



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

**EFFECTO DEL CAMPO ELÉCTRICO DE BAJA INTENSIDAD EN LA EMERGENCIA, EL CRECIMIENTO TEMPRANO Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS A LA GERMINACIÓN EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* var. *Saladette*).**

POR:

IBQ. GEMA CÁRDENAS FLORES

TESIS PROPUESTA A LA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

Director de tesis:

DR. ULISES MIGUEL LÓPEZ GARCÍA

Co-director de tesis:

DRA. MARTINA ALEJANDRA CHACÓN LÓPEZ



Tepic, Nayarit., **17/mayo/2022**  
CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS  
No. Oficio CMCA 2022-11.

**MC LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS**  
**JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INV.**  
**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto comunico a usted que el Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos ha designado como revisores de la tesis del alumno **IBQ. GEMA CÁRDENAS FLORES** con número de control **M14400235**, cuyo título es **“EFECTO DEL CAMPO ELÉCTRICO DE BAJA INTENSIDAD EN LA EMERGENCIA, EL CRECIMIENTO TEMPRANO Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS A LA GERMINACIÓN EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* var. *Saladette*),”** a los miembros que a continuación se enlistan, mismos que han evaluado y aprobado el contenido del manuscrito para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Alimentos y que firman de conformidad.

Dr. Luis Arturo Godínez Mora-Tovar  
(Vocal suplente)

Dra. Rosa Isela Ortiz Basurto  
(Vocal)

Dra. Martina Alejandra Chacón López  
(Secretario)

Dr. Ulises Miguel López García  
(Presidente)

Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

“Sabiduría tecnológica, Pasión por Nuestro Espíritu”

**DR. PORFIRIO GUTIÉRREZ MARTINEZ**  
**PRESIDENTE DEL CONSEJO DE MAESTRÍA EN**  
**CIENCIAS EN ALIMENTOS**  
c.c.p. Expediente





Instituto Tecnológico de Tepic

Tepic, Nayarit, **16/junio/2022**

No. Oficio: 25-315-2021

Asunto: Constancia Originalidad de Trabajo de Tesis

**A QUIEN CORRESPONDA:**

Por medio de la presente se CERTIFICA que una vez analizado mediante el uso del Software PLAGIARISM v. 1740, el trabajo de tesis "EFECTO DEL CAMPO ELÉCTRICO DE BAJA INTENSIDAD EN LA EMERGENCI, EL CRECIMIENTO TEMPRANO Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS A LA GERMINACIÓN EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* var. Saladette)" para obtener el grado de Maestro (a) en Ciencias en Alimentos de la C. I.B.Q. GEMA CÁRDENAS FLORES con numero de control **M14400235** cuenta con un nivel de **originalidad Acceptable** según lo definido en el Procedimiento para Verificación de Originalidad, por lo cual se determina que no constituye un plagio.

Es importante mencionar que de los trabajos de tesis se publican articulos en revistas Indizadas y/o arbitradas por lo que las técnicas utilizadas son citadas frecuentemente.

Se extiende la presente para los fines que mejor convengan al interesado.

Sin mas por el momento envío saludos cordiales

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica®  
Sabiduría Tecnológica, Pasión de nuestro espíritu®*

**MANUEL ANGEL URIBE VÁZQUEZ**  
**DIRECTOR**



OGTM/10/21

Ccp. Archivo DEPI



Av. Tecnológico #2595 Fracc. Lagos del Country C.P.63175  
Tepic, Nayarit. Tel. 01 (311) 2119400 y 2119401 e-mail:  
info@ittec.edu.mx

tecnm.mx | tepic.tecnm.mx





Instituto Tecnológico de Tepic  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Tepic, Nayarit, **20/junio/2022**  
No. Oficio: 25-327-2022  
Asunto: Autorización de impresión

**I.B.Q. GEMA CÁRDENAS FLORES  
CANDIDATO AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS  
P R E S E N T E**

De acuerdo con los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México y las disposiciones en este Instituto, habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis titulado "EFECTO DEL CAMPO ELÉCTRICO DE BAJA INTENSIDAD EN LA EMERGENCI, EL CRECIMIENTO TEMPRANO Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS A LA GERMINACIÓN EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* var. *Saladette*)", la División de Estudios de Posgrado e Investigación de este Instituto, concede la Autorización para que proceda a la impresión del mismo.

Sin otro particular, quedo de Usted.



**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica*  
Sabiduría Tecnológica Pasión de Nuestro Espíritu.

SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE TEPIC  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**M.C. LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS  
JEFE DE DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ccp. Coordinación de la Maestría en Ciencias en Alimentos  
Archivo



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
POSGRADO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

**ASUNTO: CARTA DE SESIÓN DE DERECHOS**

En la ciudad de Tepic, Nayarit., el mes de JUNIO de 2022, el que suscribe alumno **IBQ. GEMA CÁRDENAS FLORES** del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS** con número de control **M14400235**, manifiesta que todos los resultados derivados de sus estudios de posgrado y realizados bajo la dirección de la DR. **ULISES MIGUEL LÓPEZ GARCÍA** pertenece al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, por lo que cedo los derechos de los mismos a este instituto con fines académicos y de investigación. Así mismo manifiesto que es de mi conocimiento que si de estos resultados se originan patentes o publicaciones, participaré como coautor y de los beneficios que se deriven.



---

GEMA CÁRDENAS FLORES

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me fue brindado para la realización de este proyecto.

Agradezco al Posgrado en Ciencias en Alimentos del Instituto Tecnológico de Tepic, por darme la oportunidad de vivir esta etapa en mi vida académica y por todo el apoyo brindado durante mi estancia.

Quiero agradecerle a mi asesor de tesis, el Dr. Ulises Miguel López García, por todas las enseñanzas que me ofreció en el transcurso de mi estadía en la maestría y sobre todo su gran comprensión, paciencia y dedicación que me brindó para que este trabajo pudiera llegar a su fin.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial, a la Dra. Martina Alejandra Chacón López, a la Dra. Rosa Isela Ortiz Basurto y al Dr. Luis Arturo Godínez Mora-Tovar por sus conocimientos y experiencia que me compartieron y contribuyeron al trabajo final.

