



**Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN MÉTODO POR
PCR DIGITAL EN GOTAS PARA LA CUANTIFICACIÓN
DEL TRANSPORTADOR DE FOSFATO 1 EN PLANTAS
DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) CON
DEFICIENCIA DE FÓSFORO**

Por:

Wendy López Romero

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS
PARA ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Culiacán, Sinaloa.

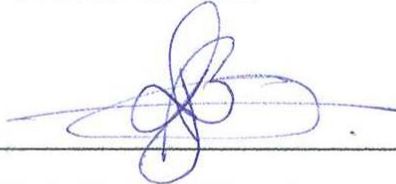
Diciembre del 2016

APROBACIÓN

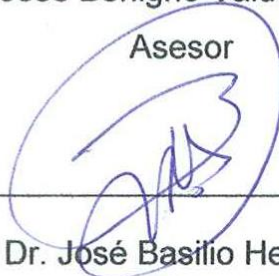
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Wendy López Romero, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Josefina León Félix
Director de Tesis



Dr. José Benigno Valdez Torres
Asesor



Dr. José Basilio Heredia
Asesor



Dr. Tomás Osuna Enciso
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto a través de una beca de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Unidad Culiacán, por la posibilidad de formar parte de su cuerpo estudiantil.

A la Dra. Josefina León Félix, por adoptarme en su grupo de estudiantes, por la confianza y el apoyo brindados. Agradezco su disponibilidad, paciencia, tiempo, conocimientos transmitidos y por creer en mi capacidad en todo momento.

Al Instituto Lightbourn, por el apoyo brindado para el desarrollo del material vegetal empleado en éste proyecto.

Al Dr. Benigno Valdéz Torres, Dr. Basilio Heredia y Dr. Tomás Osuna Enciso, por su apoyo, tiempo y dedicación para construir y mejorar este trabajo de tesis.

A mis profesores de maestría Dra. Karina Ramírez, Dra. Josefina León, Dr. Benigno Valdéz, Dra. Muy Rangel, Dra. Adriana Sañudo, Dr. Raúl Allende, Dra. Nohelia Castro, Dr. Raymundo García, Dr. Juan Ramón Ibarra, Dr. Cristóbal Chaidez y MC Armando Carrillo, por su contribución en mi formación académica.

Al QFB Héctor Carrillo Yáñez, por su apoyo y disposición para ayudar en todo momento dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio Dr. Luis Amarillas, MC Talia Martínez, MC Rubén León e IB Daniel Ibarra, por haberme brindado consejos técnicos y personales, por su colaboración directa o indirecta en este proyecto, y sobre todo,

por su disponibilidad y entusiasmo que me mantuvieron siempre positiva a pesar de los momentos desafiantes.

A mis compañeros de maestría, Grecia, Jaime, Suhail, Flor, Gabriela, Nancy y María; agradezco su amistad, tiempo, momentos de estudio y de esparcimiento, dentro y fuera del centro.

A la MC Rosabel Vélez de la Rocha, por su apoyo técnico y personal brindado en todo momento, sobre todo en tiempos difíciles.

A mis amistades de trinchera, MC Erick Gutiérrez, MC Nayely Leyva, MC Karla Báez, MC Gabriela Olivo, MC Mirian González y MC Nancy Varela, quienes despertaron en mí la determinación y fuerzas necesarias para adentrarme en la investigación a pesar de las circunstancias y adversidades. Me hicieron ver que a pesar de que los ensayos no resulten favorables en todo momento, siempre resultan en conocimiento adquirido, y que la mayoría de los descubrimientos que han marcado una pauta en la historia, han sido meros accidentes. Así que no olviden continuar experimentando hasta conseguir “ese” accidente, no pierdan la inspiración durante la búsqueda y sobre todo, no dejen de lado sus sueños y fantasías, porque son el verdadero impulso que nos mantiene en la búsqueda de la verdad

DEDICATORIA

Con humildad para mi familia: Mercedes, Hipólito, Faviel y Edel, por su apoyo y amor incondicional siempre. Les agradezco de todo corazón.

*A Omar, por darme fuerzas para seguir abriéndome paso a culminar mis metas.
Contigo todo.*

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE CUADROS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Nutrición Vegetal y Absorción de Nutrientes.....	4
Métodos de Determinación de Deficiencia de Nutrientes.....	8
Análisis de Pigmentos.....	8
Análisis de Savia.....	9
Análisis Físicoquímico de Tejido Vegetal	10
Función Biológica y Mecanismos Moleculares del Transporte de Fósforo	12
Genes Candidatos como Indicadores de Deficiencia de Fósforo en Tomate	14
Fundamentos de la Técnica de PCR	23
Fundamentos de la PCR Digital.....	26
Optimización y Validación de un Método Analítico	28
Especificidad	30
Rango Dinámico.....	30
Precisión	30

Exactitud	31
Límite de Detección (LOD).....	31
Límite de Cuantificación (LOQ)	31
Aplicabilidad	32
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) como Modelo de Estudio	32
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	37
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	38
JUSTIFICACIÓN.....	39
OBJETIVOS.....	41
Objetivo General.....	41
Objetivos Específicos	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
Material Experimental	42
Tejido Vegetal	42
Macerado del Tejido Vegetal.....	44
Extracción de ARN.....	44
Cuantificación e Integridad de ARN	45
Síntesis de ADN Complementario.....	45
Amplificación del Gen Asociado a la Deficiencia de P	46
PCR Punto Final y Secuenciación	46
Diseño de Iniciadores y Sonda de Hibridación.....	48
Cuantificación del Gen <i>LePT1</i> mediante PCR Digital en Gotas	49
Optimización de las Condiciones de Amplificación en PCR Digital en Gotas	49

Análisis Estadístico de los Datos de Optimización	51
Validación de las Características de Desempeño del Método	52
Rango Dinámico.....	52
Límite de Detección	52
Límite de Cuantificación	53
Selectividad.....	53
Aplicabilidad	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
Diseño de Iniciadores y Sonda de Hibridación para la Amplificación en PCR Digital en Gotas del Gen Indicador de Deficiencia de P	55
Optimización de las Condiciones de Amplificación en PCR Digital en Gotas del Gen Indicador de Deficiencia de P	57
Evaluación del Desempeño Método Propuesto	60
Especificidad Teórica y Experimental.....	60
Limite de Detección (LOD)	62
Límite de Cuantificación (LOQ)	63
Rango Dinámico.....	63
Aplicabilidad	64
CONCLUSIONES	67
REFERENCIAS.....	68
ANEXOS	76
Anexo 1. Lista de Abreviaturas	76
Anexo 2. Preparación de Soluciones para la Extracción de ARN	78
Anexo 3. Preparación de Soluciones Amortiguadoras y Gel de Agarosa para Electroforesis de ARN y ADN	79

Anexo 4. Descripción de kits..... 80

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Corte transversal de raíz.	7
Figura 2. Principales transportadores de Pi en la célula vegetal.	14
Figura 3. Expresión de TPSI1 en hoja y raíz de tomate con deficiencia de Pi.....	16
Figura 4. Expresión de LePT1 y LePT2 en raíz de tomate con deficiencia de Pi. 17	
Figura 5. Perfil de expresión de la familia de genes Pht1 en distintos tejidos de tomate con deficiencia de Pi.....	18
Figura 6. Expresión de LePS2 en hoja y raíz de tomate con deficiencia de P.	20
<i>Figura 7. Perfil de expresión de TFT6 y TFT7 en hoja y raíz de tomate con deficiencia de Pi.</i>	<i>23</i>
Figura 8. Flujo de trabajo para PCR digital en gotas.	27
Figura 9. Distribución de los bloques para cada nutrición en el invernadero.....	44
Figura 10. Productos de amplificación de LePT1 en hoja de tomate con deficiencia de Pi mediante PCR punto final.	56
Figura 11. Gráficos de superficie de respuesta para las variables resolución y variabilidad.	59

Figura 12. Gráfico de función de deseabilidad para la optimización de la amplificación de LePT1 en PCR digital en gotas.....	60
Figura 13. Rango dinámico evaluado para la cuantificación de LePT1 por PCR digital en gotas.	64
Figura 14. Expresión de LePT1 en hoja, tallo y raíz de tomate con deficiencia de P a distintos intervalos de tiempo.	65

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Macro y micronutrientes esenciales para los cultivos.	5
Cuadro 2. Producción de tomate en México y Sinaloa registrada en el año 2014.	33
Cuadro 3. Soluciones nutritivas empleadas para la producción de plantas de tomate.	43
Cuadro 4. Diseño central compuesto de tres factores para la optimización de la amplificación de LePT1 en PCR digital en gotas.....	50
Cuadro 5. Resultados del análisis de regresión y ANOVA para la optimización de la amplificación de LePT1 en PCR digital en gotas.....	58
Cuadro 6. Secuencias homólogas a LePT1 de otros cultivos.....	61
Cuadro 7. Resultados de especificidad para la detección de deficiencia de fósforo mediante la cuantificación de copias de LePT1 en PCR digital en gotas.	62

RESUMEN

El fósforo (P) es un macronutriente involucrado en procesos biológicos y metabólicos (respiración, división celular, síntesis de adenosín trifosfato, fotosíntesis, transducción de señales celulares, etc.) de las plantas. Su deficiencia, activa cascadas de señalización celular que modifican la expresión génica; así como la producción de enzimas, proteínas y metabolitos que inducen cambios fisiológicos como el retraso de la madurez, defectos en la coloración, crecimiento reducido del tallo, incrementa el desarrollo de raíces terciarias, entre otros. Actualmente, para el diagnóstico de la nutrición de los cultivos se emplean análisis fisicoquímicos; sin embargo, deben ser complementados con el análisis de suelo para obtener un panorama integral de la movilización de los nutrientes del suelo hacia la planta. Previamente se ha correlacionado la expresión del gen transportador de fosfato 1 (*LePT1*) en tomate, a la deficiencia de P, constituyendo una alternativa para el uso de éste como indicador del estado metabólico de las plantas y marcador molecular de deficiencia de P. Por lo que en el presente estudio, se desarrolló y evaluó una metodología para la cuantificación absoluta de copias de *LePT1* mediante PCR digital en gotas, en plantas de tomate con deficiencia inducida de P, como base para generar una metodología molecular de diagnóstico complementaria, que permita adecuar la nutrición al metabolismo celular de la planta. Para ello, primeramente se amplificó por PCR punto final con ADNc de hoja de tomate (var. San Marzano) como molde, un fragmento de aproximadamente 146 pb de *LePT1*. Con la secuencia del mismo, se diseñaron iniciadores y sonda de hibridación para su cuantificación en PCR digital en gotas. Se optimizaron las condiciones de amplificación en PCR digital en gotas, mediante un diseño central compuesto de tres factores (temperatura de alineamiento, concentración de iniciadores y concentración de sonda de hibridación) y dos variables de respuesta (resolución y variabilidad,). Las condiciones óptimas de amplificación de *LePT1* fueron: 59.77 °C de temperatura de alineamiento, 782.16 nM de iniciadores y 269.53 nM de sonda. Por último, se evaluaron las características de desempeño del método: obteniendo como límite de

cuantificación (LOQ) y de detección (LOD) 13 y 2 copias de *LePT1*, respectivamente. El rango dinámico se definió entre 2890 y 0.09 copias de *LePT1*. Se demostró la selectividad del método en la detección de la sobreexpresión del gen *LePT1* en deficiencia de P. El método desarrollado es aplicable en hoja, tallo y raíz de tomate

Palabras clave: Expresión de *LePT1*, deficiencia de fósforo, PCR digital en gotas, metodología de superficie de respuesta, tomate.

ABSTRACT

The phosphorus (P) it is a macronutrient involved in biological and metabolic processes (breathing and cellular division, adenosine triphosphate synthesis, photosynthesis, cell signal transduction, etc.) in plants. Its deficiency, trigger cellular signaling cascades that modify genetic expression; as well as the production of enzymes, proteins and secondary metabolites. Altogether lead to physiological changes like delay of maturity, coloration defects, roots and leaves necrosis, among others. Nowadays, physicochemical analysis are used for the diagnosis of crop nutrition; however, they must be complemented with soil analysis to have an integral view about the nutrient mobilization from soil to the plant. Previously, the expression of the phosphate transporter 1 (*LePT1*) has been correlated to Pi deficiency in tomato. The aim of this study was to develop and evaluate a methodology for the absolute quantification of copies of *LePT1* in digital droplet PCR, in P deficiency tomato plants, as a basis for a complementary molecular diagnosis, which allows to adequate the nutrition to the plant cellular metabolism. A fragment of 146 bp was in PCR with cDNA of tomato (v. San Marzano). With the product sequence, primers and hybridization probes were design to the quantification of *LePT1* in droplet digital PCR. *LePT1* amplification conditions in digital droplet PCR were optimized by a three factor composite central design (alignment temperature, primers concentration and probe concentration) with two response variables (resolution and variability). The best amplification conditions for *LePT1*, which generate a higher resolution between positive and negative droplets and less variability of copies, were: 59.77 °C of alignment temperature, 782.16 nM of primers and 269.53 nM of probe. Performance characteristics of the method were evaluated: 13 and 2 copies of *LePT1* were declared as limit of quantification (LOQ) and detection (LOD), respectively. The dynamic range was defined between 2890 and 0.09 copies of. The selectivity of

the method was demonstrated with the expression of *LePT1* only in Pi deficiency. The method is applicable in leaves, stem and roots of tomato.

Keywords: *LePT1* expression, macronutrients deficiency, droplet digital PCR, response surface methodology, tomato

INTRODUCCIÓN

Los macronutrientes son definidos como los elementos químicos consumidos en grandes cantidades por las plantas. Los macronutrientes primarios son carbono, hidrógeno y oxígeno, los cuales se encuentran presentes en el medio ambiente en forma de agua y dióxido de carbono. El nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio y azufre son definidos como secundarios y también son requeridos en cantidades relativamente grandes. Usualmente son fuentes de componentes inorgánicos (p. ej. dióxido de carbono, agua, nitrato, fosfato, sulfato) y orgánicos (p. ej. carbohidratos, lípidos y proteínas). Tanto macro como micronutrientes son suministrados a las plantas en concentraciones adecuadas al tipo de cultivo y a las necesidades metabólicas durante su desarrollo.

La deficiencia de uno o más macronutrientes activa procesos metabólicos que modifican la regulación de la expresión génica, síntesis de proteínas y metabolitos secundarios (hormonas y pigmentos), que en conjunto desencadenan el desarrollo de síntomas de deficiencia en los tejidos vegetales como: zonas violetas o rojizas por la producción de antocianinas en la deficiencia de fósforo, clorosis en hoja y retraso de la madurez y crecimiento en la deficiencia de potasio, y pudrición apical del fruto en deficiencia de calcio, entre otros. El inicio de la respuesta celular a la deficiencia de nutrientes comienza cuando las células radiculares censan una concentración baja de éstos, mediante diversos receptores de membrana, lo cual estimula de manera inmediata la expresión de genes específicos, que codifican canales iónicos de alta afinidad, con el fin de incrementar el área de absorción de la raíz (Pinto y Ferreira, 2015). Cuando la deficiencia se mantiene por horas o incluso días, la activación de la respuesta a la deficiencia genera los síntomas de deficiencia mencionados en líneas anteriores, lo cual repercute en la producción de los cultivos y, por ende, se generan pérdidas económicas (Tjalling, 2006).

En la actualidad, se emplean análisis fisicoquímicos para el monitoreo de la nutrición de los cultivos, que consisten en la cuantificación de los minerales presentes en los tejidos vegetales (como hoja y peciolo) a partir de su fracción soluble extractable por digestión ácida (Rodríguez y Rodríguez, 2000). A pesar de ser la principal herramienta de control de la nutrición en el ámbito agrícola, posee diversas limitantes de uso e interpretación. Debido a la escasez de estudios publicados sobre los valores críticos de todos los minerales para peciolo y raíz de diversos cultivos, sólo establece si la concentración absorbida por la planta se encuentra arriba o por debajo de la concentración recomendada, por lo que resulta difícil adecuar la nutrición ya que sólo indica la cantidad del elemento que ha sido absorbido por la planta; además requiere el análisis de suelo como complemento para generar un panorama más acertado. Es necesario complementar el análisis vegetal con el análisis de suelo para conocer los índices de disponibilidad de los nutrientes en el mismo con el fin de tratar de optimizar el nivel de todos los nutrientes, tanto en el suelo como en la planta. Para la adecuada interpretación de análisis de suelo es preciso contar con calibraciones que se obtienen a través de la ejecución de costosos y complejos experimentos de campo (escasamente realizados en México), además de disponer de redes eficientes de laboratorios químicos confiables, y finalmente un costo accesible (Sumner, 2000).

En estudios moleculares se ha relacionado la expresión del gen *LePT1*, (transportador de fosfato 1), que codifica una proteína que forma canales de alta afinidad de P, en plantas de tomate con deficiencia inducida de P. Lo cual marca la pauta para el uso de éste como indicador del estado metabólico de dicha planta y marcador molecular de deficiencia de P. Para lo anterior se requiere el uso de técnicas moleculares especializadas que permitan la detección y cuantificación de secuencias de nucleótidos blanco (fragmento de un gen), como es el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, en inglés). Recientemente se ha desarrollado la modalidad digital de esta herramienta, que posee mayor precisión y sensibilidad que sus anteriores (punto final y tiempo real), además permite la

cuantificación absoluta de una secuencia blanco sin la necesidad de emplear materiales de referencia.

El propósito general del presente estudio consistió en el desarrollo y evaluación de una metodología, basada en la cuantificación de copias del gen *LePT1* mediante PCR digital en gotas, para medir la expresión del mismo en plantas de tomate con deficiencia inducida de P.

ANTECEDENTES

Nutrición Vegetal y Absorción de Nutrientes

La nutrición vegetal consiste en el adecuado suministro de los minerales esenciales para los cultivos, mediante sistemas integrados basados en la aplicación de soluciones nutritivas y/o fertilizantes (orgánicos e inorgánicos) en suelo, sustrato inerte (hidroponia) o directamente en las hojas, acorde a las necesidades fisiológicas de cada una en sus distintas etapas fenológicas, con el fin de intensificar su producción y calidad de fruto (Etchevers, 2000).

La clasificación de los nutrientes se basa en la concentración relativa del mismo en la planta (Cuadro 1), los macronutrientes se encuentran en concentraciones superiores al 0.1 % en materia seca. Los elementos mayoritarios de este grupo son carbono, hidrógeno y oxígeno que son aprovechados por las plantas del agua y la atmósfera. Dentro de éste grupo también se encuentran nitrógeno, fósforo y potasio denominados como macronutrientes primarios, y calcio, magnesio y azufre como macronutrientes secundarios. Por contraparte, los micronutrientes se presentan en concentraciones menores al 0.01 % de materia seca y son: cloro, hierro, boro, manganeso, zinc, cobre, níquel y molibdeno. Tanto macro como micro nutrientes son elementos indispensables para la planta, ya que participan en diversos procesos metabólicos como respiración, fotosíntesis, síntesis de aminoácidos, vitaminas, proteínas y carbohidratos, entre otros (FAO, 1999).

Cuadro 1. Macro y micronutrientes esenciales para los cultivos.

