarios y secundarios que le ayudan a la planta.

### **Aplicación del S-metil 1,2,3- benzotiadiazol-7- carbotioato (BTH) y Ácido salicílico (AS).**

La aplicación del tratamiento de inducción de S-methyl benzo [ 1,2,3] thiadiazole-7-carbothiate (acibenzolador- S – metil o BTH), un análogo de AS producido por Syngenta, comercializado con el nombre de BIO® en Europa o ACTIGARDTM en los Estados unidos (Kuč 1982; Riveros-Angarita 2011); asperjándolo como solución. En comparación con el ácido salicílico (AS) Sigma aplicado de la misma manera que el análogo.

### **Molienda de muestras**

#### **material vegetal**

La desinfección se lleva acabo con un detergente y agua estéril fría para disminuir la contaminación microbiana en los agaves, y obtener mejores resultados en las extracciones.

La molienda de los agaves se hizo con nitrógeno líquido tanto del tallo como parte intermedia de la hoja y se guardó a -20°C para minimizar la degradación de las muestras.

### **Determinación del perfil de carbohidratos de las hojas y tallo de *A. gave tequilana Weber var. Azul*.**

Para la determinación del perfil de carbohidratos de las muestras de agave a analizar se implementaron métodos que nos permitieron determinar el contenido de carbohidratos presentes en las muestras.

### **Cromatografía en capa final, TLC (thin layer chromatography)**

La cromatografía en capa fina nos permite determinar los carbohidratos presentes en la muestra de agave a analizar de manera cuantitativa y cualitativa, mediante la implementación de marcadores de carbohidratos de acuerdo a las muestras a determinar, en este caso se usaron marcadores específicos como la glucosa, fructosa y fructooligosacáridos.

Para analizar las muestras de agave se realizó la determinación de cada una de las muestras, depositando uno de los extremos una cantidad suficiente de muestra (aun centímetro del borde) en la placa de HPTLC de sílica gel 60 (Merck KGaA) de 10 cm que actúa como la fase estacionaria, posteriormente se coloca la placa en la cámara de desarrollo el cual contiene un solvente específico para los carbohidratos a analizar, en este caso se desarrolló un solvente para que actúe como la fase móvil el cual es para los mono, di y oligosacáridos, se empleó una solución reveladora según Reiffova y Nemcova 2006.

#### **Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).**

La determinación de azúcares reductores (ART) se realizó con el método de DNS en el cual se basa en la determinación colorimétrica que es generada por medio de la reacción de óxido-reducción que se lleva a cabo al interactuar la muestra con el DNS a temperatura a punto de ebullición por un periodo de tiempo generando la oxidación de los compuestos lo cual produce una coloración en las muestras.

Para calcular la concentración de azúcares reductores se debe elaborar una curva de calibración con el azúcar de interés (fructosa y glucosa) en las muestras a analizar.

#### **Extracción de proteínas con el método de Macilvaine**

En este método se obtienen las proteínas contenidas en la célula vegetal para su posterior análisis. La actividad enzimática de las proteínas fue extraída del material vegetal, lo cual involucra la lisis de la pared celular y las membranas de los orgánulos, y lograr que las proteínas se mantengan en una estructura cuaternaria.

Para llevar a cabo esto se tritura con nitrógeno líquido agregando después el buffer a utilizar el de citrato (Macilvaine) para mantener el pH de la solución (ni tan ácido o básico que hidrolice o modifique de alguna manera a las proteínas). El EDTA actúa como agente quelante de iones divalentes, así como para evitar que estos iones puedan inhibir la actividad de las enzimas de interés. El  $\beta$ -mercaptoetanol como desnaturante. Como precaución final, las muestras en todos los pasos se mantienen a una temperatura de 4°C, para minimizar la velocidad de cualquier reacción no deseada.

### Determinación del contenido de proteínas por el método de Bradford

El método utilizado fue el método de Bradford el cual se basa en un principio diferente que la de lowry y biuret: se emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ac. fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Este método depende, pues de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es relativamente sensible a la presencia de contaminantes tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol. Su principal ventaja es que resulta más rápido y fácil de emplear que otros métodos alternativos, y más sensible que la medida de absorbancia a 280 nm. Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra se requiere la preparación de una curva de calibrado empleando una proteína patrón, que generalmente suele ser la seroalbúmina bovina.

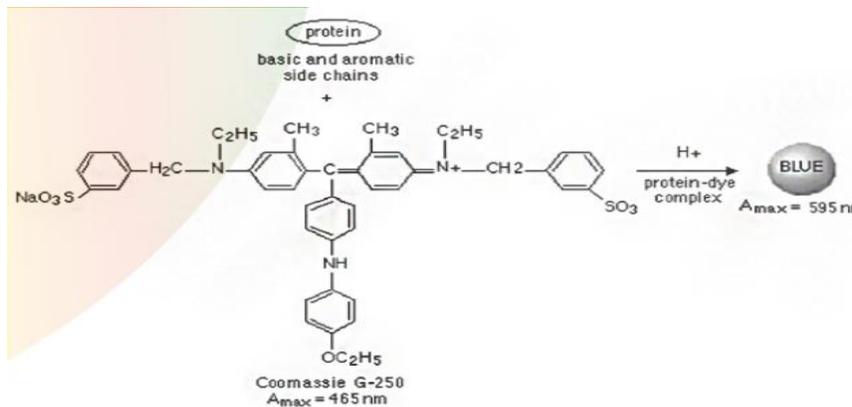


Figura 6. Reacción de las proteínas con el reactivo coomassie G-250.

### Determinación de actividad enzimática de la peroxidasa

Las peroxidasas catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como molécula aceptora de electrones, pasando la enzima, durante el ciclo catalítico, a través de diferentes formas. En la reacción catalizada por la enzima están implicados dos sustratos. La caracterización de este comportamiento cinético bi-sustrato fue explicada por Robert Alberty (Alberty, 1953). Este mecanismo recibe el nombre de mecanismo ping-pong (Cleland, 1970, 1990).

## Actividades complementarias

### Establecimiento *in vitro* de *A. tequilana* Weber var. *Azul*.

Se preparó medio MS líquido (Murashige y Skoog, 1962) (apéndice A), para transferir los Agaves de un año de edad que se encontraban en medio sólido en el laboratorio de cultivo *in vitro* de biología molecular del instituto tecnológico de Tlajomulco. Esto se realizó 2 veces durante 4 semanas (figura 7).



Figura 7. Agave en medio MS líquido.

### Adaptación de agave a condiciones de invernadero.

Las plantas de *Agave tequilana* fueron adaptadas en condiciones de invernadero en unidades experimentales con capacidad de 280 gramos aprox. (80% tierra y 20% de tezontle). Se regaron 2 veces al día durante 6 semanas, retirando la maleza y mosquita blanca.



Figura 8. Plantas de agave adaptadas en invernadero.

### Protocolo de aplicación de solución nutritiva para agaves.

Para la aplicación de la formula se agregaron a cada unidad experimental 50 mL

Soluciones	concentración ( g/ 2L)
<b>Nitrato de magnesio (<math>MgNO_3</math>)</b>	2
Sulfato de potasio ( $K_2 SO_4$ )	2.3
<b>Fosfato de potasio (<math>K_2 PO_4</math>)</b>	1.18
Nitrato de calcio ( $CaNO_3$ )	4.9
Nitrato de amonio ( $NH_4NO_3$ )	0.61

Tabla No.2 componentes de la solución para preparación de la solución nutritiva.

Se seleccionaron las mejores plantas para aislarlas de las demás, para meterlas bajo estrés (figura#). El área donde se colocaron las muestras se limpió con agua oxigenada al 10%. Para desinfectar.