Agradezco a los excelentes docentes del programa de maestría por ayudarme a crecer académicamente y darme perspectiva acerca de la realidad del mundo de la investigación.

A mis compañeros de generación y de laboratorio, por todas las experiencias que compartimos y el gran apoyo que me brindaron en los momentos más difíciles.

## RESUMEN

La electrocultura es una tecnología que busca mediante la aplicación de estímulos eléctricos, mejorar la germinación, el desarrollo de las plantas y la síntesis de metabolitos secundarios, sin embargo, se ha reportado muy poco acerca del mecanismo por el cual son provocados estos efectos. La principal hipótesis es que el mecanismo por el cual los electrocultivos inducen una mejora en la germinación está mediado por la señalización de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y, que estas al cambiar el estado redox de la semilla e interactuar con el ácido giberélico (GA) y ácido abscísico (ABA), hormonas relacionadas con la germinación, podrían regular la expresión de genes que inician los eventos metabólicos responsables de este proceso. Sin embargo, los estudios y el conocimiento actual son aún insuficientes para demostrar y comprobar estas hipótesis. En el estudio de mecanismos involucrados en procesos específicos en plantas, son utilizados organismos modelo como el tomate (*Solanum lycopersicum*), el cual se utiliza ampliamente para estudios fisiológicos y genéticos debido a su corto tiempo de generación, genética diploide, tolerancia de endogamia y un genoma completamente secuenciado.

En la presente investigación se planteó la aplicación de campos eléctricos de corriente continua (DCEF, por sus siglas en inglés) de baja intensidad (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 V/cm) en semillas de tomate, encontrando mejoras significativas en el tiempo medio de emergencia (MET, por sus siglas en inglés) en los tratamientos de 0.4, 0.6 y 0.8 V/cm, así como en el índice de emergencia (EI, por sus siglas en inglés) para los tratamientos de 0.2, 0.4 y 0.8 V/cm. El tratamiento de 0.2 V/cm incrementó la altura de la plántula y mejoró los valores de índice de vigor I y II con respecto al control a los 8 días de ser tratadas las semillas; mientras que a los 14 días los tratamientos de 0.2 y 0.6 V/cm aumentaron la altura de la plántula y el peso seco de manera significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control. Se demostró que los tratamientos de 0.2 y 0.6 V/cm incrementaron significativamente ( $p < 0.05$ ) la concentración del radical superóxido y peróxido de hidrógeno en semillas de tomate

en comparación con el control, además de que estos mismos tratamientos aumentaron la expresión de *SIMAN2* y *SLGULB*, que son genes que codifican para enzimas involucradas en hidrolizar el endospermo del mesocarpio y dar lugar a la germinación *sensu stricto*. No se observaron cambios en la expresión de *GA3ox1*, sin embargo, fue posible observar cambios en los genes que codifican para enzimas hidrolíticas que son inducidas por esta hormona. Se demostró que la aplicación de DCEF de baja intensidad mejora parámetros de emergencia y desarrollo temprano, además de estimular la producción de ROS y enzimas hidrolíticas participantes de la germinación *sensu stricto*.

(Palabras clave: *Solanum lycopersicum*; Electrocultivos; Especies reactivas de oxígeno; Acido abscísico; Acido giberélico)

## ABSTRACT

The electroculture is a technology that seeks, through of the application of electrical stimuli, improve the germination, the development of plants and the synthesis of secondary metabolites, however, very little is known about the mechanism by which these effects are caused. It has hypothesized that the mechanism by which electrocultures induce an improvement in germination is mediated by the signaling of the oxygen reactive species (ROS) and are when changing the redox state of the seed and interact with giberelic acid (GA) and abscic acid (ABA), hormones related to germination. In spite of this, the current studies and knowledge are insufficient to demonstrate and check these hypotheses. The study of mechanisms involved in specific processes in plants is performed daily in model organisms such as tomato (*Solanum Lycopersicum*), it is widely used for physiological and genetic studies due to its short time of generation, diploid genetics, endogamy tolerance and its genome completely sequenced.

Electric fields of 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 V / cm were applied in tomato seeds and significant improvements were found at the average emergency time (MET) in treatments 0.4, 0.6 and 0.8 V / cm and in the emergency index (EI) at 0.2, 0.4 and 0.8 v / cm. It was found that the treatment 0.2 v / cm increased the height of the seedling and improved the values of Vigor I and II index with respect to the control at 8 days of being treated the seeds and at 14 days the treatments 0.2 and 0.6 V / cm increased the height of the seedling and the dry weight significantly ( $p < 0.05$ ) with respect to the control. It was shown that treatments 0.2 and 0.6 V / cm increased the concentration of superoxide radical and hydrogen peroxide significantly ( $p < 0.05$ ) in tomato seeds with respect to the control and found that these same treatments increased the expression of genes encoding for *SIMAN2* and *SIGulb*, enzymes responsible for hydrolyzing the endosperm of the mesocarp and give a place the *Sensu stricto* germination. No changes could be observed in the expression of *GA3OX1* but in the hydrolytic enzymes that are induced by this hormone were

observed. It was demonstrated that the application of low intensity DCEF improves emergency and early development parameters, as well as stimulates the production of ROS and hydrolytic enzymes participating in the *Sensu stricto* germination.