Elemento	Forma de asimilación	Concentración en materia seca ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Función
<i>Macronutrientes</i>			
Carbono (C)	CO_2	450,000	Componente estructural de moléculas orgánicas.
Oxígeno (O)	O_2 , C_2O	450,000	Componente estructural de moléculas orgánicas.
Hidrógeno (H)	H_2O	6,000	Componente estructural de moléculas orgánicas.
Nitrógeno (N)	NO_3^- , NH_4^+	15,000	Componente estructural de nucleótidos y aminoácidos.
Potasio (K)	K^+	10,000	Regula la apertura y cierre de estomas.
Calcio (Ca)	Ca_2^+	5,000	Componente estructural de la pared celular y regula la permeabilidad de membranas.
Fósforo (P)	H_2PO_4^-	2,000	Componente estructural de nucleótidos y lípidos de membranas.
Magnesio (Mg)	Mg_2^+	2,000	Componente estructural de la clorofila.
Azufre (S)	SO_4^{2-}	1,000	Componente estructural de algunos aminoácidos.
<i>Micronutrientes</i>			
Cloro (Cl)	Cl^-	100	Protege a los fotosistemas de componentes oxidantes producidos durante la fotólisis.
Hierro (Fe)	Fe^{2+} , Fe^{3+}	100	Estructural de transportadores de electrones y sustrato de enzimas en la síntesis de proteínas.
Manganeso (Mn)	Mn^{2+}	50	Sustrato de enzimas catabólicas, necesario para la liberación de oxígeno en la fotosíntesis.
Boro (B)	BO_3^{3-}	20	Forma un complejo con los azúcares para facilitar su transporte por la planta.
Zinc (Zn)	Zn^{2+}	20	Componente y sustrato de enzimas.
Cobre (Cu)	Cu^+ , Cu^{2+}	6	Componente estructural de algunos transportadores de electrones y enzimas.
Molibdeno (Mo)	MoO_4^{2-}	0.1	Participa en la asimilación de nitratos.
Níquel (Ni)	Ni^{+2}	0.005	Componente esencial de enzimas, como la ureasa.

Listado de la representación química y forma iónica en la cual los nutrientes son absorbidos por las plantas. Concentración a la que se encuentran presentes en los tejidos vegetales y función que desempeñan en el metabolismo celular. Modificado de Buchanan et al., 2002; Taiz y Zeiger, 2010.

Los nutrientes son absorbidos en las células de raíz por vías especializadas como bombas de protones (transporte activo) o canales iónicos (transporte pasivo) situados en la membrana plasmática de ésta. El transporte activo requiere mayor gasto de energía (a diferencia del transporte pasivo), consta de proteínas embebidas en la membrana plasmática principalmente en las células de raíz (epidermis) que conforman canales iónicos, encargados de movilizar los nutrientes mediante la diferencia de concentraciones (gradiente) entre el interior y el exterior de la célula, es considerada la ruta metabólica de respuesta rápida para el aprovechamiento de nutrientes (Figura 1) (Buchanan et al., 2002; Taiz y Zeiger, 2010).

Una vez en el citoplasma, los nutrientes son movilizados hacia las células de corteza (parénquima cortical) por medio de su pared celular y plasmodesmos (canales especializados no pasivos que atraviesan la membrana celular y la pared celular de las células de corteza). Posteriormente continúan su desplazamiento a través de las células que componen la endodermis y el peciolo hasta llegar al xilema, donde se genera la mezcla de minerales y agua absorbidos, denominada savia bruta. La savia bruta hace por todo el xilema del tallo de la planta hasta llegar a las hojas donde es transferida al apoplasto de las células de hoja cercanas al xilema, para su distribución y absorción por medio de las células parenquimales de éste tejido. El excedente de nutrientes es movilizado hacia el floema donde será distribuido a los frutos y demás tejidos vegetales (Figura 1) (Taiz y Zeiger, 2010).

La adición de nutrientes al suelo en concentraciones excedentes a las requeridas por la planta, produce la acumulación de sales (Na, Cl, SO₄, Ca, entre otras) que generan un desbalance entre cargas de iones y cationes donde se favorece la absorción de aquellos con mayor concentración y obstaculiza el aprovechamiento del resto, el suelo pierde fertilidad, por lo que el desarrollo del cultivo reduce y se compromete la simbiosis de las raíces con hongos benéficos (micorriza), dificultando la absorción de algunos elementos como fósforo, potasio, nitrógeno y calcio (Pinto y Ferreira, 2015).

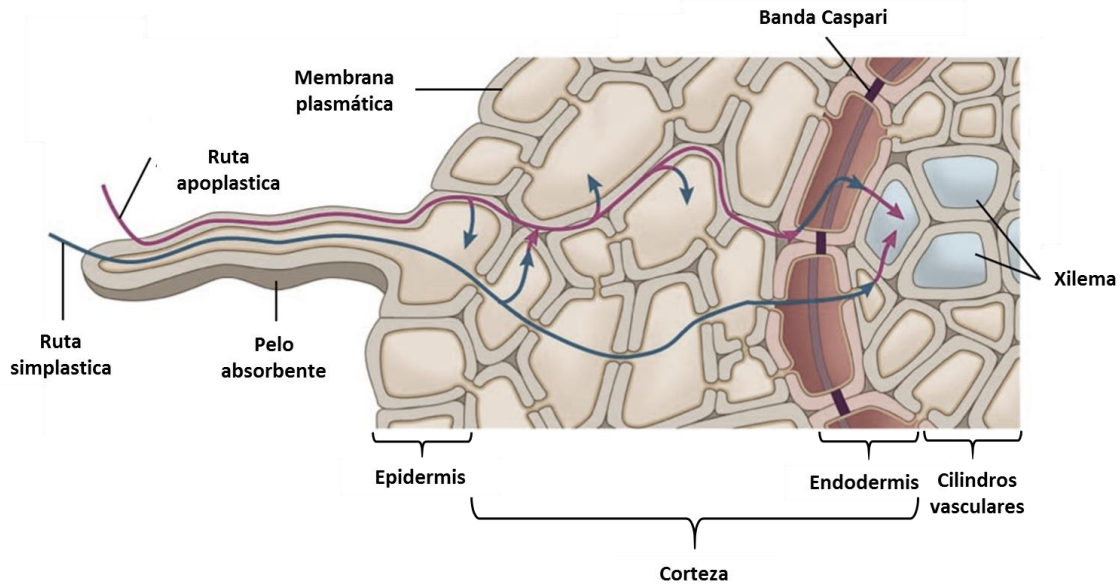


Figura 1. Corte transversal de raíz.

Flujo celular (flechas) de la absorción y transporte de agua y sales minerales desde la membrana celular de raíz, hasta el xilema. Figura modificada de Taiz y Zeiger, 2010.

Por contraparte, la deficiencia de uno o más nutrientes también representa un desafío para la fisiología de la planta debido a que se produce un desbalance en el funcionamiento óptimo de su metabolismo. Mientras la deficiencia prevalezca, la planta activa cascadas de señalización celular que generan cambios en la expresión génica, la actividad enzimática y la producción de metabolitos secundarios que en conjunto, producen síntomas de daño tanto en los diferentes tejidos como en el fruto. Para evitar la aparición de síntomas de deficiencia y poder evaluar la efectividad de las soluciones nutritivas aplicadas en campo, así como el aprovechamiento de éstas por las plantas, se emplean diversos métodos de monitoreo para cuantificar la concentración de los nutrientes presentes en tejidos como hoja y peciolo. Entre los cuales, se encuentran el análisis de pigmentos, el análisis de savia y el análisis fisicoquímico de tejido vegetal (Pinto y Ferreira, 2015).

Métodos de Determinación de Deficiencia de Nutrientes en Cultivos

El diagnóstico en campo, es el primer paso para detectar efectos físicos de la deficiencia de nutrientes de un cultivo durante todas sus etapas de desarrollo; consiste en la inspección visual de los tejidos vegetales y de los factores que lo influyen, tales como: suelo (profundidad, textura, estructura, capacidad de retención de agua, presencia de sales, drenaje interno, capacidad para suministrar nutrientes, etc.), la fisiología de la planta (variedad, desempeño, vigor, adaptación, estado nutrimental, abastecimiento de agua, etc.), el clima (temperatura, radiación, lluvias, heladas, etc.), el manejo del agua (cantidad, calidad, salinidad, sistema de riego, drenaje, etc.), el manejo sanitario (control de plagas y enfermedades) y el manejo nutrimental (deficiencias, toxicidades y desbalances) (Etchevers, 2000). Un segundo paso, consiste en analizar muestras representativas de los distintos tejidos de plantas con síntomas de deficiencia localizada. Para ello, suelen emplearse instrumentos de campo que permiten evaluar la concentración de ciertos pigmentos como la clorofila en hoja o efectuar análisis de laboratorio, en muestras específicas como savia y tejido vegetal (p. ej. hoja, peciolo, tallo y fruto). El objetivo general de los métodos para monitorear la nutrición de los cultivos es conocer la concentración de macro y micronutrientes asimilados por la planta y evaluar la efectividad de la nutrición aplicada. Suelen efectuarse de manera periódica durante todo el ciclo del cultivo desde el inicio del crecimiento, hasta la madurez de la planta (FAO, 1999; Kalaji et al., 2014).

Análisis de Pigmentos

El análisis de clorofila en campo se implementó a partir del desarrollo del medidor de clorofila SPAD (Soil Plant Analysis Development, siglas en inglés) que basa su principio en la refracción de luz, de la cual, parte es absorbida por la clorofila. La luz reflejada entra en contacto con la celda detectora del SPAD y es convertida en una señal eléctrica. La cantidad de luz captada por la celda es inversamente proporcional a la cantidad de luz absorbida por la clorofila, la señal es procesada y

la absorbancia se cuantifica en valores que van de 0 a 199 (Rodríguez et al., 1998). Esta prueba rápida proporciona un panorama limitado ya que sólo asocia los niveles de clorofila con el porcentaje de N presente en la hoja de la planta (Kalaji et al., 2014). Para adecuar la nutrición a un cultivo con síntomas de deficiencias se requiere conocer las concentraciones del resto de los nutrientes absorbidos por la planta para dicho fin. Es crucial emplear métodos de análisis más completos que permitan conocer el estado de estrés de la planta basados en principios metabólicos y fisiológicos, como el análisis de la mezcla pura de nutrientes y agua (savia), que moviliza la planta desde el suelo hasta las hojas por medio del xilema para su aprovechamiento (Cadahía et al., 2009).

Análisis de Savia

Consta de extraer la savia de algún tejido (tallo) o de toda la planta, por su modalidad en campo, permite un resultado rápido de la concentración de macro y micronutrientes en la muestra y da a conocer el panorama metabólico de la planta en un momento determinado de su desarrollo, incluso cuando aún no se presentan síntomas visuales de la deficiencia. Consiste en reacciones colorimétricas que se producen cuando un elemento presente en la savia reacciona con un reactivo específico. El color de la muestra se compara con un patrón previamente preparado y calibrado. Mediante éste análisis se determinan las concentraciones de los iones nitrato (NO_3), K y Ca, así como los grados Brix, el pH y la conductividad eléctrica. La falta de precisión para detectar cambios de color visualmente y la escasez de estudios que permiten relacionar los niveles nutrimentales con los rendimientos y la fertilidad del suelo, fueron algunas de las razones por las que ésta técnica de diagnóstico se convirtiera en obsoleta. Con ello se generó la pauta para el desarrollo de metodologías fisicoquímicas posteriores, basadas en el mismo principio de colorimetría, con la adición de hacer la cuantificación de los nutrientes en espectrofotómetros de UV-VIS (Etchevers, 2000).

Análisis Fisicoquímico de Tejido Vegetal

Es el análisis de monitoreo más completo que permite conocer el estado general de la nutrición del cultivo, básicamente emplea dos metodologías para realizar la extracción de elementos de los compuestos orgánicos: digestión por vía húmeda y digestión por vía seca o cenizas. La primera consiste en digerir el material vegetal con ácido sulfúrico y a partir de ésta, determinar N, P y K total. Cuando la digestión se hace con una mezcla de ácido nítrico y perclórico se pueden determinar el S K, Ca, Mg, Na y micronutrientes (Fe, B, Cu, Mn, Zn y Mo). La digestión por vía seca o calcinación, se utiliza para cuantificar los macronutrientes: K, Mg, Ca, Na y P. La muestra seca y molida se lleva a cenizas mediante altas temperaturas (600 °C) en una mufla y después se disuelven con ácido clorhídrico. Por medio de esta digestión también se pueden analizar algunos elementos volátiles como nitrógeno, boro y azufre (AOAC, 1998; NOM-021-RECNAT-2000, 2002).

La determinación total de los elementos Ca, Mg y micronutrientes (Fe, Cu, Mg, Zn, Br) se hace directamente de la muestra digerida; mientras que, para los macronutrientes N, P y K se pueden analizar tanto el contenido total como el contenido de fracciones solubles (i.e. nitratos, fosfatos no metabolizados y fracción de potasio que no forma compuestos orgánicos en la planta). El contenido de una fracción soluble es un buen estimador de la disponibilidad de nutrientes cuando la planta no sufre periodos de estrés. Las concentraciones de los macronutrientes se expresan como porcentaje del elemento (%) en materia seca, mientras que los micronutrientes en partes por millón (ppm). Cuando el análisis se hace sobre las fracciones solubles de un nutriente los resultados se expresan en (ppm) del elemento correspondiente a la forma analizada (NOM-021-RECNAT-2000, 2002).

La forma de interpretar el análisis fisicoquímico es comparar la concentración de un nutriente determinado en la materia seca de la muestra problema con un valor llamado nivel crítico o concentración crítica para ése nutriente y cultivo, en específico. Este nivel crítico surge de la relación que existe entre la concentración

de nutrientes dentro de la planta y el rendimiento o crecimiento de un cultivo dado. Para establecerlo se hacen ensayos de distintos tratamientos con concentraciones diferentes de un nutriente mientras que el resto de los nutrientes y factores se mantienen en cantidades no limitantes para la planta. Se selecciona un tejido específico de la planta (hoja, por lo general) y se toman muestras a una edad fisiológica determinada; por último, se hace una relación del crecimiento o rendimiento del cultivo con el suministro y concentración del nutriente en la planta. A pesar del constante estudio del valor crítico de los nutrientes en plantas con importancia agrícola, no existe información para todos los cultivos en cada región, ya que este valor crítico es susceptible de modificación por una serie de factores tales como: la composición del suelo y la manera en que la variedad del cultivo responda ante una condición de nutrición deficiente (Sumner, 2000).

Al conocer las concentraciones de cada elemento absorbido por la planta, los ingenieros de campo pueden establecer la dinámica de absorción y determinar los requerimientos internos de cada uno (concentración mínima para el máximo rendimiento posible), esto con la finalidad de proveer a los cultivos soluciones nutritivas balanceadas y efectivas para cada etapa fenológica. El análisis fisicoquímico de tejido vegetal posee información de gran ayuda e importancia para el agricultor; sin embargo, debe ser complementado con el análisis de suelo y requiere de tomar importantes consideraciones básicas como realizar un muestreo correcto y representativo, así como tener buenas prácticas de manejo de la nutrición (Rodríguez y Rodríguez, 2000). Por lo que, es necesario conocer el estado metabólico de la planta a nivel celular para evaluar las nutriciones aplicadas a etapas tempranas de desarrollo, incluso antes de establecer el cultivo en campo y ajustar las soluciones nutritivas a las necesidades verdaderas de la planta, para lograr una nutrición enfocada que permita maximizar la producción de los cultivos y disminuir el daño a los campos agrícolas por el exceso de sales. El empleo de técnicas moleculares en la agricultura moderna es una alternativa para elucidar dicho estado metabólico (Sumner, 2000).

Función Biológica y Mecanismos Moleculares del Transporte de Fósforo

El fósforo es un elemento crucial para la planta, está presente en forma inorgánica como aniones (P_i , fósforo inorgánico) y orgánica como compuestos organofosforados. El P es un constituyente estructural de ácidos nucleicos y fosfolípidos, participa en la conversión energética en forma de fosfoester y en la formación de enlaces difosfato; participa como factor de regulación y sustrato en la fotosíntesis, y el metabolismo oxidativo, juega un rol importante en la transducción de señales extracelulares y en la regulación de la actividad enzimática mediada por reacciones de fosforilación y desfosforilación. Debido a su baja solubilidad y su alta retención por el suelo, es un elemento poco viable para las raíces de la planta, por lo que, el suministro adecuado de éste elemento es un desafío para la agricultura (Buchanan et al., 2002).

En suelo el fósforo se encuentra a una concentración de $1 \mu\text{M}$ o incluso menor, mientras que en 100 g de material vegetal seco se encuentra a $0.2 \mu\text{M}$, en solución nutritiva es aplicado generalmente a concentraciones de 30 a 60 ppm (Chen et al., 2014). A través del tiempo las plantas han desarrollado diversos mecanismos moleculares que les permiten obtener el P del suelo con facilidad, dentro de los cuales se incluyen: la modificación de la asociación entre la micorriza y las raíces, alteraciones en la arquitectura de raíz para generar nuevas raíces terciarias de raíces secundarias laterales y explorar las reservas del suelo con mayor efectividad, liberación de ácidos orgánicos y protones (H^+) para solubilizar el P_i presente en el suelo, la exudación de enzimas (fosfatasas) para liberar el P_i en el suelo mediante la ruptura de enlaces, la sobreexpresión de genes codificadores de proteínas transportadoras de alta afinidad a P_i en la membrana celular de las células radicales (Bosse y Köck, 1998).

Las plantas movilizan el P_i del suelo a favor del gradiente de concentración (de mayor a menor concentración), debido a que existe 1000 veces mayor cantidad de P_i en el suelo que en el interior de las células de raíz. Para ello emplean transportadores selectivos para P_i o aquellos que intercambian P_i por protones

(H⁺-ATPasas) situados en la membrana celular. Existen dos sistemas de transporte que permiten distribuir el Pi en todos los tejidos de la planta: el sistema de alta afinidad (funciona cuando la concentración de Pi es baja en el exterior, de 3 a 7 μM) y el sistema de baja afinidad (activo de forma constitutiva, cuando la concentración de Pi es alta de 50 a 330 μM) (Yuan y Liu, 2008). En *Arabidopsis* se ha caracterizado la familia de genes transportadores de alta afinidad denominados *PHT1;1-9*, que codifican proteínas de membrana constituyentes de canales iónicos para la asimilación de Pi principalmente en raíz (Raghothama, 2000). Una vez que el P ha sido absorbido por raíz, es transportado hacia las hojas jóvenes mediante transportadores de la familia *PHO1;H1* situados en el xilema (cuya concentración se mantiene entre 1 hasta 7 mM), posteriormente es retranslocado al floema para su distribución de las hojas verdaderas hacia las hojas emergentes, hasta llegar nuevamente a la raíz (Schachtman y Shin, 2007; Kisco et al., 2015).

Se ha observado que la constante deficiencia de Pi incrementa la expresión de aquellos genes involucrados en la asimilación de P como las familias *PHT1* y *PHO1* ya mencionadas (Figura 2), también se multiplica la cantidad de transcritos codificadores de enzimas como las ácido fosfatasas (ACP) y ribonucleasas (RNAsas), así como la secreción de éstas por las células radiculares para liberar el Pi de compuestos organofosfatados presentes en la rizosfera (Yuan y Liu, 2008).

La constante actividad de estos mecanismos moleculares y el gasto energético que implica mantener estas rutas de señalización encendidas, generan modificaciones fisiológicas indeseadas en los distintos tejidos vegetales, denominados síntomas de deficiencia. En plantas de tomate, el crecimiento de la planta se torna lento debido a que el metabolismo celular se encuentra comprometido, por ende, disminuye la duplicación celular en los tejidos (principalmente en tallo); además se retrasa la madurez del fruto. La deficiencia de fósforo modifica la arquitectura del sistema radicular (RAS, en inglés), estimulando el crecimiento de raíces laterales con el fin de incrementar la fracción superficial de absorción de la planta y genera desproporción entre la relación tallo/raíz. Las hojas se tornan de aspecto delgado, color verde oscuro y desarrollan

coloraciones rojizas o violetas debido a la alta producción de antocianinas (Tjalling, 2006; Castellanos, 2009).

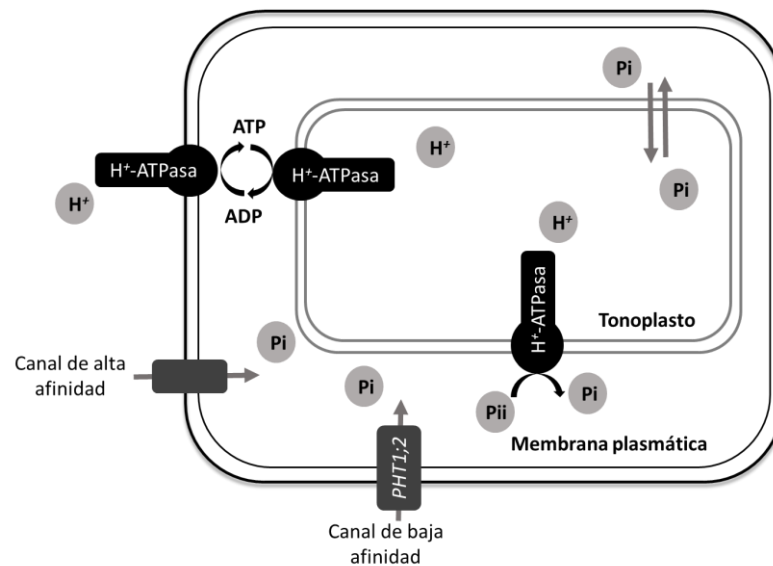


Figura 2. Principales transportadores de Pi en la célula vegetal.