Figura 9. Plantas de agave en área con condiciones controladas para la aplicación de (BTH).

### Protocolo de aplicación del S-metil 1,2,3- benzotiadiazol-7- carbotioato (BTH) y ácido salicílico (AS).

Para el tratamiento de inducción de resistencia se utilizaron plantas de 1 año de edad. Se preparó una solución de BTH a una concentración de 1.5 mM disuelto en agua y otra solución con ácido salicílico (AS) sigma a una concentración de 1mM disuelto en etanol puro. Las plantas control se asperjaron con agua estéril y las demás plantas se sometieron a tratamiento con las soluciones ante mencionadas por aspersión. Se tomaron muestras de tallo y hoja de 48 horas de haber realizado los tratamientos para continuar con las determinaciones a realizar.

### Molienda de muestras

El material vegetal fue recolectado del invernadero. Posteriormente se desinfectaron que se lleva acabo con un detergente y agua estéril fría para evitar la posible contaminación microbiana, así como cada uno de las herramientas utilizadas para la toma de muestra de los agaves, y obtener mejores resultados en las extracciones. Se cortaron las hojas del agave tomando solo lo intermedio y prosiguiendo al corte del tallo como se ilustra en la figura #.

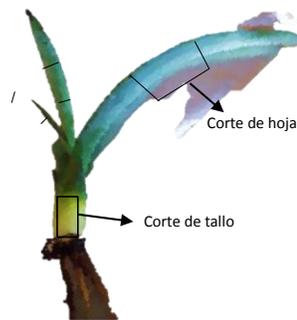


Figura10. Cortes del agave a analizar.

Después se molió tejido vegetal en un mortero esterilizado con N<sub>2</sub> líquido para cada muestra. Se pesaron 100 mg para extracción de ARN total, 200 mg para análisis de carbohidratos y 400 mg para extracción de proteínas.

### Protocolo para la determinación del perfil de carbohidratos de las hojas y tallo de *A. gave tequilana* Weber var. *Azul*.

#### Extracción de carbohidratos

Se utilizó una dilución 1:10 para la extracción de carbohidratos. Se pesó 200 mg de muestra (tallo y hoja) y se diluyo con agua destilada. Después se incubo a 80 °C durante una hora y se centrifugo a 14000 rpm durante 5 minutos. Se almacenó hasta su análisis.

### **Protocolo de cromatografía en capa final, TLC (por sus siglas en inglés, thin layer chromatography)**

Para la determinación de carbohidratos por el medio de cromatografía en capa fina se desarrollaron los solventes de la fase móvil solución A y B, además de la solución reveladora; se requirió de cámaras de cromatografías para el desarrollo de la fase y su correcta saturación.

Se estableció el número de muestras y tipo de estándar aplicar en la placa para determinar el número y medida de los carriles, de 7mm 18 muestras y estándar, se activa la placa manteniéndolo a 110° C por una hora, a su vez colocar la fase móvil en la cámara de desarrollo, para alcanzar el punto de saturación, tras activar la placa se debe marcar el borde inferior y marcar la posición de posición de los carriles de aplicación de las muestras, sin dañar la placa, inyectar 1µL de muestra o estándar por carril, secar inmediatamente después de inyectar cada una de las muestras con un flujo de aire caliente.

Colocar la placa en la cámara con la solución A (mono y disacáridos) y dejar hasta que el solvente llegue a un centímetro antes del borde superior y marcar cuidadosamente en la placa hasta donde llegó la solución A, sacar la placa de la cámara y secar inmediatamente totalmente con un flujo de aire caliente, después colocar en la cámara de desarrollo nuevamente en la solución B dejando que la solución llegue a la marca nuevamente a un 6 mm más que anteriormente.

Sacar y secar inmediatamente bajo un flujo de aire caliente, asperjar la solución reveladora de forma homogénea y colocar la placa en el horno precalentado a 120°C y monitorear la aparición de las bandas, detener la reacción de revelado cuando las bandas alcancen una intensidad adecuada.

Para la preparación de la solución de oligosacáridos (solución B y A) se requiere elaborar 80 mL los cuales se componen como se muestra en las siguientes tablas:

Tabla 3. Componentes de la solución de fase móvil para mono y disacáridos.

<b>compuestos</b>	<b>cantidad a preparar: 80 mL</b>
n-butanol	37.9
ácido acético	25.3
Éter	12.6
Agua destilada	4.2

Tabla 4. Componentes de la solución de fase móvil para oligosacáridos.

<b>compuestos</b>	<b>cantidad a preparar: 80 mL</b>
n-butanol	16
1-propanol	24
Etanol	24
Agua destilada	16

La solución reveladora se prepara en función de los estándares utilizados, por lo cual se determinó preparar la solución reveladora de difenilamida/anilina de la cual solo se requiere 10 mL preparándolo como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 5. Componentes de la solución reveladora.

<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad a preparar: 12 mL</b>
n-butanol	2.4
1-propanol	3.6
Etanol	3.6
Agua destilada	2.4

### **Protocolo para la determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)**

Para el desarrollo del método del ácido 3,5-dinitrosalicílico se requiere del reactivo DNS, además de una microplaca de poliestireno (96 Well EIA/ RIA plate) y el espectrofotómetro Multiskan GO 1510.

Para desarrollar este proceso se debe de realizar una curva de calibración con los azúcares reductores de interés (fructosa y glucosa) (Anexo), se preparó con una concentración inicial de 0 a 40 mM realizando diluciones de 5 mL de volumen a partir de un stock de fructosa y glucosa de 50 mM tal como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 6. Concentraciones de la curva de calibración de 0-40 mM.

tubo	Concentración (mM)	Concentración (µg/ml)	Agua destilada (mL)	Fructosa o glucosa (mM) (mL)
0	0	0	5.0	0.0
1	2	360	4.75	0.25
2	4	720	4.5	0.5
3	6	1080	4.25	0.75
4	8	1440	4.0	1.0
5	10	1800	3.75	1.25
6	20	3600	2.5	2.5
7	40	7200	0.0	5.0

Tras preparar las diluciones a la concentración requerida para elaborar la curva de calibración se llevó a cabo el procedimiento general para el desarrollo del método del DNS.

Tomando de cada tubo los estándares para la curva y de las muestras analizar 0.1 mL (100 µL) y colocándolos en tubos de cristal, agregar 1 mL de reactivo DNS y mezclar de manera adecuada, colocar e incubar en baño maria a 100° C durante 10 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente (figura #) y realizar la absorbancia a 570 nm por medio del análisis espectrofotométrico de las muestras en micro placas (figura #). Una vez determinada la concentración de los azúcares reductores totales de las muestras en función de la ecuación dada en la curva de calibración.



Figura 11.

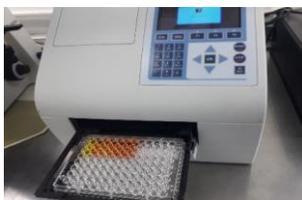


Figura 12.

Figura 11 y 12. Proceso para elaborar la curva de calibración de azúcares reductores por espectrofotometría.

### Protocolo de extracción de proteínas por el método de *macilvaine*.

El proceso se lleva a cabo a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. utilizando en cada lote de extracción 200 mg de muestra molida.