(Keywords: *Solanum Lycopersicum*; Electroculture; Reactive oxygen species; Abscic acid; Giberélic acid)

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	2
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES .....	5
1.1 Seguridad alimentaria y agricultura sostenible.....	5
1.2 La electrocultura como tratamiento sostenible .....	6
1.2.1 Historia de la electrocultura .....	6
1.2.2 Estudios sobre los efectos de la electrocultura en semillas.....	8
1.3 Respuesta de las plantas a estímulos eléctricos .....	11
1.3.1 Ion $\text{Ca}^{2+}$ durante la germinación de las semillas .....	13
1.3.2 Especies reactivas de oxígeno y sus interacciones con $\text{Ca}^{2+}$ durante la germinación.....	15
1.4 Generalidades del cultivo del tomate .....	19
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN .....	233
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS .....	266
CAPÍTULO 5. OBJETIVOS .....	288
1.5 Objetivo general .....	288
1.6 Objetivos específicos .....	288
CAPÍTULO 6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	300
1.7 Material biológico empleado en el estudio. ....	300
1.8 Condiciones del tratamiento de electrocultivo.....	300
1.9 Emergencia de plántulas e índices de crecimiento .....	311
1.10 Medición de especies reactivas de oxígeno.....	333

1.10.1	Determinación del radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).....	333
1.10.2	Determinación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) .....	344
1.11	Extracción, purificación y cuantificación del RNA.....	345
1.11.1	Extracción de RNA .....	345
1.11.2	Tratamiento al RNA con DNASA I.....	356
1.11.3	Cuantificación de RNA .....	366
1.11.4	Síntesis de oligonucleótidos .....	366
1.11.5	Síntesis del cDNA .....	388
1.11.6	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	388
1.12	Estudio de expresión génica .....	39
1.13	Análisis estadístico.....	39
CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		422
7.1	Emergencia de plántulas e índices de crecimiento .....	422
7.2	Medición de especies reactivas de oxígeno .....	533
7.3	Extracción purificación y cuantificación del RNA .....	57
7.3	Estudio de expresión génica mediante RT-PCR.....	633
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....		700
RECOMENDACIONES.....		5371
CAPÍTULO 9. REFERENCIAS .....		744

## LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 6.1. Oligonucleótidos Reverse y Forward de los genes a utilizar en el estudio.....	37
Cuadro 7.1 Efecto en los parámetros de emergencia de semillas sometidas a distintos DCEF en un periodo de 3 h. ....	45
cuadro 7.2 Medición de concentración y calidad del RNA extraído. RNA de semillas de tomate .....	62

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 2.1. Principales fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células vegetales.....	16
Figura 6.1. Representación esquemática del tratamiento de electrocultivo.....	31
Figura 7.1 Efectos del campo eléctrico sobre la germinación de semillas de tomate. .....	43
Figura 7.2 Plántulas de tomate a 8 (a), y 14 días (b) de haberse aplicado DCEF .....	47
Figura 7.3 Parámetros de crecimiento en plántulas 8 días después del tratamiento con DEFC.....	49
Figura 7.4 Parámetros de crecimiento en plántulas 14 días después del tratamiento con DEFC. ....	52
Figura 7.5. Efecto de DCEF en semillas de tomate sobre la producción de radical superóxido a las 12 y 24 h después de la aplicación del tratamiento .....	54
Figura 7.6. Efecto de DCEF en semillas de tomate sobre la producción del peróxido de hidrogeno a las 12 y 24 h después de la aplicación del tratamiento.....	55
Figura 7.7 Electroforesis en gel de agarosa de muestras de RNA de semillas de tomate. ....	58
Figura 7.8 Electroforesis en gel de agarosa de muestras de RNA tratadas con DNAsa I. ....	59
Figura 7.9 Electroforesis en gel de agarosa.....	60
Figura 7.10 Electroforesis en gel de agarosa 3.5%. PCR con DNA genómico de tomate como templado.....	63

Figura 7.11 Densidad relativa del gen <i>SIMAN2</i> en pixeles, a las 12 y 24 h de ser las muestras tratadas con DCEF. ....	65
Figura 7.12 Densidad relativa del gen <i>SIGULB</i> en pixeles, a las 12 y 24 h de ser las muestras tratadas con DCEF. ....	66
Figura 7.13 Densidad relativa del gen <i>GA3Ox1</i> en pixeles, a las 12 y 24 h de ser las muestras tratadas con DCEF. ....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>APX</b>	Ascorbato peroxidasa
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Ion calcio
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CCaMK</b>	Proteína quinasa dependiente de calmodulina
<b>CDPK</b>	Proteínas quinasas dependientes de Ca <sup>2+</sup>
<b>CBL</b>	Proteínas tipo calcineurina B
<b>CML</b>	Proteínas tipo Calmodulina
<b>CRK</b>	Proteínas quinasas relacionadas con CDPK
<b>DCEF</b>	Campos eléctricos de corriente continua
<b>EI</b>	Índice de emergencia
<b>ERI</b>	Índice de tasa de emergencia
<b>GA</b>	Ácido giberélico
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>MET</b>	Tiempo medio de emergencia
<b>NBT</b>	Cloruro de tetrazolio nitroblue
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Radical superóxido
<b>POD</b>	Peroxidasa
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa

## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Debido a la situación poblacional, climática y económica actual, han surgido grandes preocupaciones sobre la seguridad alimentaria global, ya que la agricultura convencional utilizada a lo largo de los años demanda de la aplicación de diferentes agroquímicos para mantener la producción en los cultivos. Desafortunadamente, ésta tiene implicaciones ambientales graves, razón por la cual, se ha centrado la atención en la aplicación de tecnologías sostenibles que contribuyan a mantener una producción de alimentos con altos rendimientos. Entre éstas se encuentran los electrocultivos, una tecnología que agrupa un conjunto de técnicas que buscan mediante la aplicación de estímulos eléctricos mejorar la germinación, el desarrollo de las plantas y la estimulación de la síntesis de metabolitos secundarios (Goldsworthy, 2008).

Se ha reportado que las respuestas inducidas en las plantas por perturbaciones eléctricas, dependen del estado fisiológico de las plantas y de la intensidad del estímulo aplicado. En general, la aplicación de estímulos eléctricos trae como resultado una germinación, crecimiento y desarrollo mejorados, sin embargo, existen pocos reportes sobre el mecanismo por el cual son provocados estos efectos.