Diversas rutas celulares que muestran la asimilación de Pi mediante el transporte activo (H^+ -ATPasa) que requiere el gasto de energía (ATP) y pasivo (canal de alta y baja afinidad) en donde se moviliza el Pi de menor a mayor concentración tanto del exterior al citosol, como entre los organelos de la célula. Figura modificada de Burow et al., 2008.

Genes Candidatos como Indicadores de Deficiencia de Fósforo en Tomate

Para la selección de genes a ser evaluados como indicadores de deficiencia de P, fue necesario buscar en la literatura aquellos relacionados a las rutas de asimilación mencionadas en el apartado anterior, cuya respuesta de sobreexpresión a una concentración deficiente haya sido demostrada en plantas de tomate específicamente.

La activación del mecanismo rápido de deficiencia de Pi también induce el incremento de la expresión y la actividad de enzimas asociadas (fosfatasas ácidas, fitasas y ribonucleasas), que facilitan la movilidad y disponibilidad del P en la rizosfera para que pueda ser absorbido por la planta. Liu et al (1997)

caracterizaron la secuencia y estructura del transcrito (474 pb) del gen *TPSI* (No de acceso U34808), codificador de una enzima fosfatasa involucrada en la respuesta molecular de tomate en deficiencia de Pi. Mediante ensayos de Southern Blot con ADN genómico de hojas de tomate probaron que el gen *TPSI* presenta sólo una copia en todo el genoma del cultivo y es homólogo a las secuencias reportadas en otras plantas de la familia de las solanáceas como papa (*Solanum tuberosum* L.), petunia (*Petunia atkinsiana*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*). Para verificar el incremento de su expresión en deficiencia de Pi por Northern Blot, extrajeron ARN total de raíces y hojas de tomate de plantas en aeroponía sin fosfato a diferentes tiempos de exposición (12 h a 7 d) e hibridaron con una sonda de ADNc específica para *TPSI1*. Observaron que los transcritos de *TPSI1* incrementan más temprano en raíz que en hoja durante las primeras 48 h y se mantiene hasta los 5 d, donde presentan mayor acumulación de copias (Figura 3). A diferencia de lo observado en los tejidos vegetales, la acumulación de ARNm de *TPSI1* se presenta con mayor rapidez en líneas celulares de tomate (var. Cherry VFNT) suspendidas en medio sin Pi, es detectable a partir de las 3 h con la ausencia de Pi y alcanza niveles máximos a las 12 h. Al transferir las células a un medio con Pi la expresión del gen se detiene y no es posible detectar las copias aún después de 24 h. Lo anterior indica que las células vegetales responden a la concentración externa de Pi mediante la activación de la expresión de genes que participan en el metabolismo de éste elemento y se mantiene mientras la concentración de Pi en el medio es baja (0 a 50 μ M) debido a que representa un estrés para la planta; Liu et al. (1997), también comprobaron que la expresión de *TPSI1* es específica de la deficiencia de Pi, ya que no detectaron transcritos de éste en ARN total extraído de hojas de plantas sometidas a deficiencia de hierro, potasio y nitrógeno. Como conclusión los autores mencionan que el gen *TPSI1* puede ser utilizado como marcador genético de deficiencia de Pi en plantas de tomate debido a su rápida inducción y la especificidad de su expresión sólo en concentraciones bajas de éste elemento.

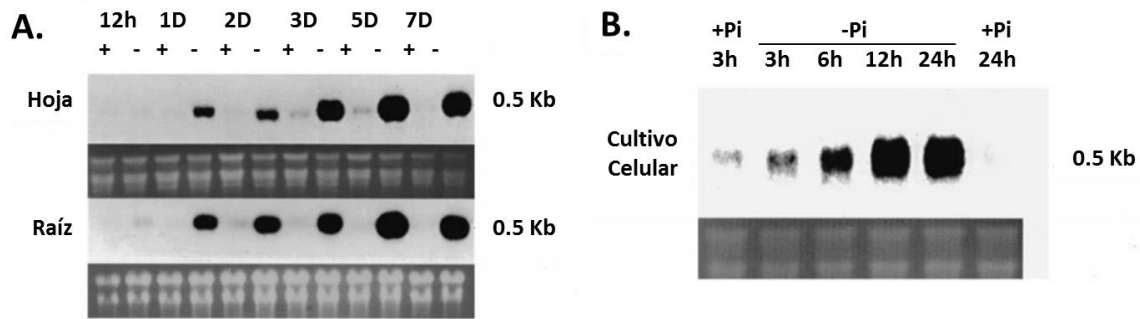


Figura 3. Expresión de *TPS11* en hoja y raíz de tomate con deficiencia de Pi.

A) Northern blot con ARN (10 µg/línea) extraído de hoja y raíz de tomate. Las plantas se desarrollaron en aeroponía y fueron atomizadas con soluciones nutritivas con 250 µg (+) y sin (-) Pi, a distintos periodos de tiempo. El gel teñido con bromuro de etidio indica que se mantuvo homogeneidad entre la concentración y la integridad de ARN utilizado para las muestras. B) Northern blot de ARN total aislado (10 µg/línea) de suspensión celular de tomate después de su transferencia a un medio con 250 µg (+) y sin (-) Pi. Tomado de Liu et al., 1997.

En estudios posteriores, el grupo de investigación de Liu et al. (1998), se dieron a la tarea de evaluar otros genes asociados a la respuesta rápida de plantas de tomate deficientes de Pi. *LePT1* y *LePT2* (No de acceso AF022873 y AF022874) forman parte de la familia de transportadores de fosfato inorgánico (*PHT1*), cuya expresión genera proteínas que forman canales iónicos de alta afinidad a Pi, localizados principalmente en la membrana plasmática de las células de raíz. En otros resultados, éstos autores muestran las secuencias obtenidas de ambos genes, así como la alta homología (80 %) que comparte con las reportadas en papa (*Solanum tuberosum*), arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) e hierba doncella (*Catharanthus roseus*). En ensayos de Northern Blot con ARN de diferentes tejidos de plantas de tomate desarrolladas en presencia (250 µM) y ausencia de Pi (Figura 4), Liu et al. (1998), observaron que *LePT1* se expresó en mayor medida en raíz y es detectable en menor cantidad en hoja, tallo y peciolo del tratamiento deficiente mientras que, la expresión de *LePT2* se manifestó sólo en raíces. Para ambos genes el aumento de transcritos incrementa a partir de las 24 h sin Pi y alcanza su nivel máximo a los 5 d. Al suministrar Pi (250 µM) a las plantas deficientes, los niveles de los transcritos de ambos genes disminuyen a partir de

las 24 h y cesa a los 2 d donde no es posible su detección. Con lo anterior los autores sugieren que existe una estrecha coordinación entre la expresión de éstos genes con la concentración del Pi disponible en el suelo, ya que el incremento de canales iónico genera una mayor área de absorción del nutriente. En ensayos con plantas sometidas a deficiencia de otros minerales (hierro, potasio y nitrógeno) no se manifestó la expresión de *LePT1* y *LePT2*, lo anterior demuestra que la expresión de ambos genes es debida solamente a bajas concentraciones de Pi.

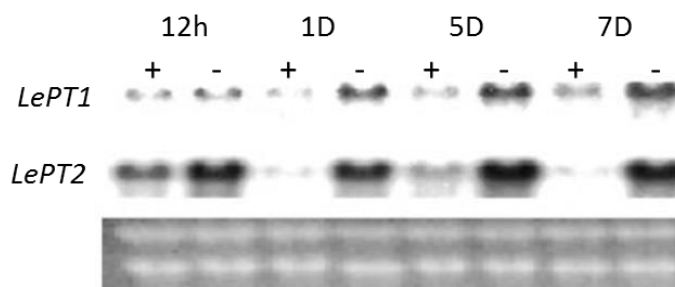


Figura 4. Expresión de *LePT1* y *LePT2* en raíz de tomate con deficiencia de Pi.

Northern Blot de ARN total aislado de raíces de plantas de tomate nutridas con 250 μ M (+) y sin Pi (-) por los periodos de tiempo indicados. El gel teñido con bromuro de etidio indica que se mantuvo homogeneidad entre la concentración y la integridad de ARN utilizado para las muestras. Tomado de Liu et al., 1998.

En estudios recientes (Chen et al., 2014), se ha cuantificado la expresión del resto de los genes miembros de la familia de transportadores *PHT1* en diversos tejidos de tomate (*LePT1;8*). Se cuantificó la expresión de los genes mediante PCR tiempo real con ADNc de tejidos de plantas sometidas a deficiencia de Pi (0.05 mM), encontrando distintos patrones de expresión para cada gen (Figura 5). *LePT1* se expresó en todos los tejidos examinados, presentó mayor abundancia de transcritos en raíz y hojas mientras que, en tallo, flor y fruto se cuantificó en menor medida. *LePT2* presentó mayor expresión en raíz, mientras que, en el resto de los tejidos se mostró nula expresión. Tanto *LePT3* como *LePT5* mostraron patrones similares, ambos fueron detectados en frutos maduros diez veces más

que en frutos verdes. La expresión de *LePT6* predominó en raíz en un tercio de la expresión de *LePT2* en el mismo tejido y en menor cantidad en tallo y hoja. Se presentaron transcritos de *LePT7* en todos los tejidos pero en menor cantidad que la expresión de *LePT1*. La expresión de *LePT4* y *LePT8* no fue detectable en ninguno de los tejidos. Lo anterior prueba la participación de la familia *PHT1* en el transporte de Pi a corta y larga distancia en todos los tejidos vegetales en deficiencia del nutriente, lo que extiende la aplicabilidad de éstos como indicadores de deficiencia desde la raíz, hasta los frutos del cultivo.

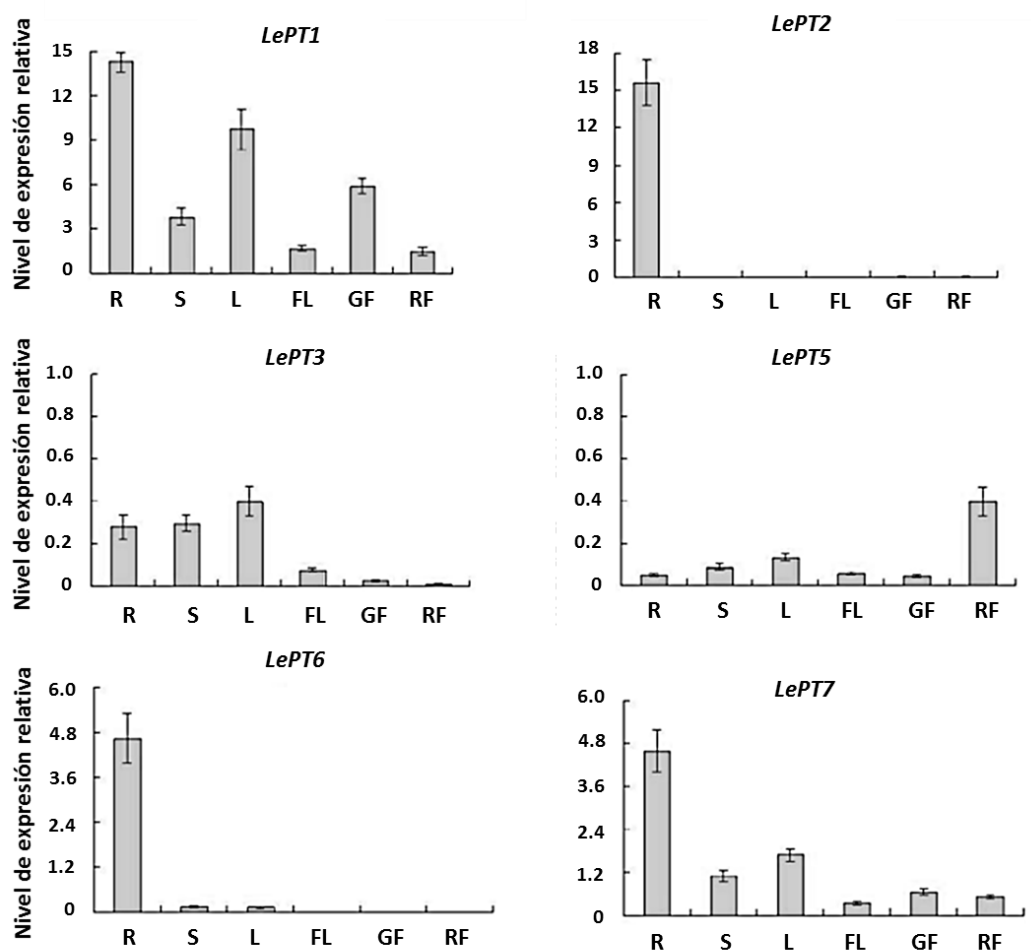


Figura 5. Perfil de expresión de la familia de genes *Pht1* en distintos tejidos de tomate con deficiencia de Pi.

Se aisló RNA de diferentes tejidos: raíz (R), tallo (S), hojas (H), flores (FL) y frutos en dos estados, verdes (GF) y maduros (RF). Se muestran los niveles de expresión relativa de cada gen de la familia *Pht1* en tomate indicados como porcentaje respecto a la expresión del gen constitutivo actina. Cada barra representa la media de tres réplicas biológicas. Tomado de Chen et al., 2014.

En mutantes de *Arabidopsis* sin estas proteínas, se ha confirmado la función de las proteínas transportadoras como principales efectoras que controlan la respuesta molecular a la concentración de P en el medio, encendiendo o apagando éste mecanismo compensatorio de acuerdo a su disponibilidad en el citosol celular. Ayadi et al. (2015), observaron que los miembros *PTH1;5*, *PTH1;7*, *PTH1;8* y *PTH1;9* están fuertemente involucrados en la asimilación constante de Pi, ya que son altamente expresados en raíz en presencia de Pi por las plantas mutadas, mientras que el resto de los genes de esta familia son expresados cuando la concentración de Pi es baja. En otros estudios se ha observado la alta homología y conservación de la familia de transportadores *PHT1*, así como su papel en el transporte de Pi en el mecanismo de respuesta rápida en deficiencia del nutriente en distintos modelos biológicos moleculares como arroz (Ai et al., 2009), *Medicago truncatula* (Liu et al., 2008) y cebada (Rae et al., 2003), la presencia de éstas proteínas en diversos cultivos de interés agrícola incrementa su aplicabilidad como genes indicadores de deficiencia de P.

Baldwin et al. (2001), evaluaron la inducción de un fragmento (942 pb) del gen *LePS2* (No de acceso AF305968) codificador de una fosfatasa ácida (ACP, en inglés) como respuesta de plantas de tomate en presencia (250 μ M) o ausencia de Pi mediante ensayos de Northern Blot con ARN total extraído de diferentes tejidos (raíz y hoja). Se presentó un incremento en la expresión de *LePS2* detectable a partir de las 24 h sin Pi en todos los tejidos examinados (Figura 6), la respuesta se mantuvo hasta los 5 d. La rápida inducción del gen fue evidente en cultivo celular de tomate en donde la acumulación se generó a partir de las 3 h de transferencia a un medio sin Pi, lo anterior indica la sensibilidad celular a los cambios de la concentración de Pi en el citosol y la rapidez de la respuesta molecular a la misma mediante la expresión de *LePS2*, la cual se reduce una vez que el P es suministrado nuevamente al medio. Para evaluar la especificidad de la expresión sólo a la deficiencia de P, se efectuaron ensayos con plantas sometidas a deficiencia de nitrógeno, hierro y potasio; a los 5 d las plantas mostraban síntomas característicos de cada deficiencia, sin embargo en el ámbito molecular la

expresión de *LePS11* solo fue detectable en plantas con deficiencia de Pi, en el resto la expresión no fue detectable. Para correlacionar la respuesta de la expresión génica de las plantas a bajas concentraciones de P en el medio Baldwin et al. (2001), extrajeron RNA de plantas sometidas a diferentes concentraciones de Pi y sólo en aquellas suministradas con 100 μ M o menos de Pi se presentó una acumulación de transcritos. Lo anterior muestra que la expresión de los genes involucrados en la respuesta de deficiencia a Pi se mantiene nula mientras la concentración del nutriente no represente una limitante para el metabolismo de la planta. Para mostrar la naturaleza enzimática de la proteína expresada por *LePS11*, fue clonada en bacterias (*E. coli*) y posteriormente purificada para su separación en SDS-PAGE, el producto fue separado entre los valores de pH de 4 y 5, lo cual concuerda con los valores a los que las ACPs presentan su actividad.

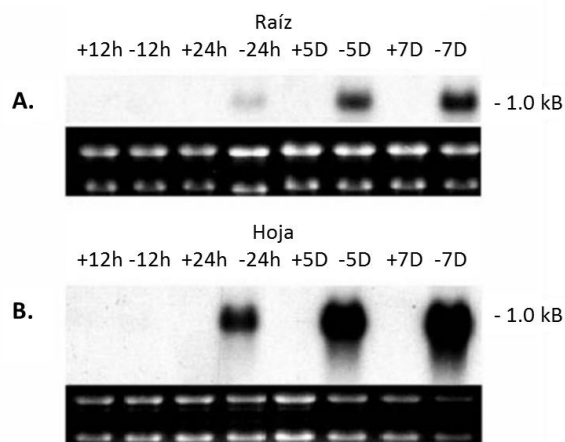


Figura 6. Expresión de *LePS2* en hoja y raíz de tomate con deficiencia de P.

A) Ensayo con ARN aislado de raíz. B) y hojas de plantas desarrolladas en aeroponía, suministradas con 250 μ M (+) y sin (-) Pi por los periodos indicados de tiempo, la hibridación se hizo con una sonda de ADNc para *LePS2*. Tomado de Baldwin et al., 2001.

Ramaiah et al (2011), muestran que la expresión del gen *LePS3* en tomate (homólogo a *G3PP* en arábidopsis, codificador de una permeasa glicerol-3-fosfato) es regulada en ausencia de Pi tanto en raíz como en hoja, sin embargo no muestran datos específicos de sus ensayos en tomate. Dado que la información

en la literatura respecto a *LePS3* es limitada, resulta difícil considerarlo como un buen indicador molecular.

Diversos estudios muestran que la síntesis y actividad de nucleasas y ribonucleasas en las plantas, es controlada mediante una variedad de factores que incluyen la producción de hormonas, la concentración citosólica de Ca^{2+} , estrés físico, el desarrollo y senescencia de la planta, así como la deficiencia de Pi; proceso en el cual también están involucradas enzimas como fosfatasa y fosfodiesterasas (Brown y Ho, 1987; Filho y Sodek, 1988; Löffler et al., 1992). Estas enzimas se encuentran localizadas en diferentes compartimentos subcelulares determinados por su secuencia de aminoácidos; en base a lo anterior, Köck et al. (1995), denominaron a cinco enzimas, entre ellas: ARNasa LE (extracelular), ARNasa LX (intracelular pero extravacuolar) y ARNasas LV1, LV2 y LV3 (intravacuolares). Mediante ensayos de hibridación de ADNc con sondas etiquetadas para cada enzima, se evaluó la expresión de ARNm de ARNasa LE y LX, encontrando que después de 3 h incrementan los transcritos para ambas en líneas celulares de tomate sin Pi en el medio, y se mantiene hasta las 24 h. Lo anterior muestra la fuerte correlación que existe entre la inducción de la expresión de las cinco isoformas de ribonucleasas a una baja disponibilidad de Pi citosólica y que su expresión es inducida específicamente por la concentración de Pi intracelular independientemente de la concentración presente en el medio (Bosse y Köck, 1998).