Se pulveriza con N<sub>2</sub> líquido el material vegetal (tallo y hoja). Colocando 200 mg de muestra en tubos eppendorf de 2 mL. con buffer de *McIlvaine* (2ml/g) () adicionado con *B-mercaptoetanol* 1Mm. Agitar la suspensión constantemente durante 2h a 4 horas para extraer todas las proteínas. con un cedazo retirar la mayor cantidad posible de sólidos de la muestra y guardar el sobrenadante en tubos eppendorf de 1.5 mL y después centrifugar a 18000 rpm por 30 min. El sobrenadante clarificado contiene las proteínas. Colocar a nuevos tubos eppendorf el sobrenadante y guardar a 4° C para sus siguientes procedimientos a realizar.

#### **Protocolo para la determinación de proteínas por el método de Bradford con BSA.**

Para la determinación de proteínas se desarrolló el método de Bradford adaptándolo a microplaca, utilizando para esto la microplaca de poliestireno (96 Well EIA/RIA plate) y el espectrofotómetro Multiskan GO 1510.

Para llevar a cabo este proceso también se necesita realizar una curva de calibración con albumina (BSA). Se desarrolló una curva de calibración (anexo) con BSA la cual se preparó un stock con una concentración inicial de 1 mg/ mL en la cual se prepararon una serie de diluciones de 1 mL de volumen en un rango de 0- 1 mg/ mL como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 7. Concentraciones de la curva de calibración de 0- 1 mg/mL.

tubo	Concentración (mg/mL)	Volumen de stock (mL)	Volumen de agua destilada (mL)
1	0.0	0.0	1.0
2	0.2	0.2	0.8
3	0.4	0.4	0.6
4	0.6	0.6	0.4
5	0.8	0.8	0.2
6	0.9	0.9	0.1
7	1	1.0	0.0

Después de preparar las diluciones a las concentraciones requeridas para la elaboración de la curva de calibración se continuo con el procedimiento general para el desarrollo del método de Bradford.

Se tomaron de cada tubo de los estándares para la curva y de las muestras a cuantificar 20  $\mu\text{L}$  y se colocó en tubos eppendorf de 1.5 mL, adicionar 1 mL de reactivo de Bradford diluido (1-4 v/v) y agitar, incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos no más de 1 hora, colocar 250  $\mu\text{L}$  en la placa y leer la absorbancia a 595 nm por medio de análisis espectrofotómetro de las muestras. Una vez determinada la absorbancia de las muestras se cuantifico la concentración de proteínas totales de las muestras en función a la ecuación de la curva de calibración (anexo).

### **Determinación de inhibición de la actividad enzimática de la peroxidasa**

La actividad peroxidasa se determina espectroscópicamente. Una alícuota de solución enzimática (1  $\mu\text{L}$ ) se adiciona a 2 ml de tampón fosfato 10,0 mM, pH 6,0 que contiene 18,0 mM guayacol y 4,9 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustratos. Los cambios de absorbancia debidos al producto de oxidación del guayacol se siguen a 470 nm durante 3-5 min y 25 °C.

Una unidad de actividad peroxidasa se define como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu\text{mol}$  de guayacol por minuto ( $\epsilon_{470} = 5200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La actividad específica se expresa como unidades de actividad por miligramo de proteína (U  $\text{mg}^{-1}$ ). La medida de actividad está directamente relacionada con la pendiente de la recta A470 (t) (Fig. 3). Los ajustes de regresión lineal poseen sus mejores coeficientes de correlación cuando los valores de absorbancia se encuentran entre 0( $t_0$ ) y 0,5 - 1( $t_f$ ).

En el cálculo de la actividad peroxidasa hay que tener en cuenta: el volumen de la alícuota de enzima, el volumen de la mezcla de reacción, un factor de conversión para expresar el resultado en U  $\text{ml}^{-1}$  y un factor de dilución en caso de que sea necesario. Las actividades enzimáticas de las muestras se miden por triplicado. Los coeficientes de variación en las medidas suelen ser de ~ 7%.

### **Protocolo de extracción de ARN total por el método de Trizol**

Para la extracción de ARN total se utilizó el protocolo de Trizol Reagent. Se pusieron 100 mg de material vegetal en tubos eppendorf de 1.5 mL, se adiciono 1 mL de Triizol, se incubo a temperatura ambiente durante 5 min. Se centrifugo durante 10 min a 12000 rpm a 4°C, después se adiciono 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se agito vigorosamente por 15 seg. se incubo de nuevo a temperatura ambiente durante 3 min. Después se centrifugo durante 15 min a 12000 rpm a 4°C. se trasfirió la fase acuosa a un tubo de reacción nuevo.

Precipitación de ARN total

Se le adiciono 500 µL de isopropanol frio y se incubo a 4°C. se centrifugo durante 10 min a 12000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se adiciono 1 mL de etanol puro, luego se agito vigorosamente. Se centrifugo durante 5 min a 7500 rpm a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Después se adiciono 1 mL de etanol 75%( apéndice A) agitando vigorosamente y centrifugando durante 5 min a 7500 rpm a 4°C eliminar el sobrenadante. Después se dejó secar el pellet de RNA, para finalizar se resuspendio en 30 µL de agua tratada con DEPC (Apéndice A). almacenar a -20° C máximo dos semanas para su análisis o a -70 °C por un mes.

### Geles agarosa

Para el análisis de integridad del material genómico y la verificación de algunos productos, se corrieron geles de agarosa a 1%. La agarosa se disolvió en buffer SB-1X con bromuro de etidio (Apéndice A). Se mezcló 2 µL de muestra con 2 µL de buffer de carga y se aplicaron individualmente en cada pozo del gel de agarosa. Las corridas se efectuaron en buffer SB-1X. La visualización de las bandas de ácidos nucleicos se hizo mediante luz ultravioleta.

### Determinación de la concentración de ARN total.

Se hizo una dilución de 1:100 con agua tratada con EDPC para determinar la concentración con el espectrofotómetro lambda XLS a una absorbancia de 260 nm. Utilizando la formula siguiente se calculó la concentración de ARN total:

$$\text{mg}/\mu\text{L} = (Fd * Abs_{260})/25$$

Fd= factor de dilución

25= coeficiente de extinción de ARN.

Determinando la concentración del ARN Total se procede hacer el tratamiento de DNasas.

### Tratamiento de DNasas

Para llevar a cabo el tratamiento se ponen las siguientes cantidades de soluciones en un tubo libre de RNasas:

Tabla 8. Cantidades necesaria para realizar el tratamiento por mg de RNA total.

Componentes	Cantidades
ARN	1 µg
Tampón de reacción 10X con MgCl <sub>2</sub>	1 µL
DNasas 1	1 µL ( 1U)
Agua libre de nucleasas	A 10 µL

Después de agregar las soluciones se incubó a 37 ° C durante 30 min y se agregó 1 µL de EDTA 50 mM e incubó a 65 ° C durante 5+ minutos. Se utilizó el ARN

**Comentado [VR2]:** SE RECOMIENDA COLOCAR EL TITULO DE LAS TABLAS EN LA PARTE SUPERIOR.

preparado como plantilla para la transcriptasa inversa. Se evaluó la integridad del ARN antes de la síntesis de ADNc. Con el método más común que es la electroforesis desnaturalizada en gel de agarosa seguida de tinción con bromuro de etidio. Si tanto el rARN 18S como el 28S aparecen como bandas agudas después de la electroforesis del ARN total, se considera que el ARN está intacto. La banda de rRNA 28S fue aproximadamente dos veces más intensa que el rRNA 18S.