Se ha hipotetizado que el mecanismo por el cual los electrocultivos inducen una mejora en la germinación, está mediado por una hiperpolarización de la membrana plasmática, lo que incrementa el flujo de iones como el calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), que forma parte integral de la regulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y éstas al cambiar el estado redox de la semilla e interactuar con el ácido giberélico (GA) y ácido abscísico (ABA), hormonas relacionadas con la germinación, podrían regular la expresión de genes que activan los eventos metabólicos responsables de la germinación. A pesar de esto, los estudios y el conocimiento actual son insuficientes para comprobar estas hipótesis (Dannehl et al., 2018).

El estudio de mecanismos involucrados en procesos específicos en plantas se realiza de manera cotidiana en organismos modelo como el tomate. Este ha sido utilizado ampliamente para estudiar la fisiología y bioquímica del desarrollo, germinación y latencia de semillas. Además, es considerado un buen candidato para investigaciones genéticas debido a su corto tiempo de generación, genética diploide elemental, un protocolo de transformación genética bien establecido, tolerancia de endogamia y un genoma completamente secuenciado. Esto último resulta determinante para tener un mejor entendimiento de los genes que participan en dichos mecanismos (Sumberg, 2017).

Esta investigación, evidenció dos tratamientos de campo eléctrico de baja intensidad en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) para mejorar parámetros de emergencia en plántulas e índices de desarrollo temprano, además de incrementar la concentración de ROS en semillas tratadas. Finalmente, para indagar y comenzar a dilucidar el mecanismo por el cual actúan los campos eléctricos, se determinó de manera semicuantitativa (mediante PCR punto final y un análisis de imagen de los productos amplificados), los niveles de expresión relativa de Expansina 4 (*SIEXP4*) y Endo- $\beta$ -mananasa (*SIMAN2*), genes inducidos por GA e involucrados en la degradación del endospermo, principal regulador del proceso de germinación en tomate.

## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Seguridad alimentaria y agricultura sostenible.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), desde la Cumbre Mundial de la Alimentación (CMA) de 1996, la Seguridad Alimentaria “a nivel de individuo, hogar, nación y global, se consigue cuando todas las personas, en todo momento, tienen acceso físico y económico a suficiente alimento, seguro y nutritivo, para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias a fin de llevar una vida activa y sana”.

En el escenario actual de una población en aumento, es necesario garantizar la seguridad alimentaria aumentando la producción de cultivos (Tripathi et al., 2020). Se ha reconocido que la agricultura convencional, que persigue la eficiencia y rentabilidad económica a través de monocultivos, enfrenta dificultades a nivel económico, social y ambiental, de tal manera que ha mediado plazo no podrá satisfacer las necesidades de una creciente población (Ulian et al., 2020). Los monocultivos agrícolas, como los campos de trigo, maíz y arroz, se repiten en la misma tierra, lo que da como resultado el agotamiento de la capa superior del suelo, la vitalidad del suelo, la calidad de las aguas subterráneas y propicia la propagación de microorganismos e insectos, provocando vulnerabilidad de los cultivos a parásitos y patógenos (Singh et al., 2011). Debido a esto, se ha utilizado una cantidad cada vez mayor de fertilizantes y plaguicidas, provocando problemas ambientales graves, como la degradación del suelo, la contaminación de aire, la disminución de la calidad y disponibilidad del agua, así como problemas en la salud animal y humana (Elahi et al., 2019). Si bien los métodos convencionales han permitido grandes rendimientos de los cultivos, no son considerados como el enfoque ideal para el futuro de la humanidad.

En la actualidad, la agricultura está cada vez más dirigida hacia un enfoque sostenible, es decir, destinada a satisfacer las necesidades del presente y que esta pueda ser sostenible en el tiempo (Meemken & Qaim, 2018). Para esto, se han

innovado prácticas y tecnologías asociadas a este fin, por ejemplo; prácticas que ayuden a frenar la degradación de la tierra, una mejor gestión de los recursos naturales disponibles, minimización del impacto de la agricultura en el medio ambiente, así como el mejoramiento del control de enfermedades y plagas mediante nuevas tecnologías (Elahi et al., 2019). En este sentido, tecnologías que hacen uso de agentes biológicos para el beneficio de los cultivos (como biofertilizantes y bioplaguicidas), así como el uso de tecnologías genéticas destinadas para el mejoramiento de especies vegetales, se han planteado como potenciales alternativas para incrementar el rendimiento agrícola (Chen, 2018; Goldsworthy, 2008). Por otro lado, también se han planteado otro tipo de alternativas como el uso de tratamientos físicos para estimular especies vegetales, mostrando un inmenso potencial, pues son métodos asequibles, limpios y seguros para el medio ambiente, además de generar efectos positivos en las semillas y plantas (Afzal et al., 2012). Los tratamientos físicos a pesar de ser extensamente estudiados y discutidos, actualmente siguen acaparando gran interés, pues se siguen desarrollando técnicas novedosas como la aplicación de plasma frío, radiación láser y ultrasónica, así como el uso de tecnologías ya conocidas a las que se les van descubriendo nuevas ventajas de aplicación, como es el caso de la electrocultura (Chen, 2018; Goldsworthy, 2008).

## **2.2 La electrocultura como tratamiento sostenible**

### **2.2.1 Historia de la electrocultura**

El trabajo sobre los efectos de los campos eléctricos en las plantas se remonta a varios siglos, pero la primera persona que realizó experimentos a gran escala fue Karl Lemström, quien fue profesor de física en la Universidad de Helsinki. En 1902, Lemstroem visitó la región ártica y descubrió que algunos árboles crecían más rápido bajo la aurora boreal, que aquellos ubicados en el sur en climas más templados. Lemström atribuyó el fenómeno a las condiciones eléctricas naturales producidas por la aurora boreal. Realizó una serie de experimentos en el laboratorio

para probarlo e incluso escribió el libro “*Electro Cultur*” para promover su hipótesis; desde entonces se conoce como “electrocultura” a la tecnología en que se aplican campos eléctricos para mejorar la eficiencia de la germinación y el crecimiento de las plantas (Chen, 2018; Goldsworthy, 2008).