La familia 14-3-3 son proteínas con sitio de unión para fosfoserina, encargadas de regular una amplia gama de cascadas de señalización celular mediante interacciones proteína-proteína. En plantas se ha observado que participan como factores de transcripción y moléculas señal en el desarrollo de los tejidos, el transporte de iones y en la respuesta a factores de estrés como la salinidad. Estudios recientes (Bridges y Moorhead, 2004), sugieren que su principal rol consta en regular la respuesta de deficiencia de nutrientes mediante la interacción de estas con proteínas quinasas y fosfatasa. En tomate, las proteínas 14-3-3 son codificadas por una familia de genes compuesta de 12 miembros denominados

TFT1 hasta *TFT12*. En un estudio efectuado por Xu y Shi (2006), evaluaron la expresión de cada miembro de la familia de genes *14-3-3* para generar su perfil de expresión en raíces de tomate, sometidas a distintos factores de estrés abióticos como salinidad, deficiencia de hierro y potasio. Para medir la expresión hicieron uso de PCR tiempo real, tecnología más precisa en el ámbito molecular que a diferencia de técnicas de hibridación como Northern y Western Blot, permiten una cuantificación relativa o absoluta más certera, aun cuando la secuencia blanco posea un número bajo de transcritos en la muestra problema. En sus resultados reportan que bajo condiciones nutritivas normales de crecimiento todos los genes se expresan a un nivel basal y una vez que ya sea potasio o hierro es retirado del medio, algunos de ellos muestran mayor expresión, lo cual indica su relación estrecha con la concentración del nutriente. Toda la familia de genes mostró sobreexpresión en deficiencia de potasio y sólo *TFT7* para la deficiencia de hierro mientras que, para el estrés salino se incrementó la expresión de los genes *TFT1*, *TFT4*, *TFT7* y *TFT10*. En un estudio complementario (Xu et al., 2012), se evaluó la hipótesis de la participación de los genes *14-3-3* en deficiencia de Pi. Para generar el material vegetal sometieron plantas de tomate a deficiencia de fósforo (2 μ M) por 15 d en un sistema hidropónico, de las cuales extrajeron su ARN total de hojas y raíces, para sintetizar ADNc y usarlo como material genético en PCR tiempo real. Encontrando que bajo la deficiencia de Pi la expresión de la mayoría de los genes mantiene su estado basal, a diferencia de *TFT1*, *TFT4*, *TFT6* y *TFT7* cuya expresión se modula significativamente tanto en hoja como en raíz (Figura 7). Tanto *TFT1* como *TFT4* disminuyen su expresión en hoja durante todo el ensayo. La expresión de *TFT6* en hoja se mantuvo alta los primeros dos días (48 h) del tratamiento y posteriormente disminuyó. El comportamiento de *TFT7* muestra que su expresión es altamente modulada en deficiencia de Pi, ya que se incrementa a partir de 1 d con el tratamiento y se mantiene hasta finalizar tanto en hoja como en raíz siendo éste último, el tejido en donde presenta mayor expresión, lo cual indica una fuerte participación de éste en la respuesta molecular a la deficiencia de Pi.

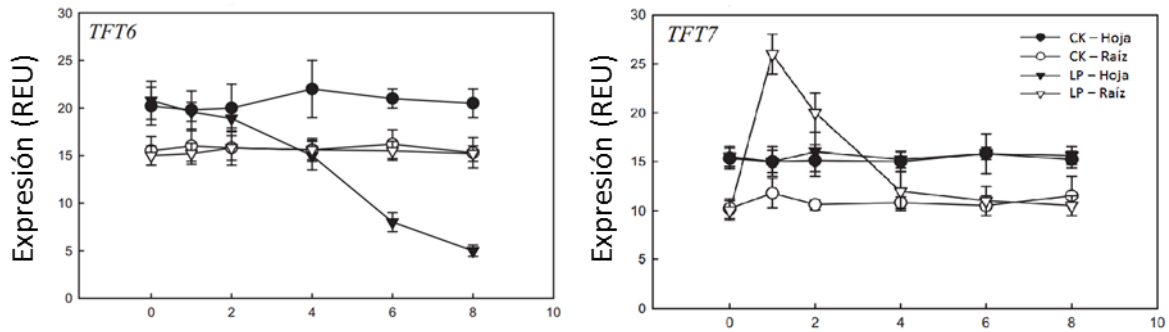


Figura 7. Perfil de expresión de *TFT6* y *TFT7* en hoja y raíz de tomate con deficiencia de Pi.

CK corresponde las plantas control (1 mM) y LP a plantas con deficiencia de Pi (2 μ M) a 0, 1, 2, 4, 6 y 8 horas. Los niveles de expresión relativa se calcularon y normalizaron con respecto a la expresión de α -tubulina (= 100 unidades de expresión relativa, REU). Los cambios en REU de la expresión fueron evaluados mediante la prueba T de Student ($P < 0.05$). Los valores graficados corresponde a la media y desviación estándar de seis réplicas. N.D: expresión no detectada. Tomado de Xu et al., 2012.

De acuerdo a la discusión de Richardson (2009), dentro de la respuesta molecular en deficiencia de Pi, hay genes de respuesta rápida encargados de censar la deficiencia e iniciar las cascadas de señalización; y genes de respuesta tardía cuya expresión altera la morfología y el metabolismo de plantas sometidas a la deficiencia de manera prolongada. En base a los perfiles de expresión obtenidos de *TFT6*, es un gen que pueda estar involucrado en la respuesta tardía, mientras que, *TFT7* pertenece a los de respuesta temprana, por lo que es un marcador molecular más adecuado para emplearlo en el diagnóstico de la deficiencia de Pi a partir de 1 d (tiempo de respuesta del gen) de haber aplicado la solución nutritiva al cultivo.

Fundamentos de la Técnica de PCR

La PCR es una técnica ampliamente utilizada en el campo de la biología molecular para la amplificación de secuencias particulares de ADN. Se trata de una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN molde tras ciclos repetidos en los que una secuencia objetivo es copiada.

Los principales componentes en una reacción de PCR son el ADN molde, la enzima polimerasa, secuencias cortas de nucleótidos que actúan como iniciadores, desoxirribonucleótidos trifosfatados, el ion magnesio y una solución amortiguadora; estos elementos interactúan en una reacción de tres etapas fundamentales: desnaturalización, alineamiento y extensión. Durante la etapa de desnaturalización se logra la separación de las dos cadenas del ADN gracias a la aplicación de altas temperaturas (90 a 97 °C). En el segundo paso (alineamiento o hibridación) los iniciadores se alinean con el ADN molde y, finalmente la extensión por acción de la polimerasa y la adición de nucleótidos desde el extremo de los iniciadores para crear una copia o cadena complementaria al ADN molde (Markoulatos et al., 2002).

Actualmente la PCR en tiempo real es la herramienta más utilizada para diversas aplicaciones, entre estas se encuentran la clonación de vectores de ADN en plásmidos, pruebas genéticas para la detección de mutaciones, diagnóstico de enfermedades mediante la cuantificación de biomarcadores moleculares, la construcción de genotipos y huellas genéticas, así como la determinación de OGMs en alimentos, ya que a diferencia de la PCR en punto final permite la cuantificación de la secuencia de interés. Esta técnica sigue el principio anteriormente descrito, pero requiere además de un sistema reportero de fluorescencia para detectar el producto de la amplificación tras cada ciclo de la reacción. Uno de los sistemas específicos más comunes para tal propósito es el uso de sondas de hibridación etiquetadas con un fluoróforo (reportero) y una molécula quencher. Cuando se encuentran en estrecha proximidad, el quencher absorbe y enmascara la fluorescencia del fluoróforo; sin embargo, cuando la sonda hibrida con el ADN y es escindida por la polimerasa, se pierde la unión entre reportero y quencher logrando que la fluorescencia sea emitida y registrada (Valasek y Repa, 2005). Al número de ciclos que la fluorescencia tarda en cruzar una señal de fondo se le conoce como ciclo de cuantificación (Cq, en inglés); este valor es inversamente proporcional a la concentración inicial de copias del ADN de interés, por lo que es utilizado para su estimación.

Como cualquier método analítico la PCR tiempo real presenta algunas limitantes por ejemplo, su precisión se ve comprometida al cuantificar un bajo número de copias de ADN (Huggett et al., 2013). Además, su principal factor limitante es la dependencia con un material calibrante. Es decir, para poder asignar un valor de concentración de la secuencia diana a una muestra, se recurre a la interpolación del valor de C_q en una curva de calibración construida a partir de una muestra de concentración conocida, la cual generalmente se prepara realizando diluciones en agua, lo que altera la matriz de análisis. Asimismo, el C_q es un parámetro muy sensible a diferentes factores como concentración de reactivos, temperaturas y presencia de inhibidores y, pequeñas variaciones en éste se traducen en cambios importantes en la concentración estimada. En base a éstos requerimientos de la técnica, recientemente se ha desarrollado una nueva modalidad de PCR denominada PCR digital, la cual no requiere el uso de curvas de calibración y posee mayor sensibilidad que la PCR tiempo real, por lo que el número de copias iniciales en la matriz a cuantificar no representa un problema (Markoulatos et al., 2002).

Es necesario tomar precauciones de diseño y manejo en el empleo de la PCR tiempo real ya que el valor C_q puede ser afectado por factores como la temperatura de alineamiento de los iniciadores y/o sonda, la concentración de todos los elementos de reacción y la presencia de inhibidores en el material genético empleado, incluso el número de copias presentes del gen de interés en el ADN molde es una limitante en la sensibilidad de la técnica ya que su precisión se compromete cuando el número de copias es bajo, debido a que posee límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD) altos. Como se desconoce el número de copias iniciales en nuestra muestra problema, es necesario que la técnica utilizada para cuantificar expresión absoluta posea alta sensibilidad y precisión, que le confiera menores LOQ y LOD. Además, su robustez sea tal que la amplificación no se vea afectada por inhibidores de reacción presentes de forma natural en el material genético como es el caso del tejido de raíz, una de las matrices a emplear en el presente estudio (Hindson et al., 2011).

Fundamentos de la PCR Digital

La PCR digital es una herramienta analítica que permite cuantificar ácidos nucleicos sobre la base del conteo absoluto de reacciones positivas y negativas, por lo que no requiere utilizar una curva de calibración en la cual interpolar resultados. El fundamento general de esta técnica consiste en distribuir la muestra de manera aleatoria en un número elevado de particiones, de manera que contengan cero, una, o unas cuantas moléculas del ADN blanco; posteriormente las particiones son sometidas a un proceso de amplificación en un termociclador. Finalmente el número de copias del ADN blanco se determina en función de la proporción de particiones positivas (aquellas donde hubo amplificación) clasificadas como tal en función de su nivel de fluorescencia y utilizando un arreglo matemático que considera el volumen de la entidad de partición y la distribución de Poisson (Pinheiro et al., 2011; Morisset et al., 2013). Dado que el número de particiones en que se separa la muestra es relativamente alto y, por lo tanto, la probabilidad de que cada partición contenga una o más moléculas de ADN blanco es muy baja, se considera que la distribución de éstas en las particiones se ajusta al modelo de Poisson. Es por ello que tras realizar el conteo de particiones positivas y negativas en la muestra y con el fin de considerar la cantidad de particiones positivas que probablemente contengan más de una molécula diana, se realiza una corrección mediante el modelo mencionado.

La PCR digital se encuentra comercialmente disponible bajo dos formatos: PCR digital en cámara y PCR digital en gotas (ddPCR, en inglés). La primera divide la muestra de cientos a algunos miles de reacciones individuales, utilizando chips con pequeñas válvulas y un sofisticado sistema de microfluidos que separa el volumen de la muestra en pocillos de nanométricos. En cada partición se lleva a cabo una reacción de PCR tiempo real o de punto final (Huggett et al., 2013). Por su parte, la PCR digital en gotas consiste en fraccionar la muestra incluyendo al ADN molde en aproximadamente 20,000 gotas de una emulsión agua/aceite, en cada una de las cuales se lleva a cabo una reacción de amplificación

independiente por PCR de punto final (Pinheiro et al., 2011, Baker, 2012) (Figura 10). La PCR digital en cámara tiene un mayor costo por muestra, permite un menor número de particiones y ofrece un rango dinámico pequeño (2 a 3 logs) en comparación con la PCR digital en gotas (4 a 5 logs), por lo que se considera que esta última ofrece una mejor precisión, confianza y facilidad de adopción (Huggett et al., 2013; Morisset et al., 2013).

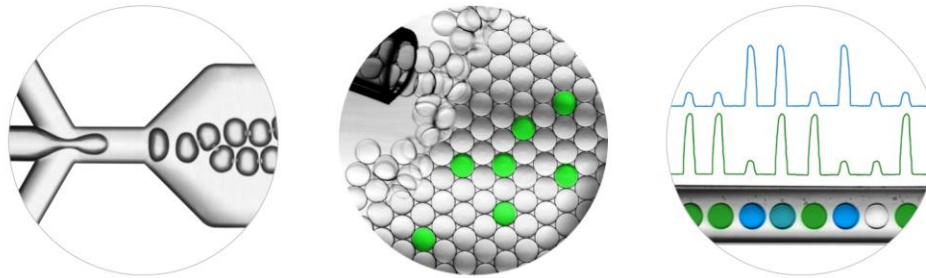


Figura 8. Flujo de trabajo para PCR digital en gotas.

Primero se particiona la muestra en 20 000 gotas, formando una emulsión agua/aceite, en cada gota se lleva a efecto la amplificación dentro del termociclador, por último, se lee la absorbancia de cada gota para detectar si hubo o no amplificación y elucidar entre gotas positivas y negativas. Tomado de Bio-Rad, 2011.

Se han precisado ventajas de la PCR digital sobre la PCR tiempo real, entre las que destacan: 1) la PCR digital alcanza mayor sensibilidad y precisión (Baker, 2012); 2) la eficiencia de PCR tiempo real es influenciada por diversos factores, entre ellos la presencia de sustancias inhibidoras en las muestras de alimentos, lo cual puede conducir a una estimación errónea del contenido de OGMs (Morisset et al., 2013). Por el contrario, la PCR digital en gotas es mucho más tolerante a inhibidores, reduciendo el sesgo por efecto matriz que se observa con PCR tiempo real (Burns et al., 2010); 3). La PCR digital permite mayor exactitud que la PCR tiempo real y no depende de la disponibilidad de materiales de referencia (Morisset et al., 2013).

Una desventaja de la PCR digital, es que en el caso de múltiples copias ligadas en un locus se puede subestimar el número de copias del gen de interés. Teóricamente al separar las moléculas de ADN en las diferentes particiones, las copias ligadas quedan encapsuladas juntas en una misma gota, por lo que se comportarían como una sola copia. Para lograr la distribución aleatoria independiente de todas las copias es necesario primero separarlas (Bio-Rad, 2011). Para esto se puede recurrir a métodos físicos como el cizallamiento del ADN por medio de ultrasonido, de igual forma a métodos enzimáticos como la restricción por endonucleasas e incluso a la preamplificación del analito de interés y un gen de referencia (Qin et al., 2008; Hindson et al., 2011; Bio-Rad, 2011).

Los trabajos publicados sobre la aplicabilidad de la PCR digital en gotas diferentes ámbitos, exponen las ventajas técnicas que ofrece como método para la cuantificación de marcadores moleculares, principalmente para la detección de enfermedades en humanos. Sin embargo, ningún método ha sido desarrollado para el sector agrícola, que bajo el mismo principio de detección de una secuencia objetivo (marcador molecular) permita asociar el número de copias presentes en un tejido vegetal con el estado metabólico de un cultivo. El desarrollo de dicho método implica la selección de genes cuya expresión esté directamente relacionada con la concentración de un nutriente específico, sea fósforo, para el interés de éste estudio y posteriormente, la optimización de la reacción de amplificación para generar las mejores condiciones de operación en formato digital en gotas y finalizar con la validación del mismo con la finalidad de evaluar las características de desempeño del método desarrollado como precisión, sensibilidad, robustez, rango dinámico, LOD y LOQ, aplicabilidad y selectividad del método a manera de conocer las ventajas y limitantes del mismo.

Optimización y Validación de un Método Analítico

La optimización de una técnica eficiente de PCR requiere constante planeamiento estratégico y experimentación para ajustar las condiciones (temperaturas y tiempo

de cada ciclo) y los factores de la reacción de amplificación (concentración relativa de iniciadores, concentración de solución amortiguadora, balance entre cloruro de magnesio y concentración de deoxinucleótidos, cantidad de material genético molde y de la enzima polimerasa). Además, modular correctamente la relación entre iniciadores y el material genético es importante para minimizar la formación de dímeros entre iniciadores o la amplificación de productos inespecíficos. El conjunto de reactivos y las condiciones de amplificación, contribuirá en la obtención de productos de amplificación específicos. Por lo que optimizar el método es crucial para una cuantificación certera del marcador molecular de deficiencia. Generalmente, para la optimización se emplean concentraciones estándar de iniciadores (900 nM) y sonda de hibridación (250 nM) (Bio-Rad, 2011). Mientras que la temperatura de alineamiento es evaluada a través de un gradiente, para identificar aquella temperatura que permite una mayor cuantificación del número de copias del gen de interés, mejor separación entre gotas positivas y negativas, y disminuya el efecto de “lluvia” generado a partir de la partición de la secuencia objetivo durante el manejo de la muestra (Miokte et al., 2005).

Recientemente, la metodología de superficie de respuesta (MSR) ha sido empleada para optimizar la amplificación en PCR digital en gotas (Félix Urquidez et al., 2015). La MRS utiliza modelos de regresión, basados en diseños de experimentos específicos, entre una variable de respuesta y varias variables regresoras (independientes) mediante los cuales es posible determinar matemáticamente los valores de las regresoras que optimizan (maximizan o minimizan) (Montgomery, 2008).

Por otro lado, la validación de un método es el proceso de determinación de las características y las limitaciones del rendimiento de un método analítico. Los resultados de un proceso de validación definen qué analitos pueden determinarse en qué tipo de matrices en presencia de cuales interferencias (Thompson et al., 2002). La validación completa de un método implica el determinar numerosas características de desempeño y culminar con un estudio colaborativo entre

diferentes laboratorios (CCMAS, 2010). Algunos de los parámetros de desempeño mínimos considerados para una validación se describen a continuación:

Especificidad

Es la propiedad de un método de responder de manera exclusiva a la característica o analito de interés. En el caso de la PCR, el método no deberá producir señal de amplificación de secuencias diferentes a la secuencia objetivo para la cual el método fue desarrollado (Henegariu et al., 1997; Markoulatus et al., 2002; Thi Hue et al., 2011).

Rango Dinámico

Es el intervalo de concentraciones en el cual el método se desempeña de manera lineal con un valor aceptable de precisión y exactitud. El rango dinámico debe incluir la décima parte y al menos cinco veces la concentración del analito de interés; la respuesta deber ser lineal a lo largo de todo el intervalo, con un coeficiente de correlación igual o superior a 0.98 (Ederveen, 2010). En ensayos de validación de la técnica de PCR digital en gotas con DNA del fago Lambda como material de referencia, Pinheiro et al (2011) predecían un rango dinámico teórico de 37 a 131 000 copias sin embargo, el rango dinámico experimental obtenido fue de 142 hasta 33 000 copias a pesar de la discrepancia entre el estimado y el real, se denota la capacidad de la técnica para trabajar con matrices en las que las copias de la secuencia objetivo sea bajo, así como en matrices saturadas.

Precisión

Expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Referida como la desviación estándar relativa de los resultados obtenidos del ensayo bajo condiciones de repetitividad, es decir,

utilizando el mismo método, sobre el mismo material de ensayo, en el mismo laboratorio, con el mismo equipo, por el mismo operador y durante cortos intervalos de tiempo, en este sentido, el coeficiente de variación deberá ser menor o igual al 25 % entre las réplicas de las diferentes concentraciones empleadas para definir el rango dinámico (Ederveen, 2010).

Exactitud

Expresa la cercanía entre el valor verdadero aceptado (dado por un material de referencia) y el valor observado (promedio de tres réplicas) obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces. El valor promedio de copias del marcador molecular deberá estar dentro del ± 25 % del valor de referencia aceptado en las distintas concentraciones de la matriz (ADNc de un tejido vegetal dado) evaluadas para construir el rango dinámico (Ederveen, 2010).