### Protocolo para la síntesis de cDNA de la primera hebra.

Se utilizó el método de RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit. Se usó 5 µg de ARN total o 500 ng de ARNm de poli (A) para generar ADNc de la primera cadena como el paso inicial de un protocolo de RT-PCR de dos pasos. Posteriormente, para llevar a cabo el protocolo se descongelaron, mezclaron y centrifugaron los componentes del kit. Se añadieron los siguientes reactivos en un tubo estéril libre de nucleasa en hielo en el orden indicado:

Tabla 9. Cantidad que se necesita para la síntesis de la primera hebra.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidades</b>
RNA total	5 µg
Primer Random hexamer	1 µL
Agua libre de nucleasa	A 12 µL
Volumen total 12 µL	

Se mezcló suavemente, se centrifugó brevemente e incubó a 65 ° C durante 5 min. Enfriándolo en hielo. Después se añadió los siguientes componentes:

Tabla 10. Componentes para obtener el productos de transcripcion inversa.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidades</b>
5X reaction Buffer	4 µL
RiboLock RNase inhibidor (20U/ µL	1 µL
10 mM dNTP Mix	2 µL
<b>RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL</b>	1 µL
<b>Volumen Total</b>	20 µL

Para la síntesis de cebado hexamétrico al azar, se incubó durante 5 minutos a 25 ° C seguido de 60 min a 42 ° C. para terminar la reacción se incubó a 70 ° C por 5 minutos.

El producto de reacción de transcripción inversa se incubó a -20°C hasta su utilización.

### Amplificación en PCR punto final con primers específicos.

los primers (tabla #) fueron preparados con una dilución de 1:10 con solución Tris 10 mM, ajustando a un volumen de 50 µL.

Tabla 11. *Primers* utilizados para la PCR punto final para la amplificación de fructosil transferasa y 18S rRNA genes en *Agave tequilana*.

Code	Primer sequence	Tm (°C)	Fragment (bp)	Accession number
1-SST-At F	5' CCATGGTTCCTGACCATTTGGTACG 3'	50	700	DQ535031
1-SST-At R	5' TCGGTCTCNCCAACRTANSCCCA 3'			
1-FFT-At F <sup>a</sup>	5' TGGCACAGGTCGTCAATCTT 3'	50	600	EU026119
1-FFT-At R <sup>a</sup>	5' TTCCCAACATACCCCATAGCAC 3'			
18S-At-F <sup>a</sup>	5' GCTACCACATCCAAGGAAG 3'	60	135	GQ983553
18S-At-R <sup>a</sup>	5' TCGTTAAGGGATTAGATTGT 3'			

At, *A. tequilana*; Al, *A. inaequidens*; L, deoxyinosine; K, T+G; M, A+C; R, A+G; S, C+G; Y, C+T.  
<sup>a</sup> Used in *A. inaequidens* RT-PCR amplification.

Las muestras de ADNc fueron diluidas con solución Tris 10 mM. Se preparó una reacción de 12.5 µL para cada muestra con las siguientes soluciones:

Tabla 12. Cantidad de cada solución para cada reacción de amplificación de PCR punto final.

SOLUCIONES	VOLUMEN (µL)
H <sub>2</sub> O con DEPC	7.8
Buffer 10X reaction	1.25
dNTP'S	0.25
Oligos	1
Taq	0.2
ADNc	2
<i>volumen total</i>	12.5

Después de poner todas las soluciones de la tabla anterior centrifugar las muestras durante 10 s. Agregar una gota de aceite mineral y colocar en el termociclador (figura #) bajo las siguientes condiciones de amplificación

Tabla 13. Condiciones para la amplificación en PCR punto final.

30 ciclos			
Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Extensión final
94 °C	60 °C	72 °C	72 °C
1 min.	1 min.	1 min.	7 min.

Las condiciones de hibridación o anillamiento cambian dependiendo de los oligos a utilizar. Al terminar el proceso de amplificación se procede a analizar la amplificación en gel agarosa.

## **RESULTADOS, PLANOS, GRÁFICAS, PROTOTIPOS, MAQUETAS, PROGRAMAS, ENTRE OTROS.**

Los resultados obtenidos del desarrollo de esta investigación se reportan a continuación en función de las actividades desarrolladas y las diferentes pruebas que se requirió realizar para el cumplimiento de las actividades y la obtención de los datos concretos.

### **Establecimiento *in vitro* de *A. tequilana* Weber var. *Azul*.**

Los agaves que mejor se adaptaron y en un menor tiempo en medio líquido fue los agaves seleccionados para la aclimatación en el invernadero del instituto tecnológico de Tlajomulco

### **Adaptación de agave a condiciones de invernadero.**

Los agaves *tequilana* fueron adaptados satisfactoriamente, después de la adaptación de la raíz de los agaves (figura #), se seleccionaron plantas iguales en tamaño de hojas y número de hojas para aislarlas y someterlas bajo estrés, ninguna planta mostró algún tipo de contaminación.



Figura 13. Adaptación de raíz del agave.

### **Protocolo de aplicación de solución nutritiva para agaves.**

Al aplicar una solución nutritiva al agave ocasionó que las plantas de un año que se encontraban en desarrollo de crecimiento fueran aptas para someterlas bajo estrés abiótico.

### Aplicación del S-metil 1,2,3- benzotiadiazol-7- carbotoiato (BTH) y ácido salicílico (AS).

Los agaves fueron asperjados correctamente tratando de que cada planta tuviera la misma cantidad de solución asperjada para someterla bajo estrés, para posteriormente hacer los análisis correspondientes que permitirán comparar los resultados obtenidos de la comparación de esos estreses.

### Determinación del perfil de carbohidratos de las hojas y tallo de *A. gave tequilana Weber var. Azul*.

Los resultados obtenidos en la cromatografía de capa final fueron las siguientes:

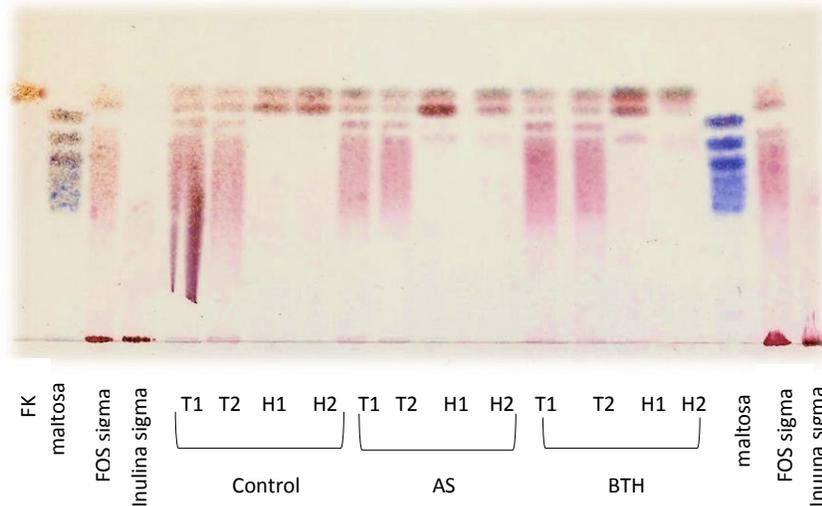


Figura 14. Resultados obtenidos del perfil de carbohidratos por HPTLC.