Posteriormente, el físico británico Sir Oliver Lodge, leyó el libro publicado por Karl Lemström llevando estos conocimientos a la práctica, y según sus informes, en un experimento de ocho hectáreas logró un aumento del 24 al 39% en el rendimiento de grano de trigo (*Triticum aestivum*). Esto atrajo la atención de las autoridades británicas y estadounidenses, quienes a principios del siglo XX realizaron estudios por separado sobre electrocultura. Los hallazgos británicos fueron positivos, mientras que los resultados estadounidenses fueron negativos. Debido a esto, hubo muchos reclamos y contrademandas sobre los efectos de la electrocultura y el asunto fue muy controvertido. No obstante, la mayor parte del trabajo orientado a la agricultura se suspendió en la década de 1930, en gran parte atribuido a los costos, los riesgos por el uso de electricidad y la incertidumbre de obtener resultados positivos, de tal manera, que lo hicieron no viable económicamente para la época (Chen, 2018).

El interés público en la electrocultura revivió con el auge de la agricultura orgánica y en el año de 1990, el gobierno chino comenzó a financiar experimentos sobre esta técnica, siendo Liu Binjiang, el científico principal del proyecto. Hasta hace dos años, en China había 3600 hectáreas de invernaderos usando la electrocultura y un informe de 2019 de la Academia China de Ciencias Agrícolas (CAAS), mencionó que los rendimientos de los cultivos usando esta tecnología habían incrementado en un 30% donde en solo dos años, las verduras tratadas con impulsos eléctricos habían generado ingresos adicionales de casi 1.2 millones de yuanes (US \$ 175,000). Sin embargo, no es fácil evaluar la validez científica del trabajo de Liu, pues gran parte de los hallazgos de sus investigaciones no han sido publicados en revistas internacionales, a pesar de que han publicado más de 100 artículos en revistas chinas (Gurovich, 2012; Goldsworthy, 2008).

Desde su auge inicial y a pesar de los resultados erráticos de las primeras investigaciones, el estudio del efecto de la electrocultura en distintas especies vegetales ha ido en aumento, empleando esta tecnología para conseguir mejoras en la germinación y rendimiento (Dannehl, 2018). Sumado a ello, la electrocultura ha sido utilizada en el rescate de especies en peligro de extinción, como se muestra en los estudios realizados por Acosta Santoyo en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, CIDETEQ, en el estado Querétaro, México, donde se empleaba la electrocultura para aumentar la tasa de germinación de *Mammillaria mathildae*, una importante cactácea endémica de dicho estado (Acosta-Santoyo et al., 2018).

Por lo tanto, en el contexto contemporáneo agrícola, el uso de la electrocultura para aumentar la germinación de semillas y el vigor de las plántulas es de gran interés, debido a que estas etapas son las más críticas en el ciclo de vida de la planta y puede determinar la producción de cualquier cultivo en el campo. Esto, a causa de que el rendimiento de un cultivo depende en gran medida de la emergencia rápida y sincrónica de las plántulas, ya que la germinación lenta a menudo expone a las plantas a condiciones ambientales adversas. Como ventaja adicional está que este tipo de tratamiento en semillas podría ser más asequible, limpio y seguro que los métodos convencionales. Para esto es importante explorar el efecto de la electrocultura y profundizar en el conocimiento que explique los cambios morfológicos y fisiológicos que esta tecnología estimula en las plantas.

### **2.2.2 Estudios sobre los efectos de la electrocultura en semillas**

Una propiedad fundamental de todos los organismos vivos está relacionada con la percepción continua de información ambiental (temperatura, intensidad lumínica, humedad, estímulos mecánicos) y la expresión de respuestas fisiológicas destinadas a optimizar su desempeño bajo nuevas condiciones ambientales. Desde hace tiempo se conoce que las células vegetales se vuelven bioelectroquímicamente excitadas bajo la influencia de los cambios ambientales,

siendo la señalización eléctrica un sistema importante para transmitir información a lo largo de sus órganos, por lo que tendría sentido que las plantas respondan también a estímulos eléctricos externos (Gurovich, 2012; Goldsworthy, 2008).

La electrocultura engloba la aplicación de campos eléctricos, magnéticos y corriente directa como tratamientos en semillas y plantas, los cuales son estudiados desde el punto de vista de dos variantes: tratamientos de alta intensidad y cortos periodos de tiempo, y tratamientos de baja intensidad y tiempos prolongados del estímulo (Dannehl, 2018). En diversos estudios se ha evidenciado que las plantas reaccionan de manera distinta a los estímulos eléctricos, según la especie y la intensidad de la perturbación. Por ejemplo, se ha reportado que la aplicación de campos magnéticos y eléctricos, induce un aumento en la tasa y velocidad de germinación, así como un mejoramiento del desarrollo vegetativo. Asimismo, se ha observado un aumento de los rendimientos y estimulación del metabolismo de las plántulas en especies como *Arabidopsis thaliana* (Acosta-Santoyo et al., 2016), chícharo (Cakmak et al., 2009), maíz (de Souza et al., 2010), avena, frijol (Cakmak et al., 2009) y tomate (Anand et al., 2019; Ozuna et al., 2018; Dannehl et al., 2012; Shine et al., 2012; Azita et al., 2011; Cai et al., 2011; G. Wang et al., 2009).