Límite de Detección (LOD)

Es la concentración más baja en la que el analito puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado como valor exacto. Generalmente se expresa en términos de concentración del analito (copias del marcador molecular para este caso) en la muestra problema y debe ser menor al 5 % de la concentración de la secuencia objetivo (Broeders et al., 2014). Algunos métodos por PCR para el análisis de OGMs reportan límites de detección absolutos (LODabs) cercanos a 10 copias del gen *Tnos* (codificador de la nopalina sintasa), cuya concentración en copias es asociada a al porcentaje de GMO de un maíz dado (Waiblinger et al., 2008; Bahrtdt et al., 2010; Morisset et al., 2013).

Límite de Cuantificación (LOQ)

Es la cantidad mínima o concentración del analito en una muestra que puede ser detectada de manera confiable, con un nivel aceptable de precisión y exactitud.

Deberá ser menor al 10 % del valor de concentración de la secuencia objetivo, con un porcentaje de desviación estándar relativa menor o igual al 25 % (Félix Urquidez et al., 2015).

Aplicabilidad

Es el alcance que tiene el método, definida por la descripción de los analitos, matrices y concentraciones a las cuales el método puede ser aplicado de forma satisfactoria. En su estudio Félix Urquidez et al (2015) validaron un método multiplex para la detección de OGMs basado en la cuantificación de copias de *Tnos/hmg*, aplicable en diferentes variedades de maíz como maíz palomero, azul, rojo y blanco con un nivel de precisión y exactitud del 84 al 99 %. Para un método de detección de deficiencia de macronutrientes mediante PCR digital en gotas, es importante el desarrollo de éste en base a genes presentes en un cultivo de importancia económica. El tomate es una planta ampliamente cultivada en la región, está catalogado dentro de la familia de las solanáceas a la cual también pertenecen otros cultivos de importancia agrícola y molecular como el pimiento, el tabaco, la petunia, entre otros. Así pues, el empleo de marcadores moleculares presentes en tomate, permitiría la aplicabilidad de la metodología en distintas variedades del cultivo, e incluso podría extenderse al resto de las solanáceas, debido al diseño de los iniciadores (elementos de la PCR digital en gotas) dirigido a regiones conservadas en la secuencia de los marcadores en distintos cultivos.

Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) como Modelo de Estudio

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más importantes dentro del taxón *Solanaceae*, globalmente se destaca por ser uno de los cultivos más difundidos y con mayor valor económico. Anualmente son producidas 211 MMt en el mundo. China es el productor mayoritario con un 23.75 % del total, mientras que las cosechas mexicanas constituyen el 1.63 %, siendo Sinaloa el estado con mayor producción del país (Cuadro 2) (FAOSTAT, 2015). La demanda

de su fruto incrementa continuamente y con ello, su cultivo y comercio, lo cual ha generado la intensificación de su producción mediante el uso de fertilizantes, buenas prácticas agrícolas y el monitoreo constante de la nutrición de los cultivos por diversas técnicas y herramientas.

Cuadro 2. Producción de tomate en México y Sinaloa registrada en el año 2014.

Productor	Sembrado (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/ha)	PMR (\$/t)	Valor de producción (mdp)
México	52,374.91	2,875,164.08	56.42	5,472.91	15,735,506.33
Sinaloa	15,307.13	867,832.04	59.32	3,655.80	3,172,619.21

Datos obtenidos de FAOSTAT, (2015); SIAP, (2014), SAGARPA, (2015).

Fisiológicamente la planta de tomate es una especie que posee alta conservación de su información génica entre variedades, la cual se encuentra organizada en 24 cromosomas dentro de sus células somáticas. Mediante secuenciación masiva de pequeños fragmentos de genes (microARN) se ha probado que el arreglo de sus nucleótidos difiere en un 0.061 % entre distintas variedades del cultivo (Micro Tom y Heinz), inclusive comparte gran homología con otras especies como: *Hordeum vulgare* (cebada), *Triticum aestivum* (trigo), *Zea mays* (maíz), *Pinus* sp. (pino), *Picea* sp. (abeto), *Populus* sp. (álamo), *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*, *Glycine max* (soya), *Citrus sinensis* (naranja), *Malus domestica* (manzana), *Vitis vinífera* (uva), *Nicotiana tabacum* (tabaco) y *Solanum tuberosum* (papa) (Mueller et al., 2005a; Aoki et al., 2010). Lo anterior permite una amplia aplicabilidad de la información génica generada a partir de ésta planta.

A partir de la secuenciación completa de su genoma, se creó una plataforma bioinformática de mapas genéticos e importantes biomarcadores de diferentes procesos biológicos (Mueller et al., 2005b), posicionando al tomate como organismo modelo para estudios de caracterización de patrones de regulación de expresión génica y rutas metabólicas de señalización ante diversos estímulos de

estrés. Entre estos, destacando diversos factores abióticos que enfrentan las plantas durante su crecimiento como: salinidad, deshidratación, altas y bajas temperaturas, deficiencia de nutrientes, etc. (Cushman y Bohnert, 2000). Este último es conocido como un factor clave durante todo el ciclo de vida de la hortaliza puesto que, una concentración adecuada de macro y micronutrientes conlleva a maximizar el metabolismo celular y por ende incrementar la producción de fruto; en contraparte cuando la nutrición de la planta es escasa, estimula una serie de mecanismos de acción que conlleva a la expresión de múltiples genes y producción de metabolitos secundarios que pueden llegar a comprometer la producción del fruto o dañar de forma permanente a la planta e incluso provocar su muerte.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El monitoreo del estado nutricional del cultivo es una herramienta de suma importancia para la agricultura moderna, cuando no se hace un diagnóstico oportuno de desbalance de nutrientes, la planta se desarrolla en concentraciones limitadas de nutrientes, lo cual desencadena la activación de rutas de señalización en la célula vegetal que inducen la modulación de la expresión génica y el metabolismo que generan cambios físicos y morfológicos (síntomas de deficiencia) en la planta que comprometen su crecimiento y producción. En un intento por maximizar el potencial productivo de los cultivos, se emplean análisis fisicoquímicos que permiten evaluar constantemente el estado nutricional de la planta, estos métodos se basan en la cuantificación de distintos iones en la digestión ácida del material vegetal mediante técnicas de espectrofotometría. Sin embargo, la limitante en la sensibilidad de los métodos fisicoquímicos no permite identificar estados iniciales de deficiencias nutrimentales, motivo por el cual se requiere desarrollar alternativas que permitan solventar las limitantes de los métodos existentes actualmente.

En este sentido, diversos estudios han identificado genes involucrados en la ruta metabólica de P cuya expresión es regulada en horas al variar su concentración de alta (mM) a baja (μM). Lo anterior ha generado una pauta para el uso de éstos como marcadores moleculares que señalen la deficiencia de P, correlacionando su expresión en un tejido vegetal dado con la concentración del nutriente.

A fin de ofrecer una herramienta molecular para la detección de deficiencia de P, aplicable a etapas tempranas de desarrollo, aun cuando no exista evidencia de síntomas, y que permita conocer el estado metabólico de la planta para modular su nutrición e incrementar la producción e inducir un mejor aprovechamiento de

los nutrientes. Para esto se propone el uso de ADNc de plantas con deficiencia de P inducida en un cultivo de importancia agrícola como el tomate.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuál es la composición de nucleótidos de los iniciadores y sonda para medir la expresión del gen *LePT1* mediante PCR digital en gotas en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad San Marzano con deficiencia inducida de P?
2. ¿Cuáles son las condiciones óptimas de cuantificación (temperatura de alineamiento, concentración de iniciadores y sonda de hibridación) en PCR digital en gotas del gen *LePT1* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad San Marzano bajo deficiencia de inducida de P?
3. ¿Qué características de desempeño (selectividad, precisión, exactitud, rango dinámico, LOD y LOQ) presenta el método de PCR digital en gotas para la cuantificación de la expresión de copias de *LePT1* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad San Marzano con deficiencia de inducida de P?

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Se realizó una investigación exploratoria, descriptiva y experimental durante el periodo de agosto de 2014 a julio de 2016 en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) Unidad Culiacán y en la empresa Bioteksa S.A de C.V. ubicada en Cd. Jiménez Chihuahua. En la etapa exploratoria se seleccionaron genes indicadores de deficiencia de P en plantas de tomate, reportados previamente en la literatura. Posteriormente se amplificó el gen *LePT1* en PCR punto final con iniciadores específicos (previamente portados) y ADNc de hoja de tomate (var. San Marzano) como molde. El producto de amplificación obtenido fue secuenciado y los resultados se usaron para el diseño de iniciadores y sonda de hibridación para la amplificación de *LePT1* en PCR digital en gotas. La segunda etapa, consistió en la optimización de la amplificación de *LePT1* en PCR digital en gotas con la metodología de superficie de respuesta, con tres factores (temperatura de alineamiento, concentración de iniciadores y concentración de sonda de hibridación) y dos variables de respuesta (resolución y variabilidad). En la tercera etapa, se evaluó el método mediante ensayos de características de desempeño (selectividad, precisión, exactitud, rango dinámico, LOD y LOQ) para demostrar su conformidad con los requisitos mínimos de funcionamiento exigidos en guías de validación de métodos analíticos.

JUSTIFICACIÓN

El análisis fisicoquímico vegetal aunado al análisis de suelo son las herramientas empleadas para el monitoreo de la nutrición de los cultivos. Sin embargo, como toda metodología presentan limitantes de cuantificación que dificultan identificar estados iniciales de una deficiencia, y generalmente son detectadas una vez que las plantas presentan síntomas, que pueden ser difícil de correlacionar, ya que más de un nutriente genera síntomas similares en una planta. En el ámbito científico se han estudiado el metabolismo de las plantas y las rutas metabólicas específicas de cada nutriente, elucidando cada uno de sus componentes (tanto genes como proteínas), así como el efecto morfológico y la modificación de la expresión génica que genera la deficiencia de éstos en la planta a nivel celular, permitiendo correlacionar la sobreexpresión de genes ante la deficiencia de un nutriente.

Lo anterior ha brindado información para el uso de la sobreexpresión de genes como indicadores de deficiencia, como herramienta complementaria a los análisis fisicoquímicos, que permita un panorama integral desde el estado metabólico celular, hasta la disponibilidad de nutrientes en el suelo, anticipando la aparición de síntomas de deficiencia. Con el fin de adecuar la nutrición de forma más efectiva y maximizar la producción de los cultivos.

Para el desarrollo de una metodología molecular de diagnóstico, se requiere el empleo de una técnica molecular que permita la cuantificación absoluta de éstos genes de interés en distintas matrices (tejidos vegetales), como la PCR digital en gotas. El uso de la técnica para el desarrollo y validación de una herramienta molecular de diagnóstico para la nutrición de plantas, permitirá ampliar su aplicabilidad al ámbito agrícola, ya que actualmente su uso se encuentra limitado a

las ciencias de la salud y a la generación de materiales de referencia para la detección de OGMs.

Emplear un cultivo de importancia molecular y relevancia económica para la región, en el desarrollo de ésta metodología, como lo es el tomate, permitirá extender a futuro su aplicabilidad a otros cultivos pertenecientes a la familia de las solanáceas, cuyos genomas se encuentran secuenciados y se tiene pleno conocimiento de la composición de la familia de genes *PT1*, donde se incluye *LePT1*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar y evaluar un método basado en la cuantificación absoluta de la expresión del transportador de fosfato 1 (*LePT1*) mediante PCR digital en gotas, en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con deficiencia inducida de P.

Objetivos Específicos

1. Diseñar iniciadores y sonda de hibridación para la amplificación del gen *LePT1* en PCR digital en gotas, con material genético de tomate (var. San Marzano) con deficiencia inducida de P.
2. Determinar las condiciones óptimas de amplificación (temperatura de alineamiento, concentración de iniciadores y sonda de hibridación) del gen *LePT1* en PCR digital en gotas, en plantas de tomate (var. San Marzano) bajo deficiencia de inducida de P.
3. Evaluar las características de desempeño (selectividad, precisión, exactitud, rango dinámico, LOD y LOQ) del método propuesto para la cuantificación de copias de *LePT1* mediante de PCR digital en gotas en plantas de tomate (var. San Marzano) con deficiencia inducida de P.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Experimental

Para el desarrollo, optimización y evaluación del método se utilizó como material experimental, ADNc de hoja de tomate var. San Marzano, obtenido de plantas con deficiencia inducida de P. Para el ensayo de aplicabilidad, se utilizó adicionalmente ADNc de tallo y raíz.

Tejido Vegetal

En el invernadero de la empresa Bioteksa S.A. de C.V., ubicada en Cd. Jiménez, Chihuahua, se hizo la siembra de semillas de tomate (var. San Marzano) en charolas plásticas de 72 cavidades (una semilla por cavidad) con mezcla de vermiculita y sustrato orgánico de musgo *spagnum* (peat moss). Se mantuvieron en el área de germinación hasta su emergencia. Después de una semana de acondicionamiento, se trasplantaron a bolis para hidroponía con sustrato inerte (lana de roca) en el área de invernadero. Se colocó una planta en cada orificio y se dispuso un gotero por planta para el suministro de agua y nutrientes. Se mantuvieron a condiciones de humedad relativa entre 60 y 80 % y temperatura de 25 a 35 °C hasta finalizar los muestreos. Las soluciones nutritivas empleadas en el estudio se elaboraron como se muestra en el Cuadro 3, tomando como referencia la mezcla de la nutrición balanceada reportada por Chen et al (2014). En las mezclas de nutrición deficiente se redujo el elemento de interés al 5 % respecto a la concentración utilizada en la nutrición balanceada. Las plantas deficientes de K⁺ y Ca²⁺ se destinaron solamente para el ensayo de selectividad. El control se mantuvo sólo con agua, para evidenciar los síntomas generales de la ausencia de nutrición.

Cuadro 3. Soluciones nutritivas empleadas para la producción de plantas de tomate.

Compuesto	Nut. Balanceada (mM)	Nut. Def. de Pi (mM)	Nut. Def. de K ⁺ (mM)	Nut. Def. de Ca ²⁺ (mM)
NH ₄ NO ₃	1.00	1.00	1.00	1.00
KNO ₃	2.00	2.00	0.10	2.00
Ca(NO ₃) ₂	0.50	0.50	0.50	0.025
CaCl ₂	0.25	0.25	0.25	0.012
MgSO ₄	0.50	0.50	0.50	0.50
Fe-EDTA	0.02	0.02	0.02	0.02
MnCl ₂	0.009	0.009	0.009	0.009
H ₃ BO ₃	0.046	0.046	0.046	0.046
ZnSO ₄	0.008	0.008	0.008	0.008
CuSO ₄	0.003	0.003	0.003	0.003
(NH ₄) ₂ MoO ₄	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003
NaH ₂ PO ₄	1.00	0.05	1.00	1.00

Se muestra la concentración de cada compuesto en las diferentes nutriciones empleadas para el riego de las plantas de tomate. Nut: nutrición. mM: milimolar. Mezclas basadas en la nutrición balanceada empleada por Chen et al., 2014.

Las plantas fueron distribuidas en el invernadero siguiendo un diseño experimental de bloques (tipo de nutrición) aleatorizados con tres réplicas para cada uno, constituidas por 32 plantas de tomate (Figura 9). Se efectuaron ocho muestreos: 1, 3, 6, 12, 24, 72, 120 y 168 h posteriores al inicio del suministro del riego de la nutrición indicada para cada bloque. En cada uno se retiró la planta de la lana de roca, se lavó ligeramente con agua destilada para retirar impurezas y trazas del sustrato, se fraccionó en los órganos vegetales (hoja, tallo y raíz) con cúter estéril y se colocaron por separado en bolsas plásticas etiquetadas. Por último, se congelaron en nitrógeno líquido para su preservación y traslado al Laboratorio de Biología Molecular y Genómica Funcional (BIMOGEN) de CIAD Culiacán. Las muestras fueron almacenadas en ultracongelador (Thermo Fisher, EUA) a - 80 °C, hasta su uso.

Def. Ca ²⁺ R1	Def. K ⁺ R2	Balancedo R2
Balanceda R1	Def. Ca ²⁺ R3	Def. K ²⁺ R1
Testigo R3	Balancedo R3	Def. Pi R3
Def. Pi R2	Testigo R2	Def. Ca ²⁺ R2
Def. K ⁺ R3	Def. Pi R1	Testigo R1

Figura 9. Distribución de los bloques para cada nutrición en el invernadero.

Las mezclas fueron preparadas por separado en tanques de 50 l con las concentraciones indicadas en el Cuadro 4, fueron suministradas por goteo (riego edáfico) y cada bloque contó con tres réplicas, compuestas por 32 plantas de tomate cada una. Def = deficiencia, R = réplica.

Macerado del Tejido Vegetal

Se esterilizó el área de trabajo, mortero y pistilo de porcelana con RNase Zap (Ambion, EUA) para eliminar actividad enzimática de ARNasas y ADNasas. Se colocó el tejido vegetal congelado en el mortero y se maceró con pistilo añadiendo constantemente nitrógeno líquido para evitar su descongelación hasta homogenizar por completo. Se colectó 0.1 g de tejido macerado en tubos plásticos de 1.5 ml (Eppendorf) previamente etiquetados e irradiados con luz ultravioleta, posteriormente se almacenaron en ultracongelador (Thermo Fisher, EUA) a - 80 °C.

Extracción de ARN

Para la extracción de material génico se siguió el protocolo modificado por Romero Castillo et al. (2015). A un tubo con 0.1 g de tejido macerado se le adicionó 1 ml de Trizol (Life Technologies, EUA), se homogenizó con pistilo e incubó a 22 °C durante 5 min. A continuación, se centrifugó en microcentrífuga (Thermo Fisher, EUA) a 12,000 x g por 10 min a 4 °C y el sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo nuevo, seguido de una incubación a 22 °C durante 5 min. Se adicionaron 200 µl de cloroformo al 100 % y se invirtió el tubo durante 15 s para homogenizar. Se incubó nuevamente a 22 °C durante 3 min y se centrifugó a 12,000 x g durante 15

min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante y se repitió el lavado con cloroformo. Se adicionó 250 µl de isopropanol al 100 % y 250 µl de solución de precipitado (citrato de sodio 0.8 M y cloruro de sodio 1.2 M en agua DEPC) (Anexo II). Se incubó a 22 °C durante 10 min, seguido de una centrifugación a 12,000 x g durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y adicionó 1 ml de etanol al 75 % (Anexo II). Se centrifugó a 7,500 x g por 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado con etanol. La pastilla obtenida se secó a 22 °C durante 5 min. Después se disolvió en 20 µl de agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) (Anexo II). Por último, se incubó en termobañó (Eppendorf, EUA) a 60 °C por 3 min.

Cuantificación e Integridad de ARN

El ARN total se cuantificó en NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) a una absorbancia de 260 nm. Primero se calibró el equipo con 1 µl de agua tratada con DEPC en la plataforma censorsa, después se colocó 1 µl de la muestra. El resultado de la lectura presenta la concentración obtenida en ng/µl. Su pureza se determinó mediante el cociente A_{260}/A_{280} (ácidos nucleicos/contenido proteico), esperando como valores aceptables entre 1.8 a 2.0.

La integridad se observó en gel de agarosa al 1 % en condiciones desnaturalizantes teñido con bromuro de etidio (Sigma Aldrich, EUA). El gel se preparó con 0.3 g de agarosa disueltos en 3 ml de MOPS 10 X y 27 ml de agua tratada con DEPC (Anexo III). Se colocaron en el gel 3 µl de la muestra mezclados con 1 µl de la solución amortiguadora de carga. La corrida electroforética se hizo en solución amortiguadora de corrida MOPS 1X a 70 V durante 60 min (Anexo III), y una vez finalizada, se observó y capturó la imagen en fotodocumentador (Chemidoc, Bio-Rad, USA).