La técnica de TLC fue de las primeras usadas en la caracterización de fructanos y está aún en uso, pues, aunque con menor resolución, da información cualitativa semejante a sistemas cromatográficos de alta resolución, además de ofrecer la ventaja de ser un método sencillo, barato y rápido. En una primera aproximación, los fructanos de agave en los dos tratamientos fueron separados en fructanos de alto y bajo DP por precipitación con etanol absoluto. A partir de los datos de TLC (Figura 14) En general, la síntesis y acumulación de fructanos se produjeron en los tallos más que en las hojas. En el tratamiento con AS indujo claramente una fuerte acumulación de fructanos en tallos. En

comparación con los controles y el tratamiento BTH. En contraste, el efecto de SA 1 mM, equivalente a la dosis baja empleada en un estudio previo (Suárez-González et al., 2014) fue rápido, fuerte y estable. El efecto observado apoyó además la evidencia de que SA estaba provocando una respuesta en agave, como se observó anteriormente. Los patrones de acumulación de fructanos contrastantes observados en los agaves tratados con SA, sugieren además que la acumulación de fructanos en respuesta al estrés es menos dependiente de la disponibilidad de Suc que de los cambios fisiológicos provocados por SA y otros reguladores relacionados con el estrés. Los resultados obtenidos en el tratamiento del ácido salicílico fueron los esperados. A diferencia del análogo del ácido salicílico (BTH), que la mayor acumulación de fructanos se obtuvo en las hojas de acuerdo a los datos cualitativos de estas pruebas, corroborando con los análisis cuantitativos de la determinación de azúcares reductores (tabla 14-15).

#### **Determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).**

En la determinación de carbohidratos por el método de DNS todas las muestras se realizaron por triplicado, se obtuvieron los siguientes resultados de acuerdo a la curva de calibración en el anexo 1. El cual generó la siguiente ecuación con un  $R^2$  de 0.9985.

$$Y = 0.335x + 0.0388$$

Dando las siguientes concentraciones:

Tabla 14. resultados de concentración de fructosa en las plantas de agave en diferente estrés abiótico.

CUANTIFICACION DE AZUCARES REDUCTORES (DNS) FRUCTOSA						
TRATAMIENTO	PDLPLANTA	ABS 1	ABS2	ABS3	$\bar{x}$	mM
CONTROL	TALLO	0.251	0.306	0.304	0.284	7.336
	HOJA	0.185	0.197	0.224	0.200	4.841
SA	TALLO	0.403	0.348	0.376	0.374	10.028
	HOJA	0.229	0.243	0.266	0.245	6.170
BTH	TALLO	0.336	0.310	0.329	0.324	8.541
	HOJA	0.535	0.414	0.519	0.483	13.266

Tabla 15. resultados de concentración de glucosa en las plantas de agave en diferente estrés abiótico

CUANTIFICACION DE AZUCARES REDUCTORES (DNS) GLUCOSA						
TRATAMIENTO	PDLPLANTA	ABS 1	ABS2	ABS3	$\bar{x}$	mM
CONTROL	TALLO	0.251	0.306	0.304	0.284	7.306
	HOJA	0.185	0.197	0.224	0.200	4.811
SA	TALLO	0.403	0.348	0.376	0.374	10.021
	HOJA	0.229	0.243	0.266	0.245	6.150
BTH	TALLO	0.535	0.414	0.519	0.483	8.501

HOJA	0.336	0.310	0.329	0.324	13.066
------	-------	-------	-------	-------	--------

Para la cuantificación de los carbohidratos, se determinaron en los extractos originales los azúcares reductores totales (ART) (Miller, 1959); también se determinó su contenido de glucosa (G) y la fructosa (F).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cuantificación de azúcares reductores, los resultados fueron los esperados con respecto al ácido salicílico, ya que la mayor acumulación de carbohidratos se obtuvo en el tallo y menor cantidad en las hojas. En comparación con el control y el tratamiento BTH la mayor acumulación de carbohidratos en el tallo se obtuvo en el tratamiento con AS, a diferencia de la acumulación en las hojas que se dio en el tratamiento con BTH obteniendo una diferencia estadística notable. Siendo el mejor tratamiento para la acumulación de carbohidratos en las hojas el BTH y para el tallo el AS.

#### Determinación de proteínas por el método de Bradford con BSA.

En la cuantificación de proteínas por el método de Bradford se obtuvieron los siguientes resultados de acuerdo a la ecuación dada por la curva de calibración con una  $R^2$  de 0.9971.

$$Y = 0.07731x + 0.1806$$

Las siguientes concentraciones fueron:

Tabla 16. resultados de concentración de proteínas en las plantas de agave en diferente estrés abiótico

CUANTIFICACION DE PROTEINAS						
TRATAMIENTO	PDLPLANTA	ABS 1	ABS2	ABS3	$\bar{x}$	mg/ml
CONTROL	TALLO	0.341	0.389	0.408	0.377	0.254
	HOJA	0.340	0.337	0.365	0.347	0.215
	TALLO	0.374	0.386	0.387	0.382	0.261
SA	HOJA	0.304	0.378	0.397	0.355	0.225
	TALLO	0.450	0.412	0.407	0.422	0.3128
BTH	HOJA	0.453	0.450	0.445	0.449	0.347

De acuerdo a los resultados anteriores la mayor concentración de proteínas se obtuvo en las plantas que fueron sometidas a estrés abiótico con BTH, teniendo una mayor concentración de proteínas en las hojas y en el tratamiento del ácido salicílico mayor concentración en el tallo. En comparación de los tratamientos a las plantas control si hubo una diferencia estadísticamente significativa en la acumulación de proteínas siendo el mejor tratamiento tanto en hojas como tallo el BTH.

## Resultados de la determinación de la actividad de inhibición de la peroxidasa.

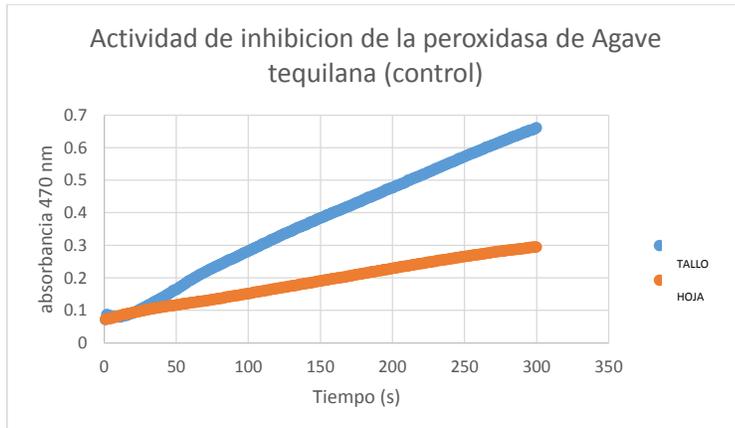


Figura 1. Curva cinética de la oxidación del guayacol con solución proteica de agave ( $\mu\text{L}$ ) a 470 nm.

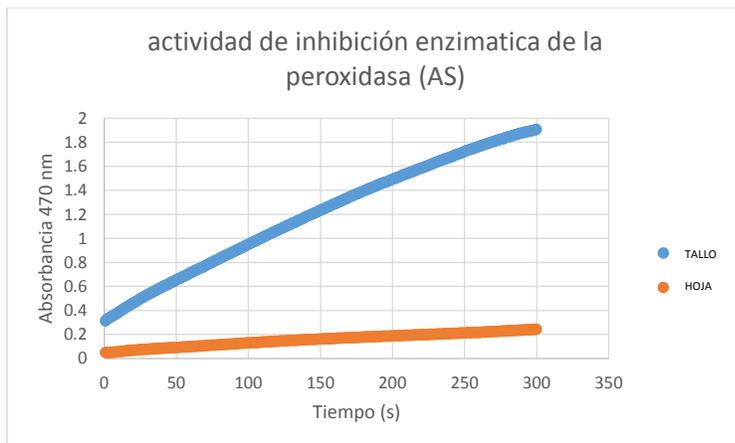


Figura 2. Curva cinética de la oxidación del guayacol con solución proteica de agave ( $\mu\text{L}$ ) a 470 nm.