Varias investigaciones se han enfocado en explicar algunos efectos de la electrocultura en las plantas, enfocadas principalmente en dilucidar el fenómeno y evidenciar lo que sucede dentro de la planta o semilla después de recibir el estímulo. Por ejemplo, Vashisth (2010), expuso a campos magnéticos (100 mT por 1h y 200 mT por 2h) semillas de maíz, mientras que Venkateswar (2012), expuso a campos magnéticos (100 mT por 1h y 200 mT por 2h) semillas de frijol, encontrando ambos autores, una mejora en la velocidad de germinación, un aumento en la absorción de agua, una alta actividad de enzimas hidrolíticas y de  $\alpha$ -amilasa. Los autores proponen que estas mejoras son consecuencia de una temprana hidratación de los tejidos de la semilla, lo que se traduciría en una rápida activación del metabolismo y explicaría la alta actividad de las enzimas hidrolíticas y de la  $\alpha$ -amilasa en las semillas tratadas con campos magnéticos en comparación con las semillas control. Asimismo, algunos estudios han reportado un aumento en la acumulación de iones

en los tejidos vegetales, por ejemplo, Radhakrishnan y Ranjitha (2012) reportaron en plantas de soya tratadas con campos magnéticos, un incremento en el contenido de Mn y Zn (25%), Fe y Na (15%), Mg (1%) y K (2%) en comparación con el control.

Por otro lado, diversos estudios desarrollados en las dos últimas décadas, han demostrado que el tratamiento con campos eléctricos y magnéticos en semillas, pueden generar una acumulación de ROS y de enzimas desintoxicantes como superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT) (Dannehl et al., 2012; Ward, 1996), así como compuestos antioxidantes como flavonoides y fenoles (Azita et al., 2011; Cai et al., 2011).

Un reciente estudio publicado en el año 2019 informó que la aplicación de estímulos eléctricos en semillas de maíz (22 V por 15 min), además de estimular la germinación y el crecimiento de las plántulas en condiciones normales, aumentó la tasa de supervivencia de las plántulas de maíz y redujo la peroxidación de los lípidos de la membrana bajo estrés por calor (Li et al., 2019). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales las plantas pueden adquirir nuevas características en respuesta al estímulo eléctrico, son hasta el día de hoy escasamente estudiados.

Se ha sugerido en base a los resultados de Anand et al. (2019), que la estimulación magnética en semillas de tomate puede activar una vía de transducción de señales mediada por el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que resulta en una mejora en la germinación y vigor de las semillas. En este trabajo encontraron que los perfiles de transcripción relativos de los genes que codifican para enzimas implicadas en la síntesis de  $H_2O_2$  como Cu-amina oxidasa (AO), receptor para C-activada quinasa 1 (*RACK1*) y la superóxido dismutasa (*SOD1* y *SOD9*), incrementaron en semillas de tomate tratadas con los campos magnéticos. El gen de la Cu-amina oxidasa aumentó su expresión hasta 21.7 veces en comparación con el nivel de expresión de este gen en las semillas control. Además, evidenciaron un aumento en la expresión de genes que codifican para enzimas implicadas en la eliminación del  $H_2O_2$ , como son, la metalotioneína (*MT1*, *MT3* y *MT4*), catalasa (*CAT1*) y ascorbato peroxidasa (*APX1* y *APX2*); obteniendo en comparación con el control, un aumento

en la abundancia de transcripción de 14.4 y 15.4 veces para *MT1* y *MT4*, respectivamente. Asimismo, se demostró que se presentaba una regulación positiva de los genes codificantes de ABA 8' -hidroxilasa y GA3 oxidasa1, que eventualmente conducía a la disminución de la relación ABA/GA, hormonas vegetales asociadas a la regulación de diversos procesos en las plantas, entre ellos la germinación (Gilroy et al., 2016).

Por otro lado, en un estudio reciente sobre la aplicación de un método llamado hidroelectroestático como tratamiento para el mejoramiento de semillas, que consistía en someter semillas de tomate a un campo eléctrico (10 kV/cm, 30 s), se evidenció mejoría en el índice de germinación y vigor en las plantas de tomate tratadas con respecto al control. Sumado a ello, se detectó un aumento y disminución en los niveles de GA y de ABA, respectivamente; mientras que se observaron cambios significativos en los niveles de transcripción de *SINCE2* y *SIDELLA* durante el tratamiento, genes que juegan un papel importante en la regulación hormonal que da lugar a la germinación (García et al., 2021).

De esta manera, estos hallazgos descritos sugieren firmemente que existe una modificación en el metabolismo de las plantas en respuesta a los estímulos eléctricos y magnéticos, por lo que resulta de interés en esta investigación profundizar en el conocimiento del efecto de los tratamientos eléctricos sobre plantas y semillas, y dado que los cambios en el metabolismo reflejan una respuesta a la regulación de genes, es especialmente interesante el efecto del estímulo eléctrico sobre la expresión génica, pues podría ayudar a dar explicación acerca de cómo los sistemas vegetales detectan este tipo de tratamientos.

### **2.3 Respuesta de las plantas a estímulos eléctricos**

Es complicado abordar el estudio y comenzar a dilucidar el mecanismo del efecto que induce una perturbación eléctrica en las plantas, debido a que no