Síntesis de ADN Complementario

Antes de la síntesis de ADN complementario (ADNc), las muestras fueron pretratadas con ADNasa empleando el kit Turbo DNA Free (Ambion, EUA) para

remover el ADN genómico de la muestra (Anexo IV). En un tubo de 0.6 ml se colocaron 10 µl del ARN extraído, 1 µl del amortiguador ADNasa y 1 µl de la enzima ADNasa. Se incubó a 37 °C durante 20 min, se adicionó 2 µl de reactivo inactivador de la enzima ADNasa, se agitó con vortex por 2 s y centrifugó a 10 000 g durante 2 min, el sobrenadante se colectó en un tubo nuevo.

La síntesis de ADN complementario se hizo con el kit Super Script III First Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen, EUA) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Anexo IV). Las reacciones de síntesis se prepararon como sigue: 500 ng de ARN, 1 µl de dNTP y 1 µl oligo dT. Se incubó la muestra durante 5 min a 65 °C y de inmediato se colocó en hielo durante 1 min. Posteriormente se preparó una solución con 2 µl de amortiguador RT 10 X, 4 µl de MgCl₂, 2 µl de DTT, 1 µl de RNA Out y 1 µl de SuperScript RT III y se adicionó a la mezcla ARN/oligos. Se colocó en un termociclador JM Mini (Bio-Rad, EUA), con el siguiente programa: 50 min a 50 °C, seguido de 5 min a 85 °C. Al terminar se colocó en hielo durante 1 min y se adicionó 1 µl de ARNasa H. Por último, se incubó a 37 °C durante 20 min y se almacenó en congelador (Torrey, México) a - 20 °C hasta su uso.

Amplificación del Gen Asociado a la Deficiencia de P

PCR Punto Final y Secuenciación

Se amplificó por en PCR punto final, un fragmento del gen *LePT1*, utilizando como plantilla ADNc de hoja de tomate (var. San Marzano), como lo describen (Liu et al., 1998). Se utilizó 1 µl de ADNc de hoja de tomate como plantilla y se le añadió la mezcla de reacción preparada con el kit GoTaq PCR Core System I (Promega, EUA) (Anexo IV) como se describe: 10 µl de solución amortiguadora, 1 µl de nucleótidos, 1 µl de iniciadores (F-ATATCAGCAGCAGCAGGTAAAGCA y R-AACACAACCAAGGACGATCAACGA), 0.2 µl de Taq Polimerasa, 1 µl de MgCl₂ y se adicionó agua GBM para un volumen final de 50 µl. Se colocó en el termociclador JM Mini (Bio-Rad, EUA) con el siguiente programa de amplificación:

desnaturalización a 95 °C por 2 min, alineamiento a 95 °C por 1 min, extensión con un gradiente de temperatura (64 a 61.4 °C) por 1 min durante 39 ciclos y se finalizó con 72 °C por 5 min. El empleo del gradiente para la amplificación se hizo con el fin de conocer la mejor temperatura de alineamiento de los iniciadores, eligiendo aquella en donde fue observable mayor acumulación de transcritos para cada gen. Para visualizar el producto de amplificación, se mezclaron 3 µl de producto con 1 µl de amortiguador de carga (Orange Blue 6X, Promega, EUA) y fueron colocados en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (Sigma Aldrich, EUA) (Anexo III). La electroforesis se efectuó a 70 V por 60 min con TAE 1X como solución amortiguadora de corrida (Anexo III). Al finalizar, se capturó la imagen del gel en fotodocumentador (Bio-Rad, EUA). Esperando visualizar un fragmento únicos de amplificación correspondiente a 146 pb.

Para la purificación del producto amplificado, se siguieron las instrucciones del fabricante del sistema Wizzard SV (Promega, EUA). Se colocaron el producto de amplificación y la solución de unión a membrana en volúmenes iguales en una minicolumna dispuesta en un tubo de colección, se incubó por 1 min a temperatura ambiente y centrifugó a 16,000 x g a 4 °C por 1 min. Se removió la minicolumna y descartó el líquido del tubo, se adicionaron 700 µl de solución de lavado de membrana y se centrifugó nuevamente. Se descartó el líquido del tubo, y se repitió el lavado con volumen de 500 µl de la solución. Se descartó el líquido y se centrifugó a 16,000 x g a 4 °C por 1 min con el tubo abierto, para evaporar residuos de etanol. Se transfirió la minicolumna a un tubo de 1.5 ml y se agregó 50 µl de agua GBM al centro de la columna. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó 16,000 x g a 4 °C por 1 min. Por último, se tomó una alícuota de 3 µl de la muestra purificada y se mezcló con 1 µl de solución amortiguadora de carga (Orange Blue 6X, Promega, EUA). Se colocaron en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (Anexo III), para verificar su integridad mediante electroforesis a 70 V por 60 min con TAE 1X como solución amortiguadora de corrida (Anexo III). Se envió una alícuota de 20 µl del producto purificado para su secuenciación en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del

CINVESTAV (Irapuato, Guanajuato.). Los resultados de secuenciación obtenidos, se analizaron mediante un alineamiento múltiple de nucleótidos en el BLAST del NCBI, construido con las secuencias reportadas por LANGEBIO y las reportadas previamente en tomate var. Heinz (No de acceso AF022873) por Liu et al. (1998), para verificar la homología entre variedades (Heinz y San Marzano) e identificar regiones conservadas como posibles flancos de alineamiento de los iniciadores y sonda de hibridación.

Diseño de Iniciadores y Sonda de Hibridación

El diseño de iniciadores y de la sonda de hibridación para los ensayos de cuantificación por PCR digital en gotas del gen *LePT1*, se efectuaron en el software Geneious versión 5.4, con los datos de secuenciación obtenidos y la secuencia de *LePT1* reportada en tomate var. Heinz (No. de acceso AF022873) se hizo un alineamiento, sobre el cual se generó el diseño de iniciadores y sonda de hibridación, con los siguientes supuestos de diseño: temperatura de alineamiento ≤ 60 °C, contenido de guanina y citosina de al menos 50 %, tamaño entre 19 y 24 pb y baja probabilidad de formación de dímeros entre sí. Para el diseño de la sonda de hibridación se utilizó una de las regiones conservadas localizadas mediante el alineamiento (zona intermedia, localizada entre los iniciadores), con temperatura de alineamiento 10 °C mayor a la de los iniciadores, longitud de 32 a 34 pb y contenido de CG mayor al 50 %. A la secuencia de la sonda se adicionó como fluoróforo la molécula HEXTM y BHQ (en inglés, Black Hole Quencher) como quencher; siendo éstos últimos, elementos necesarios para la amplificación en PCR digital en gotas. La síntesis de los iniciadores y la sonda de hibridación se efectuaron por medio de un proveedor (Sigma Aldrich, Toluca, México).

Cuantificación del Gen *LePT1* mediante PCR Digital en Gotas

La cuantificación absoluta de *LePT1*, se realizó mediante PCR digital en gotas con iniciadores y sondas de hibridación diseñados como se describe en líneas posteriores. La mezcla de reacción se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante como sigue: se mezclaron 10 µl de ddPCR Super Master Mix 2X (Bio-Rad, EUA), 1 µl (o lo necesario de acuerdo a la concentración del reactivo) de cada iniciador y de sonda de hibridación, 1 µl de ADNc de hoja de tomate del tratamiento control y la cantidad de agua GBM necesaria para un volumen final de 20 µl. Esta mezcla fue colocada en pocillos de un cartucho generador de gotas de 8 canales, mientras que en los pocillos correspondientes se adicionaron 70 µl de aceite y se colocó en el generador de gotas QX200 (Bio-Rad, EUA). La emulsión formada fue extraída del cartucho y transferida a una placa de 96 pozos para PCR, se cubrió su superficie con una hoja de aluminio y se introdujo en el sellador de placas PX1 (Bio-Rad, EUA) a 185 °C durante 5 s para su sellado; posteriormente se amplificó en un termociclador Veriti (Applied Biosystems, EUA) bajo el siguiente programa de amplificación: 3 min a 95 °C para la activación de la polimerasa; seguidos de 39 ciclos a 94 °C por 30 s para la desnaturalización, 59 °C por 1 min para el alineamiento y extensión, y por último, 98 °C por 10 min para inactivación de la enzima. Al término de la amplificación, la placa se colocó en el lector de gotas QX200 (Bio-Rad, EUA), los datos obtenidos se visualizaron y analizaron en el software QuantaSoft (Bio-Rad, EUA).

Optimización de las Condiciones de Amplificación en PCR Digital en Gotas

Para optimizar la reacción de amplificación en PCR digital en gotas de *LePT1*, se generó un diseño central compuesto de tres factores: temperatura de alineamiento, concentración de iniciadores y concentración de sonda de hibridación, midiendo como variables de respuesta: la resolución definida por la amplitud de la fluorescencia entre gotas positivas y negativas, y la desviación estándar de la medición (número de copias). En base a experimentos preliminares

realizados en el laboratorio, se definieron los siguientes límites bajo y alto para cada variable independiente: temperatura de alineamiento 59 y 61 °C, concentración de iniciadores 650 y 950 nM, y concentración de sonda de hibridación 200 y 300 nM.

La matriz de diseño generada con el paquete estadístico Minitab versión 17, se muestra en el Cuadro 5. Se hicieron tres repeticiones técnicas y un control sin molde (NTC, en inglés) a fin de determinar la variabilidad de los resultados. El diseño completo se corrió por triplicado.

Cuadro 4. Diseño central compuesto de tres factores para la optimización de la amplificación de LePT1 en PCR digital en gotas.

Orden	Corrida	Pt	Bloque	Variables Codificadas			Variables Naturales		
				A	B	C	Tm	Conc Iniciadores	Conc Sonda
2	1	1	1	1	-1	-1	61	650	200
3	2	1	1	-1	1	-1	59	950	200
14	3	-1	1	0	0	1.68	60	800	334.09
20	4	0	1	0	0	0	60	800	250
6	5	1	1	1	-1	1	61	650	300
19	6	0	1	0	0	0	60	800	250
15	7	0	1	0	0	0	60	800	250
18	8	0	1	0	0	0	60	800	250
11	9	-1	1	0	-1.68	0	60	547.73	250
12	10	-1	1	0	1.68	0	60	1052.26	250
16	11	0	1	0	0	0	60	800	250
17	12	0	1	0	0	0	60	800	250
5	13	1	1	-1	-1	1	59	650	300
13	14	-1	1	0	0	-1.68	60	800	165.91
4	15	1	1	1	1	-1	61	950	200
8	16	1	1	1	1	1	61	950	300
7	17	1	1	-1	1	1	59	950	300
1	18	1	1	-1	-1	-1	59	650	200
9	19	-1	1	-1.68	0	0	58.31	800	250
10	20	-1	1	1.68	0	0	61.68	800	250

Se muestra la matriz de análisis generada por el paquete Minitab versión 17 para un diseño central compuesto de tres factores y alfa de 1.68. Pt: tipo de punto. Tm: temperatura de alineamiento. Conc: concentración.

Para cada condición a evaluar se preparó una mezcla de reacción como se describe a continuación: se mezclaron 10 µl de la ddPCR Super Master Mix 2X, 1 µl de cada iniciador y sonda de hibridación a las concentraciones de prueba, 1 µl del ADNc de hoja de tomate con deficiencia y la cantidad de agua GBM necesaria para un volumen total de 20 µl. Esta mezcla fue dispensada en pocillos de un cartucho generador de gotas de 8 canales, mientras que en los pocillos correspondientes se adicionaron 70 µl de aceite; se procedió a la formación de gotas en el generador QX200 (Bio-Rad, EUA). La emulsión formada fue extraída del cartucho y colocada en una placa de 96 pozos para PCR misma que fue sellada en el sellador de placas PX1 (Bio-Rad, EUA) a 180 °C durante 5 s; la muestra fue amplificada en un termociclador Veriti (Applied Biosystems, EUA) bajo la siguiente programación: 3 min a 95 °C para la activación de la polimerasa, seguidos de 39 ciclos a 94 °C por 30 s para la desnaturalización, y 1 min a la temperatura indicada por el diseño para el alineamiento y extensión por último, 10 min a 98 °C para inactivar la enzima. Al terminar el proceso de amplificación, la placa se colocó en el lector de gotas QX200 (Bio-Rad, EUA) para la adquisición y análisis de datos mediante el software QuantaSoft (Bio-Rad, EUA).

Análisis Estadístico de los Datos de Optimización

Se verificaron los supuestos de normalidad, independencia y varianza constante, mediante los gráficos de residuos, y se realizó un análisis de regresión y análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para cada variable de respuesta. Las variables que no resultaron estadísticamente significativas, fueron eliminadas del modelo para incluir únicamente aquellos componentes con poder predictivo.

Las condiciones experimentales (temperatura de alineamiento, concentración de iniciadores y concentración de sonda) óptimas del método, fueron definidas como aquellas que resultaron en una menor variabilidad entre réplicas y una mayor diferencia de fluorescencia. Para ello el objetivo del análisis fue la búsqueda de mínimos para la desviación estándar y máximos para la resolución. Las

condiciones aproximadas como óptimas mediante el optimizador fueron corroboradas experimentalmente.

Validación de las Características de Desempeño del Método

Se efectuaron distintos ensayos para conocer los alcances y atributos de cuantificación, según lo establecido en distintas guías de validación tomadas como referencia para ésta etapa experimental (Ederveen, 2010; Hugget et al., 2013).

Rango Dinámico

Para medir la habilidad del método para producir resultados directamente proporcionales a la concentración del analito (ADNc del gen correspondiente) en las muestras analizadas (linealidad), se estimó mediante el coeficiente de correlación (≥ 0.98) y la precisión estándar por medio de la varianza de la regresión lineal de una curva construida a partir de 12 concentraciones de ADNc (de 0.09 a 200 ng de ADNc de hoja de tomate con deficiencia) efectuada por triplicado en tres días distintos, para cada gen evaluado.

Límite de Detección

Para determinar la cantidad de analito con la cual el método analítico detecta la presencia del mismo, al menos en el 95 % (<5 % de resultados falsos positivos) de las ocasiones (límite de detección), se hicieron seis diluciones de concentraciones bajas de ADNc (0.04 a 0.001 ng de ADNc de hoja de tomate con deficiencia) por triplicado en tres días diferentes y la concentración más baja evaluada en la que todas las réplicas resultaron positivas se definió como límite de detección.

Límite de Cuantificación

Para determinar la menor concentración dentro del rango dinámico en la que todas las réplicas, además de resultar positivas, mostraran una desviación estándar menor o igual al 25 %, con un porcentaje de exactitud del 75 a 125 % y un coeficiente de variación ≥ 0.98 .

Selectividad

Para demostrar la selectividad de los iniciadores y sonda, es decir demostrar que sólo hibridan *in silico* con genes específicos de tomate (selectividad teórica). Se hizo un BLAST con las secuencias de los iniciadores y la secuencia del gen *LePT1* reportado en tomate var. Heinz, para comprobar su complementariedad entre sí, ya que dicha característica le permite a los iniciadores hibridar con el material genético de la muestra y por acción de la polimerasa generar una nueva copia la secuencia durante cada ciclo (amplificación) de la PCR.

Para demostrar que el método es selectivo a la deficiencia del nutriente de interés (selectividad experimental) es decir, sólo presenta un elevado número de copias en muestras provenientes de plantas con deficiencia de P, se cuantificó la expresión de *LePT1* con molde de ADNc de hoja de tomate de 10 muestras con deficiencia de calcio y potasio, por triplicado.

Aplicabilidad

Para determinar el alcance del método en distintos tejidos de tomate var. San Marzano, se usó ADNc de hoja, tallo y raíz de plantas con la deficiencia y plantas con nutrición balanceada. Se cuantificó la expresión de los genes a través del tiempo (1, 3, 6, 12, 24, 72, 120 y 168 h), para comparar el efecto de la concentración de P en ambas nutriciones (balanceada y deficiente) con la expresión (número de copias) de *LePT1*. La amplificación de cada tratamiento se corrió por triplicado y con un NTC en los tres tejidos. Lo datos obtenidos fueron

analizados mediante correlación lineal en el paquete estadístico Minitab versión 17.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño de Iniciadores y Sonda de Hibridación para la Amplificación en PCR Digital en Gotas del Gen Indicador de Deficiencia de P

De la amplificación de *LePT1* en PCR punto final, se obtuvo un producto de aproximadamente 146 pb (Figura 10), resultado que concuerda con lo reportado por Liu et al. (1997; 1998). Ellos demuestran que la expresión del gen se induce a partir de 1 h con la deficiencia, y se mantiene hasta 7 d. Éste grupo de investigadores no definen las condiciones utilizadas para la amplificación de *LePT1*, puesto que utilizan Northern Blot, una técnica molecular distinta a la PCR, en donde no es necesario el empleo de un termociclador. Se utilizó un gradiente para variar la temperatura de alineamiento de los iniciadores para identificar la temperatura en la cual se estabiliza mejor la hibridación de los iniciadores con la cadena sencilla de ADNc, y promueve la acción de la enzima polimerasa durante la amplificación (Markoulatus et al., 2002), por lo que se genera mayor acumulación de copias. En la Figura 10 se muestran los productos de amplificación de las distintas temperaturas de alineamiento ensayadas en el gradiente, en donde, en todos los casos se muestra gran número de copias de *LePT1*. Para la secuenciación, se eligió el producto obtenido a 60 °C, misma condición que corresponde a la temperatura de alineamiento recomendada por el proveedor, de acuerdo a las características de las secuencias de los iniciadores sintetizados.

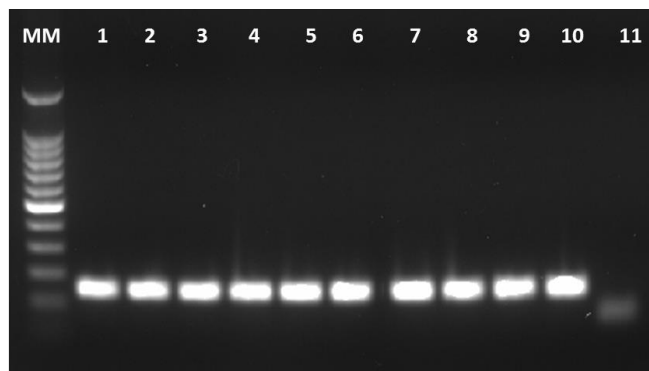


Figura 10. Productos de amplificación de LePT1 en hoja de tomate con deficiencia de Pi mediante PCR punto final.

El primer pocillo (MM) corresponde al marcador molecular de 100 pb y el último al NTC (no template control) En el resto de los pocillos, se muestran los productos de amplificación obtenidos a partir de 50 ng de ADNc de hoja de tomate con 7 d de deficiencia de Pi a diferentes temperaturas de alineamiento. 1-2: 64°C. 3-4: 63.5°C. 5-6: 62.7°C. 7-8: 61.4°C. 9-10: 60°C.

La secuencia obtenida del producto de amplificación del fragmento del gen *LePT1* en hoja tomate var. San Marzano con deficiencia de P inducida, mostró 100 % de identidad en la región 1560 a 1620 de la secuencia nucleotídica, con la de *LePT1* (No de acceso AF022873) reportada por Liu et al. (1998), en tomate var. OS4. Lo anterior muestra que éste, es un gen altamente conservado entre distintas variedades de tomate por lo que su uso posterior como marcador molecular de deficiencia de Pi podría extenderse a más de una variedad de tomate, además de la empleada en éste estudio.

En base a la secuencia obtenida del fragmento del gen *LePT1* en nuestro material vegetal de estudio, se diseñaron iniciadores y sonda de hibridación, ambos elementos necesarios para su amplificación en PCR digital en gotas, bajo los siguientes supuestos de diseño: temperatura de alineamiento de 60 °C para los iniciadores y 10 °C sobre la temperatura de los iniciadores para la sonda, longitud de 22 a 24 pb para iniciadores y hasta 30 pb para la sonda, sin formación de dímeros entre sí y con hibridación en la región 1560 a 1620 pb de la secuencia *LePT1* (No de acceso AF022873); obteniendo las siguientes secuencias:

Secuencia blanco: Fragmento del canal iónico de fósforo en tomate (*LePT1*)

Iniciador sentido: 5´ - GAGCTATGGTTGGTGCATTTGG -3´

Iniciador antisentido: 5´ - TGTGAACAGCATACCGAGGAAG -3´

Sonda de hibridación: HEX- ACGCCGGTTACCCTCCTGGCA -BHQ1

Longitud del amplicón o producto: 146 pb

Optimización de las Condiciones de Amplificación en PCR Digital en Gotas del Gen Indicador de Deficiencia de P

En esta sección se describen los resultados de optimización en PCR digital en gotas para el gen *LePT1* indicador de deficiencia de Pi en tomate.