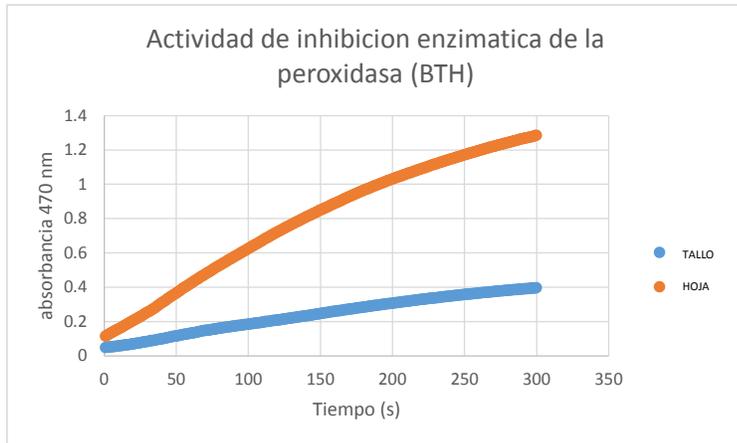


Figura 3. Curva cinética de la oxidación del guayacol con solución proteica de agave (1 $\mu$ L) a 470 nm.

Se encontró que la actividad peroxidasa varía de un tratamiento a otro. Los resultados fueron fuertes y transitorias en hojas, y más débil y más lenta en tallos, en el tratamiento con BTH y resultados contrarios con el AS. Este patrón coincidió con el vínculo observado entre el estado de carbohidratos de la planta y su capacidad para responder a la invasión de patógenos, que es parte del fenómeno de "alta resistencia al azúcar" frecuentemente descrito en las plantas. Este último depende de la participación de los azúcares simples en la activación de varios genes clave relacionados con la patogénesis y otros genes relacionados con la defensa, la acumulación de metabolitos secundarios defensivos y la inducción de una explosión oxidativa. Es bien conocido que las condiciones óptimas catalíticas varían en función de la enzima y de los sustratos utilizados (Sakharov et al., 2002). Para la mayoría de sustratos, la actividad máxima se encuentra entre pH 4,5 y 6,0. Estas pruebas se realizaron con proteínas de palma real que se obtuvieron resultados estadísticamente significativos Sánchez (2009). El cual se obtuvieron en este proyecto.

#### Extracción de ARN total por el método de Trizol

Los resultados de las concentraciones obtenidas de RNA total de los agaves tanto tallo como hojas fueron los siguientes ilustrados en la tabla 17.

Tabla 17. Concentraciones de ARN Total del *Agave tequilana*.

PARTE DEL <i>Agave tequilana</i>	Concentración mg/ $\mu$ L
<b>CONTROL</b>	
TALLO1	0.428
HOJA 1	0.404
TALLO 2	0.532
HOJA 2	0.388
TALLO 3	0.448
HOJA 3	0.392
<b>TRATAMIENTO CON BTH</b>	
TALLO1	0.488
HOJA1	0.516
TALLO2	0.336
HOJA2	0.192
TALLO3	0.416
HOJA3	0.168
<b>TRATAMIENTO CON ACIDO SALISCILICO</b>	
TALLO1	0.3
HOJA1	0.668
TALLO 2	0.308
HOJA 2	0.684
TALLO 3	0.26
HOJA 3	0.692

### INTEGRIDAD DEL ARN TOTAL CON GEL AGAROSA

En la siguiente figura se pueden observar la integridad del 28S, 18S y los ARNm de las extracciones con el método de trizol.

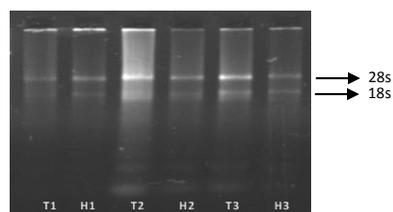


Figura 15. Resultados de la integridad de la extracción de *Agave tequilana* control.

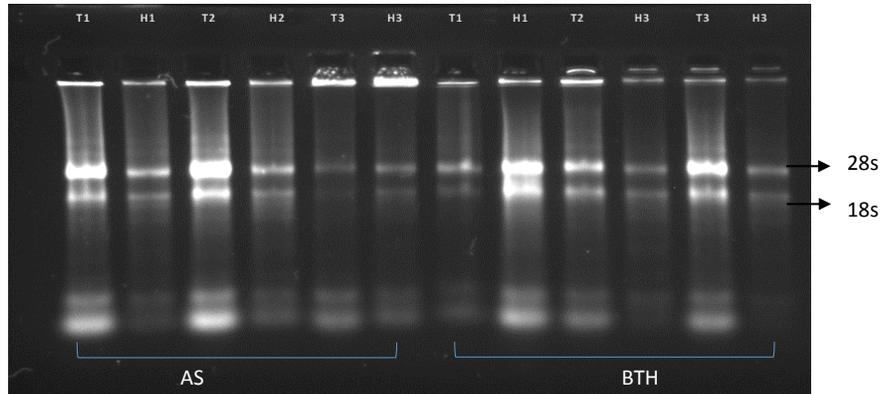


Figura 16. Resultados de la integridad de la extracción de ARN total del tratamiento AS y BTH.

En la extracción de RNAtotal, se obtuvieron de muy buena calidad, esto fue gracias a que la técnica TRIZOL Reagent es eficiente, debido principalmente al tipo de tejido siendo de la edad de un año, donde las células se reproducen muy rápidamente por tanto el proceso transcripcional está muy activo y la cantidad de RNA es mayor. La FIGURA 15 y 16 muestran al RNAtotal en sus tres formas: mRNA y tRNA en forma de barrido y rRNA (18S, 28S) en forma de bandas. Sus concentraciones fueron adecuadas para la extracción de mRNA, ya que presentan una concentración promedio de 0.386 mg/ $\mu$ L, estas fueron medidas en el espectrofotómetro los resultados de las concentraciones se pueden observar en la tabla 17.

## TRATAMIENTO DE ADNAsas.

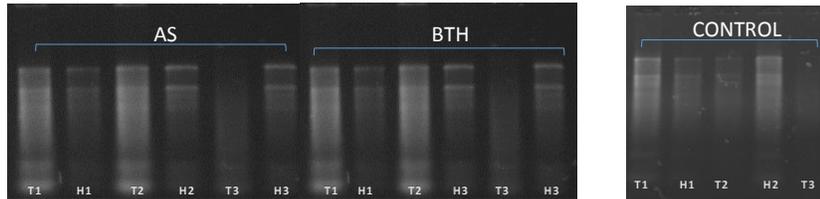


Figura 17. Resultados de tratamiento de ADNAsas en el ARN total de *Agave tequilana* de los tratamientos AS Y BTH.

Al aplicar el tratamiento de ADNAsas se eliminaron todo residuo que pudiera afectar los resultados de la síntesis de ADNc sin afectar la integridad de bandas 28s y 18s.

Resultados de las concentraciones de la síntesis de la primera hebra del ADNc.

Tabla 18. Concentraciones de síntesis de la primera hebra del ADNc de *Agave tequilana*.

PARTE DEL AGAVE TEQUILANA	Concentración mg/ $\mu$ L
<b>CONTROL</b>	
TALLO1	2.56
HOJA 1	2.592
TALLO 2	2.592
HOJA 2	2.592
TALLO 3	2.456
HOJA 3	2.088
<b>TRATAMIENTO CON BTH</b>	
TALLO1	3.12
HOJA1	3.504
TALLO2	3.112
HOJA2	3.556
TALLO3	3.104
HOJA3	3.544
<b>TRATAMIENTO CON ACIDO SALISCILICO</b>	
TALLO1	2.825
HOJA1	2.635
TALLO 2	2.803
HOJA 2	2.625
TALLO 3	2.799
HOJA 3	2.606

**Productos de PCR punto final con los *primers* específicos en gel agarosa.**

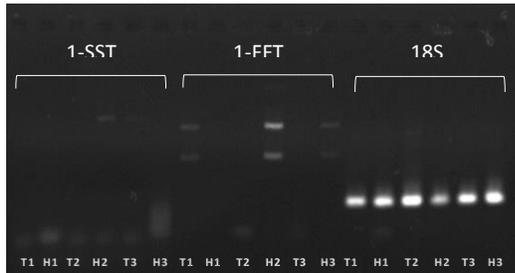


Figura 18. Resultados de PCR punto final con *primers* para amplificar fructosil transferasa y 18s rRNA genes en Agave tequilana control.