necesariamente un tipo de estímulo generará la misma respuesta en unas u otras especies de plantas, por ejemplo, es probable que un campo magnético no genere la misma respuesta que un campo eléctrico asimismo existe una probabilidad de que la variación en la intensidad y duración de este tipo de perturbaciones modifique la respuesta de las plantas a estos estímulos. Sumado a esto, las metodologías de aplicación basadas en perturbaciones eléctricas que se han utilizado en la mayoría de los estudios son diversas; por ejemplo, en un mismo tipo de estímulo puede variar el estado de desarrollo (germinación, plántula y maduración), el sistema de aplicación (perturbaciones eléctricas o magnéticas, intensidad, equipos de aplicación), las condiciones de crecimiento (suelo, medio sintético, papel), entre otros. Sin embargo, las investigaciones desarrolladas a lo largo del tiempo han sugerido diversas hipótesis; por ejemplo, en algunos estudios al aplicar externamente campos eléctricos de baja intensidad en semillas en un medio de tierra circundante, reportaron mejoras en la germinación y desarrollo, argumentando que este comportamiento podría estar relacionado con el mejoramiento de las condiciones en la periferia de la semilla, en virtud de la electromigración de nutrientes, cambios del pH y la electro-ósmosis de bacterias y hongos en el suelo (Morales et al., 2021; Acosta-Santoyo et al., 2018). De esta manera, estos hallazgos brindan un fuerte fundamento a los principios de la electrocultura y podría ser una explicación plausible en el caso específico de este tipo de tratamientos, sin embargo, no logra explicar el cambio que se suscita en la homeostasis celular después de la aplicación de este y otros tipos de estímulos eléctricos. De esta manera, autores como Dannelh (2018) y Goldsworthy (2008), proponen que los estímulos eléctricos pueden generar una hiperpolarización de la membrana plasmática, al perturbar canales de calcio dependientes de voltaje e inducir un aumento en el flujo de iones y otras moléculas como el agua. Esto puede incrementar la tasa de metabolismo, debido a que iones como el  $\text{Ca}^{+2}$  a menudo forman parte integral de las cascadas de señalización que controlan diversos procesos celulares, como los relacionados con la regulación de las especies reactivas de oxígeno y hormonas vegetales; procesos especialmente importantes

debido a que en conjunto forman una red de señalización fundamental en el proceso de la germinación (Dannehl, 2018).

### **2.3.1 Importancia del ion calcio en germinación de semillas**

La germinación en semillas involucra una serie de procesos bioquímicos y fisiológicos que resultan en la reanudación del metabolismo, el crecimiento del embrión y la protusión de la radícula (Weitbrecht et al., 2011); los cuales incluyen la regulación redox y hormonal, la producción de enzimas hidrolíticas y la movilización de las reservas en la semilla. Estos procesos están estrictamente regulados por una serie diversa de señales bioquímicas externas e internas, así como por redes de señalización que están mediadas por fitohormonas y segundos mensajeros (Omoarelojie et al., 2022; Weitbrecht et al., 2011).

El ion  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como un importante segundo mensajero intracelular a través de un conjunto de canales, y familias de proteínas transductoras y decodificadoras de señales de este ion (Kong et al., 2015). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol está mediada por canales localizados en la membrana, que permiten un flujo de iones a través de esta mediante un gradiente electroquímico transmembrana. Algunos estudios han propuesto en plantas, la existencia de canales de calcio dependientes de voltaje y canales dependientes de unión  $\text{Ca}^{2+}$ , sin embargo, la identidad de estos canales aún no se ha dilucidado por completo (Kudla et al., 2010). Cuando un estímulo provoca una señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , esta necesita traducirse a una respuesta molecular, bioquímica y fisiológica. En plantas, las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  son detectadas y transmitidas mediante proteínas sensoras, que experimentan cambios conformacionales cuando se unen al ion calcio a través de una o más EF-hand (motivo de unión al calcio de tipo hélice-bucle-hélice) (Day et al., 2002). Las proteínas sensoras se dividen en dos grupos funcionales; proteínas transmisoras y proteínas respondedoras. En las proteínas transmisoras, la unión al ion  $\text{Ca}^{2+}$  induce cambios conformacionales que permiten que las proteínas experimenten interacciones proteína-proteína con las proteínas objetivo y alteren su función (por

ejemplo: actividades quinasas o de transporte). Este tipo de proteínas carecen de dominios catalíticos o efectores propios, por lo que solo pueden transmitir las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  detectadas interactuando con proteínas efectoras. Entre este tipo de proteínas sensoras se encuentran las familias de la calmodulina (CAM), tipo-CaM (CML) y tipo-calcineurina B (CBL). Por otro lado, las proteínas respondedoras poseen tanto dominios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ , como dominios efectores y, por tanto, la unión al ion  $\text{Ca}^{2+}$  induce cambios conformacionales que activa sus dominios efectores para llevar a cabo una actividad de respuesta. Un ejemplo de este tipo de proteínas, son las familias de proteínas quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (CDPK), la familia de proteínas quinasas relacionadas con CDPK (CRK) y la familia de proteínas quinasas dependientes de calmodulina (CCaMKs) (Mohanta et al., 2019; Kudla et al., 2010).