El análisis de varianza y regresión lineal, arrojaron modelos con alto poder predictivo para las variables de respuesta monitoreadas, lo que indica que la variabilidad de éstas puede ser explicada en gran medida por los factores incluidos en los modelos construidos. Los tres factores incluidos (temperatura de alineamiento, concentración de iniciadores y concentración de sonda de hibridación) resultaron significativos en su forma lineal y cuadrática para el modelo de resolución (Cuadro 5). Mientras que, para la variabilidad, además de los términos lineales y cuadráticos, la interacción concentración de iniciadores - concentración de sonda, también resultó significativa (Cuadro 5).

A partir de lo observado en los gráficos de superficie de respuesta (Figura 11), se identificó un punto máximo para la variable de resolución y un punto mínimo para la variabilidad.

Cuadro 5. Resultados del análisis de regresión y ANOVA para la optimización de la amplificación de LePT1 en PCR digital en gotas.

Variable de respuesta	Valor P	Modelo	R ² Ajustada
Resolución			
Constante	0.000		
<i>Lineal</i>			
Temp de Alineamiento (A)	0.012		
Conc. Iniciadores (B)	0.185		
Conc. Sonda (C)	0.000		
		Res =- 1129992+37261A+20.95B+84.76C-	97.02 %
		311.6(A*A)-0.01335 (B*B)-0.1573 (C*C)	
<i>Cuadrático</i>			
AxA	0.000		
BxB	0.000		
CxC	0.000		
Falta de ajuste	0.021		
Variabilidad			
Constante	0.000		
<i>Lineal</i>			
Temp de Alineamiento (A)	0.080		
Conc. Iniciadores (B)	0.270		
Conc. Sonda (C)	0.078		
		Var =135204-4451A-	72.20 %
		9.96B+11.68C+36.1(A*A)+0.000538(B*B)	
		-0.01131(C*C)-0.00679(B*C)	
<i>Cuadrático</i>			
AxA	0.033		
BxB	0.430		
CxC	0.082		
<i>Interacciones</i>			
BxC	0.026		
Falta de ajuste	0.000		

Temp: temperatura. Res: resolución. Var: variabilidad. R²: coeficiente de determinación del modelo.

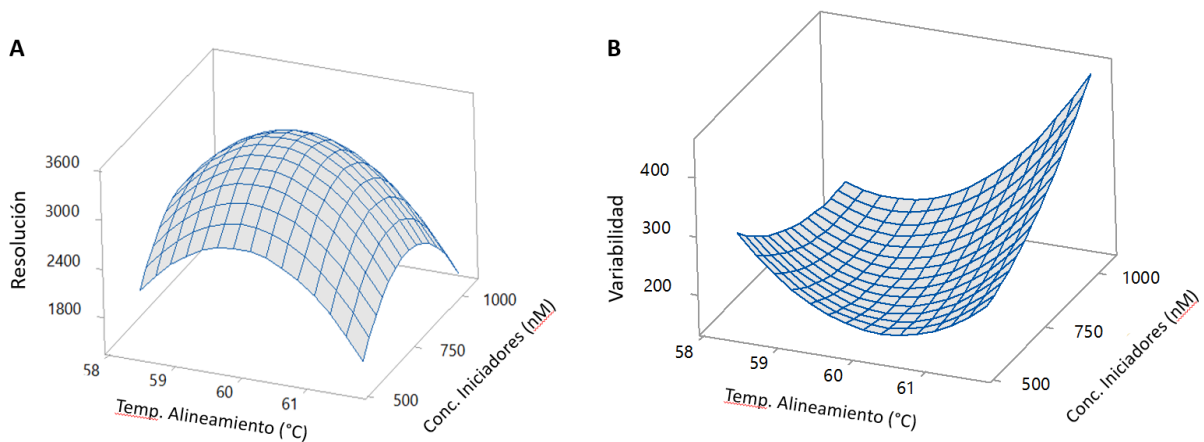


Figura 11. Gráficos de superficie de respuesta para las variables resolución y variabilidad.

Comportamiento de las variables predictivas para el modelo estadístico de optimización para la amplificación del biomarcador *LePT1* en PCR digital en gotas a una concentración de sonda fija de 250 nM en tomate.

Las condiciones óptimas fueron determinadas mediante la función de máxima deseabilidad. Las mejores condiciones de amplificación en PCR digital en gotas para *LePT1* en las que se obtiene una máxima resolución y una mínima variación, definidas por el optimizador fueron: 59.77 °C de temperatura de alineamiento, 782.16 nM de iniciadores y 269.53 nM de sonda (Figura 14).

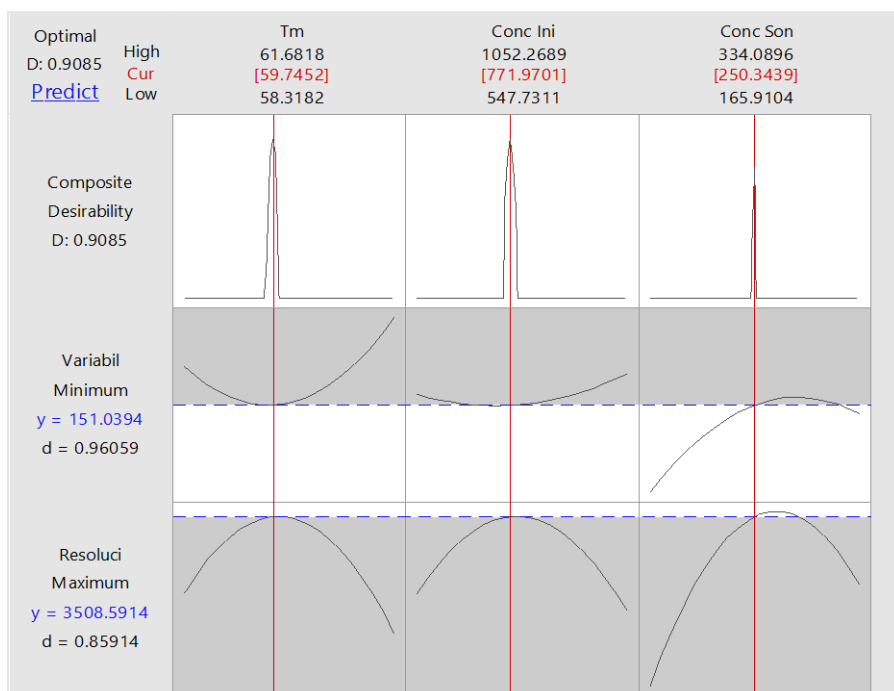


Figura 12. Gráfico de función de deseabilidad para la optimización de la amplificación de LePT1 en PCR digital en gotas.

Tm: temperatura de alineamiento. Conc Ini: concentración de iniciadores. Conc Son: concentración de sonda de hibridación. d: deseabilidad. D: deseabilidad compuesta.

Evaluación del Desempeño Método Propuesto

Para las pruebas de evaluación se trabajó con las condiciones de amplificación de *LePT1* optimizadas para su cuantificación mediante PCR digital en gotas y con ADNc de hoja de tomate con deficiencia inducida de P. En la evaluación de aplicabilidad del método se incluyó ADNc de tallo y raíz en los ensayos.

Especificidad Teórica y Experimental

La especificidad teórica de los iniciadores y la sonda de hibridación diseñados para los ensayos en PCR digital en gotas se evaluó mediante análisis *in silico* en la base de datos bioinformáticos del NCBI, en la herramienta BLAST, se generó una búsqueda de posibles secuencias de nucleótidos de hibridación para los

iniciadores diseñados. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> [enero 17, 2015]). Los iniciadores y sonda concuerdan con una lista extensiva de secuencias reportadas correspondientes al canal iónico de fósforo (*LePT1*) en otros cultivos (Cuadro 6), lo que demuestra que la hibridación de los iniciadores con la secuencia del gen presente en el material genético vegetal durante la amplificación, es específica para un fragmento de 146 pb del gen *LePT1* de tomate reportado por Liu et al. (1998).

Cuadro 6. Secuencias homólogas a *LePT1* de otros cultivos.

Cultivo	Nombre científico	Porcentaje de identidad con <i>LePT1</i>	Número de acceso
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	100	NM_001247432.2
Chícharo	<i>Pisum sativum</i>	100	GU721059.1
Papa	<i>Solanum tuberosum</i>	100	X98890.1
Carretón	<i>Medicago truncatula</i>	100	XM_013594438.1
Nabo	<i>Brassica rapa</i>	100	XM_013847366.1
Soya	<i>Glycine max</i>	95	NM_001253310.1
Naranja	<i>Citrus trifoliata</i>	95	JQ666160.1

Se muestran las secuencias del gen *PT1* en otros cultivos, con las cuales hibridan los iniciadores diseñados.

La especificidad experimental correspondiente al incremento de la expresión de *LePT1* en deficiencia de P, se cuantificó el gen en ADNc de hoja de tomate con deficiencia de K^+ y Ca^{2+} . Fueron definidas como positivas aquellas muestras en las que se cuantificara a partir de 20 copias de *LePT1*. En todos los casos fueron detectables copias de *LePT1* (Cuadro 7); sin embargo, el número de copias resulta menor respecto a las muestras con deficiencia de Pi. Por lo que la expresión cuantificada en las deficiencias de K^+ y Ca^{2+} no representa que haya la sobreexpresión de *LePT1* haya sido inducida por dichas deficiencias. Lo anterior demuestra que la sobreexpresión de *LePT1* es activada sólo por la deficiencia de Pi a la cual ha sido correlacionada en estudios mencionados previamente. Liu et al. (1998), reportan en sus ensayos de Northern Blot la ausencia de transcritos de *LePT1* en otras deficiencias como K^+ , Fe y N. Sin embargo, al emplear en nuestros ensayos una herramienta con mayor sensibilidad de detección (PCR

digital en gotas) permite cuantificar un valor mínimo de copias en otras deficiencias.

Cuadro 7. Resultados de especificidad para la detección de deficiencia de fósforo mediante la cuantificación de copias de *LePT1* en PCR digital en gotas.

Matriz evaluada	Código	Deficiencia inducida	Detección de <i>LePT1</i>	Copias	Gotas positivas
Tomate	C11-1	Calcio	-	9	4
	C11-2		-	6.2	3
	C12-1		-	12	6
	C12-2		-	10.4	7
	C21-1		-	3.6	1
	C21-2		-	3.4	1
	C23-1		-	0	0
	C23-2		-	8	1
Tomate	K12-1	Potasio	-	14	11
	K12-2		-	8	23
	K22-1		-	14	11
	K22-2		-	11.8	6
	K23-1		-	6.6	3
	K23-2		-	5.4	3

Limite de Detección (LOD)

Este criterio fue definido como la menor concentración evaluada en que todas las réplicas resultaran positivas (Broeders, 2014). El LOD estimado para el método fue de 0.002 ng de ADNc total, lo cual muestra un límite bastante bajo correspondiente a un intervalo de 1 a 2 copias del gen indicador de deficiencia de fósforo *LePT1*. En estudios anteriores de validación de los atributos de una metodología para la detección de OGMs, Félix Urquidez et al. (2015), también reportan un límite de detección bajo: de 0.030 a 0.039 % correspondiente a 10-12 copias del gen *Tnos*, lo anterior recalca la capacidad de la sensibilidad detector de fluorescencia del lector de gotas de la ddPCR para la cuantificación de pocas copias de un gen determinado en una muestra dada.

Límite de Cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación permite conocer la cantidad mínima en que la medición del número de copias es certera y precisa (Félix Urquidez et al., 2015). En el contexto de nuestro método, nos permite conocer la mínima cantidad de ADNc que puede emplearse de una muestra desconocida. En base a los resultados obtenidos, se declaró como LOQ 0.09 ng de ADNc de hoja de tomate correspondientes a 16 copias de *LePT1*.

Rango Dinámico

Nos permite conocer el intervalo de concentraciones de ADNc en que la respuesta del método mantiene un comportamiento lineal ($R^2 \geq 0.99$), así como el máximo y mínimo valor de copias que pueden ser cuantificadas con la metodología en hoja de tomate con deficiencia de fósforo. De las distintas concentraciones de ADNc evaluadas se definió como rango dinámico de 0.09 a 50 ng, correspondientes a 13 y 2900 copias de *LePT1* respectivamente (Figura 13). Lo anterior refiere la ventaja de una amplia gama de cuantificación de la metodología, sobre todo porque se desconoce el número inicial de copias del gen en el material genético empleado. En muestras de soluciones nutritivas balanceadas o con menor deficiencia que la probada, se esperaría una menor cuantificación de copias totalmente detectable por el rango dinámico evaluado.

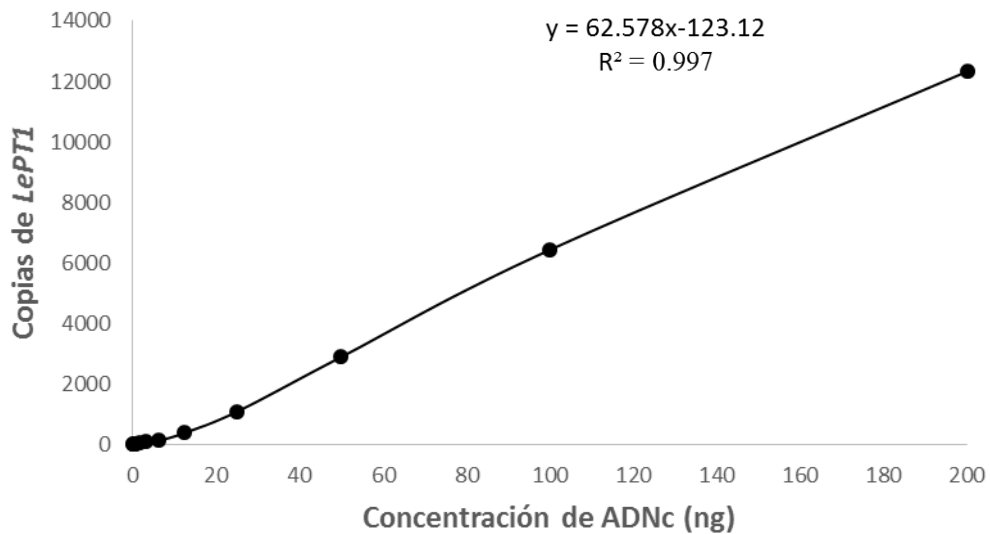


Figura 13. Rango dinámico evaluado para la cuantificación de *LePT1* por PCR digital en gotas.

Rango dinámico para detección de *LePT1* mediante PCR digital en gotas en plantas de tomate con deficiencia de P.

Aplicabilidad

De acuerdo a la expresión evaluada de *LePT1* a través del tiempo, se observó que el número de copias incrementa a partir de 1 h en plantas con deficiencia de Pi en todos los tejidos evaluados (hoja, tallo y raíz). La expresión máxima en hoja se detectó a las 3 h con deficiencia de Pi (aprox. 34 000 copias de *LePT1*) y a partir de 6 h la expresión comienza a decrecer y así se mantiene hasta las 72 h (tiempo final evaluado) (Figura 16). El comportamiento observado en tallo fue similar al de hoja, la expresión máxima se ve a las 3 h y disminuye a partir de las 6 h. Mientras que, en raíz la respuesta a la deficiencia de P arrojó menor número de copias cuantificadas del biomarcador respecto a los tejidos de hoja y tallo. A pesar de registrar menor expresión, en el tejido de raíz es en el cual se mantuvo por mayor tiempo la respuesta a la deficiencia ya que, el número de copias del biomarcador comienza a disminuir a partir de las 24 h con la deficiencia de P (Figura 14).

Lo anterior confirma que el método puede ser aplicable a los tres tejidos de la planta: hoja, tallo y raíz; sin embargo, cada uno requiere generar intervalos de

expresión del biomarcador *LePT1* ya que en todos se comporta de distinta manera la respuesta a partir de que se induce la deficiencia.

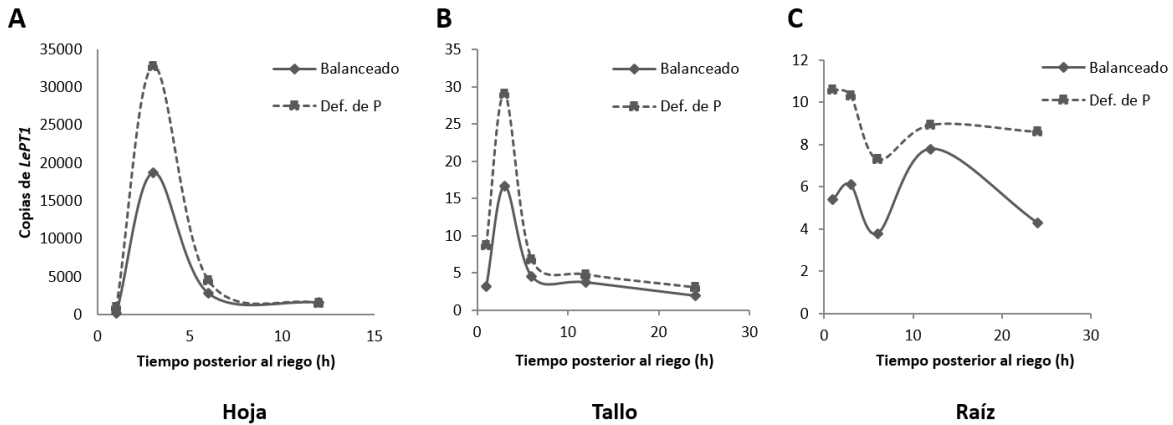


Figura 14. Expresión de *LePT1* en hoja, tallo y raíz de tomate con deficiencia de P a distintos intervalos de tiempo.

Perfiles de expresión de *LePT1* en distintos órganos de tomate con deficiencia inducida de P. A) Expresión en hoja, B) expresión en tallo y C) expresión en raíz.

El comportamiento de la expresión del gen en los distintos tejidos de la planta muestra su participación fisiológica en la absorción y distribución de fósforo en los todos los tejidos de la planta (Chen et al., 2014). Las diferencias del número de copias entre los tejidos son debidas al papel fisiológico que desempeñan cada uno de éstos. La respuesta rápida a la deficiencia de P induce la expresión de *LePT1* en los pelos absorbentes de raíz e incrementa el desarrollo de raíces terciarias para incrementar el área de absorción de la planta, una vez expresado el gen, se genera el canal iónico el cual se mantiene funcional de forma permanente (Liu et al., 1997). El comportamiento de la expresión presentado en la Figura 16C, muestra que a partir de la hora con nutrición deficiente de P, la planta censa la baja concentración de P, e incrementa inmediatamente la expresión del gen, llega a una zona de adaptación y conforme continua la deficiencia y el desarrollo de nuevos pelos radiculares, activa el mecanismo de expresión nuevamente. En tallo

(Figura 16B) y hoja (Figura 16A) se muestra un comportamiento similar en la expresión de *LePT1*, la cual incrementa drásticamente a las 3 h con deficiencia de P y a partir de las 4 h disminuye hasta volver a un estado basal. A diferencia de lo que sucede con el órgano de raíz, una de los síntomas de deficiencia de P que desarrollan las plantas es la disminución del desarrollo de tallo e incrementa la senescencia de hojas (Tjalling, 2006), por lo que el mecanismo de sobreexpresión de *LePT1* una vez cesada su actividad (6 h), no se vuelve a inducir la expresión del gen. Es común ver una diferencia significativa entre las copias de *LePT1* en el tejido de hoja, ya que es el órgano con mayor área, por ende presenta mayor actividad celular y mantiene una expresión más alta que tallo y raíz.