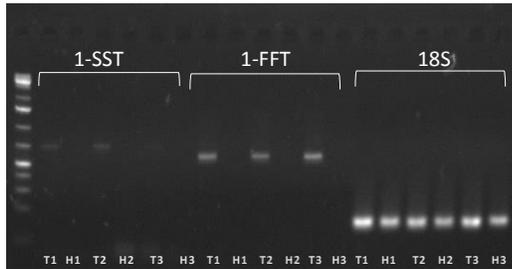


Figura 19. Resultados de PCR punto final con *primers* para amplificar fructosil transferasa y 18s rRNA genes en Agave tequilana con AS.

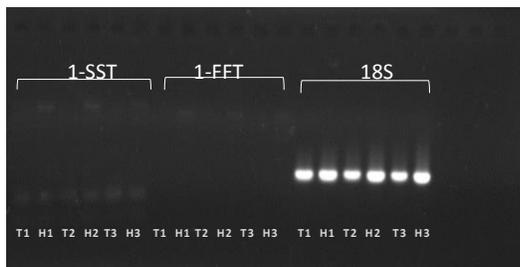


Figura 20. Resultados de PCR punto final con *primers* para amplificar fructosil transferasa y 18s rRNA genes en Agave tequilana con BTH.

Las secuencias de ADNc parcial clonadas usando una estrategia de amplificación por PCR basada en el uso de cebadores específicos se enumeran en la Tabla 11. Con respecto a *A. tequilana*, los fragmentos de cDNA correspondientes a los genes 1 - SST y 1 - FFT mostraron 99% y 100% Con los genes 1 - SST y 1 - FFT

de *A. tequilana*. Se realizó un análisis cualitativo del patrón de expresión de estos genes en respuesta a los diferentes tratamientos examinados una vez confirmada su corrección. Estudios previos realizados con *Agave tequilana* por Gómez 2015 tienen una diferencia significativa en la cantidad de genes expresados, ya que el oligo utilizado en la síntesis de la primera hebra fue oligo dT, a diferencia de este proyecto que se utilizó el oligo Random Hexamer, teniendo como resultado una menor cantidad de genes expresados de 1-FFT Y 1-TTF, pero con la cantidad necesaria para comparación y diferenciación de los tratamientos utilizados en este proyecto.

Los resultados globales obtenidos en este proyecto de *A. tequilana* demostraron que, dependientemente de los tratamientos, el nivel de expresión del gen 1-FFT y 1-SST tuvo una tendencia a ser mucho mayor en tallos que en el tratamiento de AS, mientras que el nivel de expresión del gen 1-SST y 1-FFT tendió a ser menor o casi nula en hojas, De acuerdo con los resultados reportados por Gómez (2015) los resultados del tratamiento del AS fueron los esperados. A diferencia del tratamiento con BTH. Que la mayor expresión tanto de 1-FFT y 1-SST se obtuvo en las hojas y en los tallos fue mucho menos o casi nula en hojas. Teniendo relación con los resultados anteriores de la acumulación de fructanos en el tallo y hoja.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que el mejor tratamiento para la acumulación de fructanos en los tallos fueron los agaves que fueron tratados con ácido salicílico ya que hubo mayor acumulación de carbohidratos, proteínas, actividad de la peroxidasa y por lo tanto mayor expresión de genes respecto al control. A diferencia de las plantas que se obtuvieron mayor a acumulación de estas variables en las hojas. Esto debe a las diferencias estructurales en los fructanos de agave son más cuantitativas que cualitativas. La concentración de este carbohidrato y aquellos relacionados con su metabolismo (Sac, Fru, Glc) presentaron una correlación con las condiciones climáticas donde crecieron las plantas. Este hecho sugiere que la presencia, diversidad y/o metabolismo de los fructanos en estas especies, puede contribuir a una mejor tolerancia a estrés abiótico, especialmente a condiciones de sequía, donde por lo general se desarrollan.

Se obtuvo un RNA total de buena calidad y cantidad mediante la técnica "TRIZOL Reagent" con una concentración aceptable de 0.250 mg/ $\mu$ L para ser usado en la extracción de mRNA. Se obtuvo mRNA a partir de RNAtotal obteniéndose también de muy buena calidad. Se obtuvo el templado cDNA de buena calidad a partir de 0.5  $\mu$ g de mRNA mediante la técnica de SuperScript II Reverse Transcriptase con una concentración promedio de 138.51 ng/  $\mu$ L, siendo buena cantidad para ser usado en la amplificación.

Las recomendaciones que se deben tener durante el proceso de este proyecto es tener siempre las muestras a 4 °C para evitar la degradación y alteración de los resultados obtenidos.

Comentado [VR3]:

## **COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS**

- Trabajo en equipo.
- Experiencia de trabajar en un proyecto.
- Manejo de equipos nuevos.
- Manejo de nuevas herramientas de búsqueda de información.
- Interpretación de resultados.
- Análisis para encontrar soluciones de problemas reales en un proyecto.
- Análisis de protocolos tanto de la interpretación como de la modificación de acuerdo a las condiciones del laboratorio de trabajo.

## ANEXOS

Anexos. Curvas de calibración.

Anexo 1. Curvas de calibración del método de DNS para determinación de azúcares reductores.

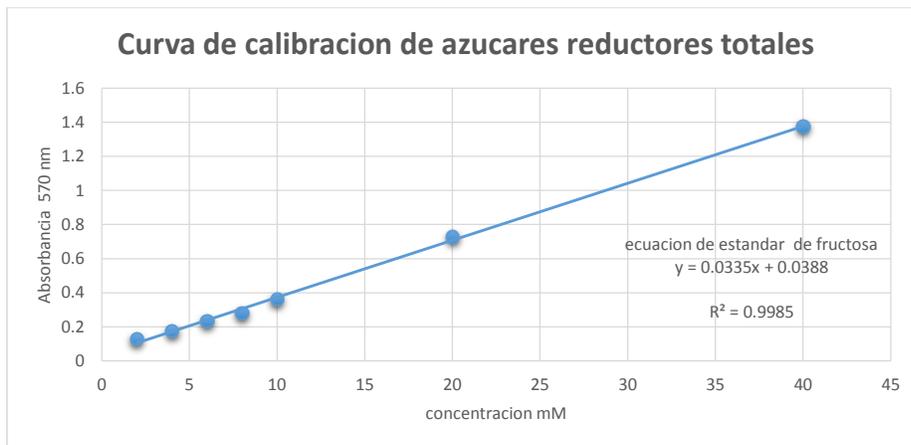


Figura 4. Curva de calibración de azúcares reductores por el método del 3,5 ácido -dinitrosalicílico.

Anexo 2. Curva de calibración del método de Bradford para la determinación de proteínas totales.