CONCLUSIONES

Se logró el desarrollo, optimización y evaluación satisfactoria de un método para la cuantificación de la expresión del gen transportador de fosfato 1 (*LePT1*) en plantas de tomate con deficiencia inducida de P. Hasta donde se sabe es el primer trabajo que reporta el desarrollo de un método de PCR digital con dicha aplicabilidad y que describe a detalle la optimización de la amplificación con el método de superficie de respuesta. De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que:

- La constitución de la secuencia de los iniciadores y sonda de hibridación para la cuantificación de *LePT1* por PCR digital en tomate con deficiencia inducida de P son: iniciador sentido-GAGCTATGGTTGGTGCATTTGG, iniciador antisentido-TGTGAACAGCATACCGAGGAAG y sonda-HEX-ACGCCGGTTACCCTCCTGGCA -BHQ1.
- Las condiciones óptimas de amplificación del gen *LePT1* en ddPCR son: 59.77 °C, 782.16 nM de iniciadores y 269.53 nM de sonda de hibridación.
- La técnica puede trabajar dentro de un rango dinámico de 1 a 40 ng de ADNc de tomate, que comprende de 16 a 2900 copias de *LePT1*. Se declaró como LOQ 0.09 ng de ADNc (correspondiente de 6 a 9 copias de *LePT1*) y como LOD 0.002 ng de ADNc (de 1 a 6 copias de *LePT1*).
- *LePT1* puede ser aplicable como indicador de deficiencia de P en los tejidos de hoja, raíz y tallo. Su sobreexpresión es específica a la deficiencia de P en tomate.

REFERENCIAS

Ai P, Sun S, Zhao J, Fan X, Xin W, Guo Q L, Shen Q, Wu P, Miller AJ, Xu G. 2009. Two rice phosphate transporters, OsPth1;2 and OsPht1;6, have different functions and kinetic properties in uptake and translocation. *Plant Journal* 57:798-809

AOAC. 1998. Metals in plants and pet foods. Atomic absorption spectrophotometric method. AOAC Official Method 975.03

Aoki K, Yano K, Suzuki A, Kawamura S, Sakurai N, Suda K, Kurabayashi A, Suzuki T, Tsugane T, Watanabe M, Ooga K, Torii M, Narita T, Shin-i T, Kohara Y, Yamamoto N, Takahashi N, Watanabe Y, Egusa M, Kodama M, Ichinose Y, Kikuchi M, Fukushima S, Okabe A, Arie T, Sato Y, Yazawa K, Satoh S, Omura T, Ezura H, Shibata D. 2010. Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar micro-tom, a reference system for the solanaceae genomics. *BMC Genomics* 11:210

Ayadi A, David P, Arrighi JF, Chiarenza S, Thibaud MC, Nussaume L, Marin E. 2015. Reducing the genetic redundancy of arabidopsis PHOSPHATE TRANSPORTER1 transporters to study phosphate uptake and signaling. *Plant Physiology* 167:1511-1526

Bahrtdt C, Krech AB, Wurz A, Wulff D, 2010. Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396:2103-2112

Baldwin JC, Karthikeyan AS, Raghothama KG. 2001. LEPS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiology* 125:728-737

Bio-Rad, 2011. Droplet digital PCR. Applications guide. Consultado en http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf el 10 de diciembre de 2015

Bosse D y Köck M. 1998. Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. *Plan, Cell and Environment* 21:325-332

Bridges D y Moorhead GBG. 2004. 14-3-3 Proteins: a number of functions for a numbered protein. *Science's stke* 242:1-8

Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, Roosens N, Morrisset D. 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology* 37:115-126

Brown PH, Ho HD. 1987. Biochemical properties and hormonal regulation of barley nuclease. *European Journal of Biochemistry* 168:357-364

Buchanan B, Wilhelm G, Russell J. 2002. Responses to abiotic stresses. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 1^{ra} Edición. 1158-1203p.1408pp

Burns MJ, Burrell AM, Foy, 2010. The applicability of digital PCR for the assessment of detection limits in GMO analysis. *European Food Research and Technology* 231:353-362

Cadahía C, Eymar E, Frutos I. 2009. El análisis de savia como método de diagnóstico nutricional. *Revista Agropecuaria* 922:724-728

Castellanos JZ. 2009. Manejo de la fertirrigación del tomate en suelo. *Manual de Producción de Tomate en Invernadero*. Intagri S.A. México. 458pp. 187-204p

Chen A, Chen X, Wang H, Liao D, Gu M, Qu H, Sun S, Xu G. 2014. Genome-Wide investigation and expression analysis suggest diverse roles and genetic redundancy of Pht1 family genes in response to Pi deficiency in tomato. *BMC Plant Biology* 14:61-76

Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (CCMAS), 2010. Directrices sobre criterios de rendimiento y validación de los métodos de detección, identificación y cuantificación de secuencias específicas de ADN y proteínas específicas en los alimentos. (Rep. No. CAC/GL 74-2010. 22pp) Consultado el 10 de enero de 2016 en http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/gmfp/resources/CXG_074e.pdf

Cushman JC y Bohnert H. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Plant Biology* 3:117-124

Ederveen J. 2010. A Practical approach to biological assay validation. Progress Project Management & Engineering. (Rep. No. 08090. 106pp) Consultado el 20 de diciembre de 2015 en <http://edraservices.nl/documenten/Assay-validation-P08090.pdf>

Etchevers JB. 2000. Técnicas de diagnóstico útiles en la medición de la fertilidad del suelo y el estado nutrimental de los cultivos. *Terra Latinoamericana* 17:209-219

FAO. 1999. Guía para el manejo eficiente de nutrición de plantas. Dirección de Fomento de Tierras y Aguas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. Roma, Italia. 30pp

FAOSTAT. 2015. Food and agriculture organization of the United Nations Statistics Division. Consultado el 22 de septiembre de 2015 en <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>

Félix Urquidez D, Pérez Urquiza M, Valdez Torres JB, León Félix J, García Estrada R, Acatzi Silva A. 2015. Development, optimization and evaluation of a duplex droplet digital PCR assay to quantify the *Tnos/hmg* copy number ratio in genetically modified maize. *Analytical Chemistry* 88:812-819

Filho EG y Sodek L. 1988. Effect of salinity on ribonuclease activity of *Vigna unguiculata* cotyledons during germination. *Journal of Plant Physiology* 132:307-311

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step by step protocol. *BioTechniques* 23:504-511

Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR, Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shah PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen JC, Wittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RH, So AP, Dube S, Klint Rose A, Montesclaros L, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP, White HE, Regan JF, Karlin-Neumann GE, Hindson CM, Saxonov S, Colston BW. 2011.

High-Throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry* 83:8604-8610

Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, Hellemans J, Kubista M, Mueller RD, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley JL, Vandesompele J, Wittwer CT, Bustin SA. 2013. The digital MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clinical Chemistry* 59(6):892-902

Kalaji HM, Oukarroum A, Alexandrov V, Kouzmanova M, Brestic M, Zivcak M, Samborska IA, Cetner MD, Allakhverdiev SI, Goltsev V. 2014. Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by *in vivo* chlorophyll a fluorescence measurements. *Plant Physiology and Biochemistry* 64:16-25

Kisko Mushtak, Bouain Nadia, Rouached Aida, Choudhary Sikander Pal, Rouached Hatem. 2015. Molecular mechanisms of phosphate and zinc signaling crosstalk in plants: Phosphate and zinc loading into root xylem in arabidopsis. *Environmental and experimental botany* 114:57-64

Köck M, Löffler A, Abel S, Glund K. 1995. cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato. *Plant Molecular Biology* 27:477-485

Liu C, Muchhal US, Raghothama KG. 1997. Differential expression of TPS11, a phosphate starvation-induced gene in tomato. *Plant Molecular Biology* 33:867-874

Liu C, Muchhal US, Uthappa M, Konowicz AK, Raghothama KG. 1998. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiology* 116:91-99

Liu J, Versaw WK, Pumplin N, Gomez SK, Blaylock LA, Harrison MJ. 2008. Closely related members of the *Medicago truncatula* PHT1 phosphate transporter gene family encode phosphate transporters with distinct biochemical activities. *Journal of biological Chemistry* 283(36):24673-24681

Löffler A, Abel S, Jost W, Beintema JJ y Glund K. 1992. Phosphate-regulaed induction of intracellular ribonucleasas in cultured tomato (*Lycopersicon esculatum*) cells. Plant Physiology 98:1472-1478

Markoulatos P, Siafakas N, Moncany. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. Clinical Laboratory Analysis 16:47-51

Miotke L, Lau BT, Rumma RT, Ji HP. 2005. High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR. Analytical Chemistry 86:2618-2624

Montgomery DC. 2008. Métodos de superficies de respuesta y otros enfoques para la optimizacion de procesos. Diseño y análisis de experimentos. 2^{da} Edición. 427-510p. 686pp

Morisset D, Štebih D, Milavec M, Gruden K, Žel Jana. 2013. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. PLOS one 8(5):1-9

Mueller LA, Solow TH, Taylor N, Skwarecki B, Buels R, Binns J, Lin C, Wright MH, Ahrens R, Wang Y, Herbst EV, Keyder ER, Menda N, Zamir D, Tanksley SD. 2005a. The SOL Genomics Network. A comparative resource for solanaceae biology and beyond. Plant Physiology 138:1310-1317

Mueller LA, Tanksley SD, Giovannoni JJ, Eck JV, Stack S, Choi D, Kim BD, Chen M, Cheng Z, Li C, Ling H, Xue Y, Seymour G, Bishop G, Bryan G, Sharma R, Khurana J, Tyagi A, Chattopadhyay D, Singh NK, Stiekema W, Lindhout P, Jesse T, Lankhorst RK, Bouzayen M, Shibata D, Tabata S, Granell A, Botella MA, Giuliano G, Frusciante L, Causse M, Zamir D. 2005b. The tomato sequencing project. The first cornerstone of the International Solanaceae Project (SOL). Comparative and Functional Genomics 6:153-158

NOM-021-RECNAT-2000. 2002. Norma oficial mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Consultado el 15 de abril de 2015 en http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=717582&fecha=31/12/2002

Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, Emslie KR. 2011. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Analytical Chemistry* 84:1003-1011

Pinto E y Ferreira I. 2015. Cation transporters/channels in plants: Tools for nutrient biofortification. *Plant Physiology* 179:64-82

Qin J, Jones RC, Ramakrishnan R, 2008. Studying copy number variations using a nanofluidic platform. *Nucleic Acids Research* 36:116

Rae AL, Cybinski DH, Jarmey JM, Smith FW. 2003. Characterization of two phosphate transporters from barley; evidence for diverse function and kinetic properties among members of the Pht1 family. *Plant Molecular Biology* 53:26-36

Raghothama KG. 2000. Phosphate transport and signalling. *Plant Biology* 3:182-187

Ramaiah M, Jain A, Baldwin JC, Karthikeyan AS, Raghothama KG. 2011. Characterization of the phosphate starvation-induced *Glycerol-3-Phosphate Permease* gene family in arabidopsis. *Plant Physiology* 157:729-291

Richardson AE. 2009. Regulating the phosphorus nutrition of plants: Molecular biology meeting agronomic needs. *Plant and Soil* 322:17-24

Rodríguez MNM, Alcántar GG, Aguilar AS, Etchevers JDB, Santizó JAR. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra Latinoamericana* 16:135-141

Rodríguez O y Rodríguez V. 2000. Desarrollo, determinación e interpretación de normas DRIS para el diagnóstico nutricional en plantas. *Revista de la Facultad de Agronomía Luz* 17:449-470

Romero Castillo A, Choudhury SR, León Félix J, Pandey S. 2015. Characterization of the heterotrimeric G-protein family and its transmembrane regulator from capsicum (*Capsicum annum* L.). *Plant Science* 234:97-109.

SAGARPA. 2015. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Consultado el 22 de septiembre de 2015 en: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B466.aspx>

Schachtman DP y Shin R. 2007. Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Plant Biology* 58:47-69

SIAP. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultado el 22 de septiembre de 2015 en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>

Sumner ME. 2000. Diagnóstico de los requerimientos de fertilización de cultivos intensivos. Ponencia presentada en el VII Congreso Argentino de Simebra Directa, AAPRESID. Mar de Plata. 16 al 18 agosto 2000

Taiz L. y Zeiger E. 2010. Mineral Nutrition. *Plant Physiology*. Sinauer Associates. 5^{ta} Edición. 107-130p. 778pp

Thi Hue KD, Tuan TV, Nguyen Thi HT, Nguyen Bich CT, Le Anh HH, Wills BA, Simmons CP. 2011. Validation of an internally controlled one-step Real-Time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. *Virological Methods* 177:168-173

Thompson M, Ellison SL, Wood R. 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. IUPAC Technical Report. *Pure and Applied Chemistry* 74:835-855

Tjalling H. 2006. Guía de manejo de nutrición vegetal de especialidad. Tomate. SQM S.A. Santiago, Chile. Consultado el 23 de noviembre de 2015 en http://www.sqm.com/Portals/0/pdf/cropKits/SQM-Crop_Kit_Tomato_L-ES.pdf

Valasek MA y Repa JJ. 2005. The power of Real-Time PCR. *Advances in Physiology Education* 29:151-159

Waiblinger HU, Ernst B, Anderson A, Pietsch K, 2008. Validation and collaborative study of a P35S and *T-nos* duplex real-time PCR screening method to detect genetically

modified organisms in food products. European Food Research and Technology 226:1221-1228

Xu W, Shi W, Jia L, Liang J, Zhang J. 2012. TFT6 and TFT7, two different members of tomato 14-3-3 gene family, play a distinct roles in plant adaptation to low phosphorus stress. Plant, Cell & Environment 35:1393-1406

Xu WF y Shi WM. 2006. Expression profiling of the 14-3-3 gene family in response to salt stress and potassium and iron deficiencies in young tomato (*Solanum lycopersicum*) roots: Analysis by Real-Time RT-PCR. Annals of Botany 98:965-974

Yuan H y Liu D. 2008. Signaling components involved in plant response to phosphate starvation. Journal of Integrative Plant Biology 50(7):849-859

ANEXOS

Anexo 1. Lista de Abreviaturas

°C: Grados Celsius

μl: Microlitro

μM: Micromolar

ADN: Acido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

Cq: Ciclo de cuantificación (del inglés, Quantification cycle)

d: Días

ddPCR: PCR digital en gotas (del inglés, digital droplet PCR)

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfato (del inglés, nucleoside triphosphates)

dT: Desoxitimina (del inglés, deoxythymine)

DTT: Ditiotreitól (del inglés, dithiothreitol)

etc: Etcétera

g: Gramos

g: Gravedades

GBM: Grado biología molecular

GC: Citocina - Guanina

h: Horas

ha: Hectáreas

LOD: Límite de cuantificación

Logs: Logaritmos base 10

LOQ: Límite de detección

mdp: Millones de pesos

min: Minutos

ml: Mililitro

mM: Milimolar

MMt: Millones de toneladas

ng: Nanogramo

nm: Nanómetros

nM: Nanomolar

OGMs: Organismos genéticamente modificados

I.e.: Por ejemplo (del inglés, in example)

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés, *Polimerase Chain Reaction*)

pH: Potencial hidrógeno

ppm: Partes por millón

RT: Retrotranscripción (del inglés, retrotranscription)

s: Segundos

t: Toneladas

TAE: Solución de tris, acetato y EDTA

UV-VIS: Ultravioleta visible

V: Volts

Var: Variedad

Anexo 2. Preparación de Soluciones para la Extracción de ARN

Agua DEPC

A un litro de agua destilada se le adiciona 1 ml de reactivo dietilpirocarbonato (DEPC). Se deja en agitación (con agitador magnético) toda la noche a temperatura ambiente para homogenizar la solución. Por último se esteriliza la solución en olla de presión.

Etanol al 75%

En un matraz aforado de 100 ml, se colocan 75 ml de alcohol al 95% y se afora con agua tratada con DEPC hasta la marca. Se mezcla la solución hasta homogenizar y se almacena a temperatura ambiente hasta su uso.

Solución de precipitado

Se pesan 2.35 g de citrato de sodio (para una concentración 8 M en la solución final) y 0.7 g de cloruro de sodio (para una concentración 1.2 M en la solución final), se transfieren a un matraz aforado de 10 ml. Se agrega agua tratada con DEPC hasta la marca de aforo. Se agita la solución hasta homogenizar los componentes y se almacena en refrigeración hasta su uso.

Anexo 3. Preparación de Soluciones Amortiguadoras y Gel de Agarosa para Electroforesis de ARN y ADN

MOPS 10X

Se pesan 2.09 g del reactivo MOPS (3-morfolinopropano-1-ácido sulfónico) y se agregan a un matraz aforado de 50 ml con 30 ml de agua tratada con DEPC. Se ajusta el pH de la solución a 7, con hidróxido de sodio. Posteriormente se adiciona 10 ml de acetato de sodio 1M y 1 ml de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.5 M y pH de 8. Se adiciona agua tratada con DEPC hasta la marca de aforo. Se mezcla hasta homogenizar los componentes y se almacena a temperatura ambiente hasta su uso.

MOPS 1X (Buffer de corrida para electroforesis de ARN)

Se colocan 100 ml de MOPS 10X en un matraz aforado de 1000 ml. Se afora hasta la marca con agua tratada con DEPC. Se mezcla hasta homogenizar la solución y se almacena a temperatura ambiente.

Gel de agarosa al 1% para ARN

Se pesan 1 g de agarosa y se coloca en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se adicionan 10 ml de MOPS 10X y 90 ml de agua tratada con DEPC. Se coloca el matraz 60 s en el microondas para homogenizar con calor. Se deja enfriar la mezcla por unos minutos y se agregan 3 µl de bromuro de etidio, se mezcla ligeramente para homogenizar. Se vierte la mezcla en el molde para electroforesis y se deja reposar hasta gelificar.

TAE 1X (Buffer de corrida para electroforesis de ARN)

Se colocan 100 ml de TAE 10X en un matraz aforado de 1000 ml. Se afora hasta la marca con agua tratada con DEPC. Se mezcla hasta homogenizar la solución y se almacena a temperatura ambiente

Gel de agarosa al 1% para ADN

Se pesan 1 g de agarosa y se coloca en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se adicionan 10 ml de TAE 10X y 90 ml de agua tratada con DEPC. Se coloca el matraz 60 s en el microondas para homogenizar con calor. Se deja enfriar la mezcla por unos minutos y se agregan 3 µl de bromuro de etidio, se mezcla ligeramente para homogenizar. Se vierte la mezcla en el molde para electroforesis y se deja reposar hasta gelificar.

Anexo 4. Descripción de kits

Turbo DNA - free (Ambion, EUA, Cat. AM1907)

Componente	Cantidad (µl)	Volumen requerido para una reacción (µl)
Turbo DNase (2 U/µl)	120	1
Sol. Amortiguadora Turbo DNase 10X	600	0.1 volumen
Reactivo Inactivador de DNAsa	600	0.1 volumen
Agua libre de nucleasas	1.75	NE

Los reactivos deben permanecer almacenados a - 20 °C a excepción del agua libre de nucleasas que puede almacenarse a temperatura ambiente. U: unidades. NE: no se especifica.

SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, EUA, Cat 18080-051)

Componente	Cantidad (µl)	Volumen requerido para una reacción (µl)
Mezcla de DNTP (10 mM)	250	2
Oligo dT ₂₀ (50 µM)	50	1
Sol. Amortiguadora RT 10X	1	2
MgCl ₂ (25 mM)	500	4
DTT (0.1 M)	250	2
RNAsa OUT (40 U/µl)	100	1
SuperScript III RT (200 U/ µl)	50	1

Todos los reactivos deben permanecer almacenados a - 20 °C. U: unidades.

GoTaq PCR Core System I (Promega, EUA, Cat M7660)

Componente	Cantidad (µl)	Volumen requerido para una reacción (µl)
GoTaq ADN Polimerasa (250 U)	50	0.25
Sol. Amortiguadora Flexi GoTaq 5X sin colorante	2 x 1 ml	10
MgCl ₂	1.2 ml	2.0 a 8.0
Mezcla de nucleótidos para PCR (10 mM)	200	1
Agua libre de nucleasas	1 ml	Lo necesario para un vol. final de 50 µl

Todos los reactivos deben permanecer almacenados a - 20 °C. U: unidades.