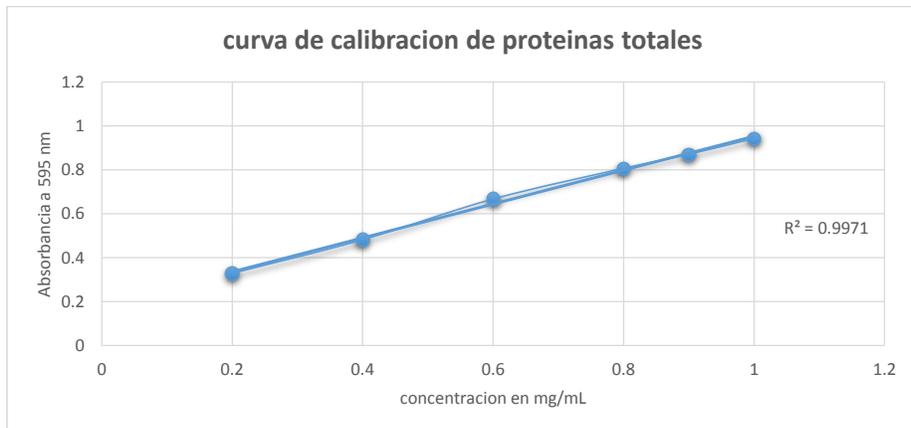


Figura 5. Curva de calibración de proteínas totales por el método de Bradford.

}

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES.

- García-Mendoza, A. J., 2004. Agaváceas. En: A. J. García –Mendoza, M. J. Ordóñez y M. Briones (eds). Biodiversidad de Oaxaca. Universidad Autónoma de Oaxaca. Instituto de Biología. UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund. México. pp 159-169.
- Mancilla-Margalli, N.A.; López, M.G. 2006 Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. J Agric. Food Chem. 54:7832-7839.
- Granados S.D. 1981. "Etnobotánica de los agaves de las zonas áridas y semiáridas de México". Simposio Internacional sobre problemas y perspectivas de la biología y aprovechamiento integral del henequén y otros agaves. CICY- CONACYT. Yucatán, México.
- Aguilar Romo Miguel El Director General de Normas 2005. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005, Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. México, D.F., a noviembre 30. Consejo Regulador del Tequila, 19 de Marzo 2004. [http://www.crt.org.mx/esp/teq\\_elaboracion2.asp](http://www.crt.org.mx/esp/teq_elaboracion2.asp)
- García-Mendoza, A. 2000. Revisión Taxonómica de las especies arborescentes de Furcraea (Agavaceae) en México y Guatemala. Boletín de la Sociedad Botánica de México 66: 113-129.
- Gentry, H.S. En: Agaves of continental america. University of Arizona, Ed. 2nd ed. 1998.
- Valenzuela Z.A.G. 1997. El agave tequilero su cultivo e industria. Litteris editores. México. 205p.
- Irish, M.; Irish, G. Agaves, Yuccas, and related plants. Ed. Timber Press, Portland, Oregon, 2000.
- Pimienta-Barrios, E.; Robles-Murguía, C.; Nobel, P.S. 2001. Net CO2 uptake for Agave tequilana in a warm and a temperature environment. Biotropica 33:312-318.
- Pimienta-Barrios, E.; Nobel, P.S.; Zañudo-Hernández, J.; García, J. Ecofisiología del agave azul, Agave tequilana Weber. En: IV Simposio internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae. Los Agaves de importancia económica en México. Resumen de presentaciones. CICY, Mérida, Yuc. 2004.

- Suzuki, M. History of fructan research: Rose to Edelman. En Science and technology of fructans; Suzuki, M.; Chatterton, N.J., Eds.; CRC Press, Florida; 1993; 21-39.
- Van den Ende, W.; Van Laere, A. 1993. Purification and properties of an invertase with
- Sucrose:sucrose fructosyltransferase (1-SST) activity on the roots of *Cichorium intybus* L. *New Phytol.* 123: 31-37.
- Van den Ende, W.; Van Wouterghem, D.; Dewill, E.; Verhaert, P.; De Loof A.; Van Laere, A. 1996b. Purification and characterization of 1-SST, the key enzyme initiating fructan biosynthesis in young chicory roots (*Cichorium intybus*). *Physiol. Plant.* 98:455-466.
- De Coninck, B.; Le Roy, K.; Francis, I.; Clerens, S.; Vergauwen, R.; Halliday, A.M.; Smith, S.M.; Van Laere, A.; Van den Ende, W. 2005. *Arabidopsis AtCWInv3* and *6* are not invertases but are fructan exohydrolases (FEH) with different substrates specificities. *Plant, Cell Environ.* 28:432-443.
- Hendry, G.A.F; Wallace R.K. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. En Science and technology of fructans; Suzuki, M.; Chatterton, N.J., Eds.; CRC Press, Florida; 1993;21-39.
- Koops, A.J.; Jonker. H.H. 1996. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tuber of *Helianthus tuberosus* Colombia. 1996. *Plant Physiol.* 110:1167-1175.
- Nobel, P.S.; Quero, E. 1986. Environmental productivity indices for a chihuahuan desert CAM plant, *Agave lechuguilla*. *Ecology* 67:1-11.
- López, M.G.; Mancilla-Margalli, N.A.; Mendoza-Díaz, G. 2003. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var azul. *J. Agric. Food Chem.* 51:7835-7840.
- Hellwege, EM.; Gritscher, D.; Willmitzer, L.; Heyer, A, G. 1998. Differences in chain length distribution of inulin from *cynara scolymus* and *helianthus tuberosus* are reflected in a transient plant expression system using their respective 1-FFT cDNAs. *FEBS Lett.* 427:25-28.
- Marx, S.P.; Nösberger, J.; Frehner, M. 1997. Seasonal variation of fructan-b-fructosidase (FEH) and characterization of a b(2-1) linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *New Phytol.* 135:267-272.
- McCleary, B.V.; Murphy, A.; Mugford, D.C. 2000. Measurement of total fructan in foods by enzymatic/spectrophotometric method: collaborative study. *J. AOAC* 83:356-364.
- McCleary, B.V.; Monaghan, D.A. 2002. Measurement of resistant starch J. *AOAC* 85:665-675.
- Meijer, W.J.M.; Mathijssen, E.W.J.M.; Borm, G.E.L. 1993. Crop characteristics and inulin production of Jerusalem artichoke and chicory. En:

Science and technology of fructans; Suzuki, M.; Chatterton, N.J., Eds.; CRC Press, Florida; 1993; 29-38.

- Menéndez, C.; Hernández, L.; Selman, G.; Mendoza, M.F.; Hevia, P.; Sotolongo, M.; Arrieta, J.G. 2002. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an exolevanase gene from the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4. *Curr. Microbiol.* 45:5-12.
- Monti, A.; Amaducci, M.A.; Pritoni, G.; Venturi, G. 2005. Growth, fructan yield and quality of chicory (*Cichorium intybus* L.) as related to photosynthetic capacity, harvest time and water regime. *J. Exp. Bot.* 56:1389-1395.
- Morvan-Bertrand, A.; Boucaud, J.; Prud'homme, M.P. 1999. Influence of initial levels of carbohydrates, fructans, nitrogen, and soluble proteins on regrowth of *Lolium perenne* L. cv. Bravo following defoliation. *J. Exp. Bot.* 50:1817-1826.
- Morvan-Bertrand, A.; Boucaud, J.; Le Saos, J.; Prud'homme, M.P. 2001. Roles of the fructans from leaf sheaths and from elongating leaf bases in the regrowth following defoliation of *Lolium perenne* L. *Planta* 213:109-120.
- Müller, J.; Aeschbacher, R.A.; Sprenger, N.; Boller, T.; Wiemken, A. 2000. Disaccharidemediated regulation of sucrose:fructan-6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant Physiol.* 123:265-273.