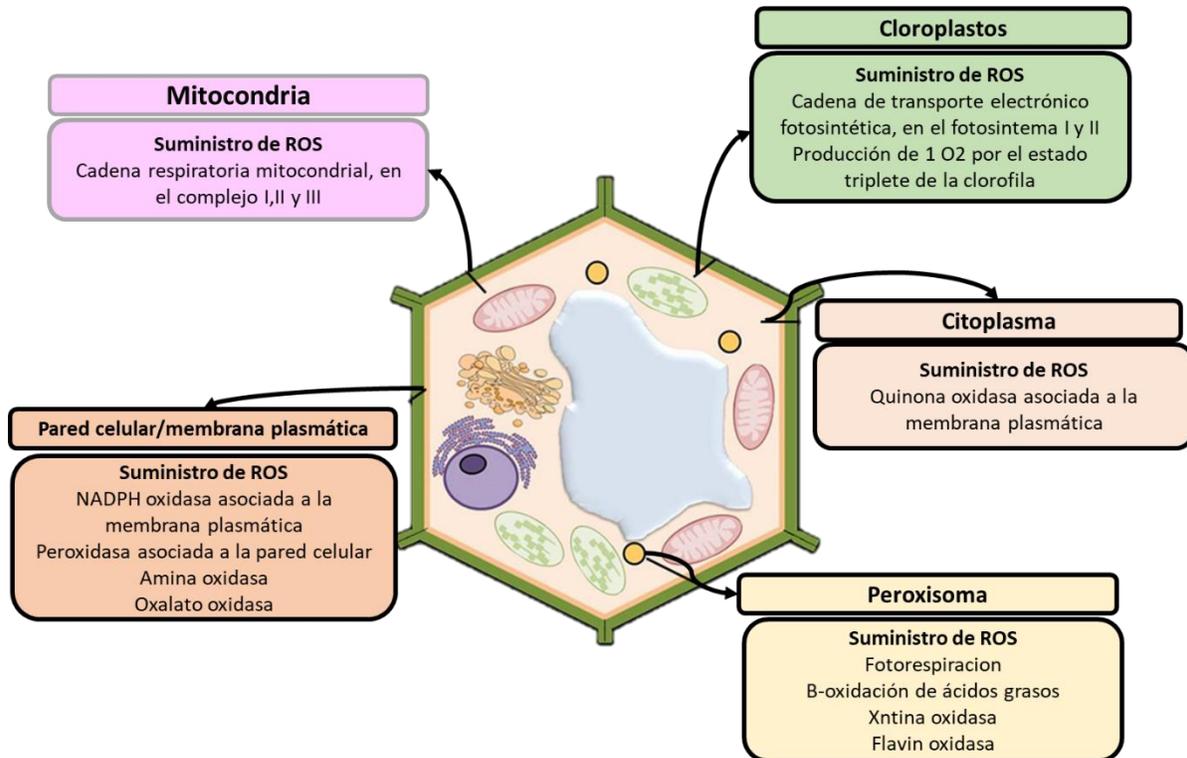
El ion  $\text{Ca}^{2+}$  y otras moléculas que participan en sus vías de señalización, como las proteínas sensoras anteriormente descritas, son reguladores importantes de la latencia y germinación de las semillas. Durante la germinación, hormonas como ABA y GA emplean señales  $\text{Ca}^{2+}$  y sus proteínas sensoras para ejercer su efecto en la germinación (Verma et al., 2019). Por ejemplo, el GA induce la generación de firmas de  $\text{Ca}^{2+}$  y la expresión de genes que codifican para las CaM, por lo que emplean el ion  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero y como un modulador de la señalización dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM durante la germinación de semillas. La secreción de enzimas hidrolíticas, necesarias para la movilización de reservas y el debilitamiento del endospermo en etapas iniciales de la germinación, ocurre en parte por la señalización dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM inducida por el GA, pues enzimas como  $\alpha$ -amilasas, hidrolasas y proteasas requieren el ion  $\text{Ca}^{2+}$  como cofactor para su activación (Omoarelojie et al., 2022). Por otro lado, ABA bloquea el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por GA y la señalización dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, así como la secreción de enzimas hidrolíticas. Aunque no está completamente dilucidado como sucede este mecanismo, se ha propuesto que podría existir una inhibición de la biosíntesis y la inactivación de GA vía DELAY OF GERMINATION 1 (DOG1), una proteína de unión a hemo y regulador positivo de la latencia de la semilla (Kong et

al., 2015). Asimismo, los componentes de la vía de señalización de ABA están regulados negativamente por  $\text{Ca}^{2+}$  y sus proteínas sensoras. Por ejemplo, CPK4 y CPK11 son CDPKs que fosforilan dos factores de transcripción sensibles a ABA, ABF1 y ABF4, lo que sugiere que estas dos quinasas regulan la señalización de ABA dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos factores de transcripción (Shi et al., 2018). Por lo tanto, el ion  $\text{Ca}^{2+}$  y las señales dependientes de este ion actúan como un nodo de regulación en la germinación de las semillas entre ABA y GA, pues ambas hormonas y sus reguladores responden a las señales de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que también hacen uso de este ion para ejercer su influencia durante la germinación. Además, otro aspecto importante en el proceso de germinación es la regulación redox, la cual está estrechamente relacionada con el metabolismo y la regulación hormonal en semillas, donde también hay una interacción directa entre las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  y las especies reactivas de oxígeno.

### **2.3.2 Especies reactivas de oxígeno y sus interacciones con el ion $\text{Ca}^{2+}$ durante la germinación**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, p. Ej.  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $^1\text{O}_2$ ) son formas parcialmente reducidas o activadas de oxígeno atmosférico ( $\text{O}_2$ ). Se consideran subproductos inevitables del metabolismo aerobio, que han acompañado la vida en la Tierra desde la aparición de organismos fotosintéticos, que han evolucionado en una atmósfera oxidante desde hace aproximadamente 2.2 a 2.7 millones de años (Mittler et al., 2011).

Las ROS son producidas en distintos organelos de la célula (Figura 2.2).



**Figura 2.1.** Principales fuentes de especies reactivas de oxígeno en células vegetales (Fuente: del Río, 2015).

No obstante, la membrana plasmática es el sitio principal de producción de este tipo de especies químicas, debido a la actividad de proteínas que pertenecen a la familia de la NADPH oxidasa, aunque se ha reportado la participación de otras oxidases de membrana como la amina oxidasa y el oxalato oxidasa (X. Wang et al., 2016; Jajic et al., 2015;). Las NADPH oxidasas son proteínas integrales de membrana que promueven la transferencia de electrones citoplasmáticos del NADPH al oxígeno extracelular, formando  $O_2^-$  y promoviendo la acumulación de ROS en el apoplasto (Das & Roychoudhury, 2014).

Además del apoplasto, varios orgánulos celulares como los cloroplastos y las mitocondrias también generan ROS. De hecho, cuando están bajo iluminación los

cloroplastos son fuentes importantes de ROS, debido al intenso transporte de electrones durante la fotosíntesis y la liberación de oxígeno en el fotosistema II (Lázaro et al., 2013). En las mitocondrias, la producción de ROS ocurre cuando la transferencia de electrones excede la capacidad de la oxidasa alternativa y el citocromo oxidasa para eliminar el exceso de electrones, lo que resulta en su transferencia al oxígeno molecular, principalmente de los complejos I y III. Otros orgánulos involucrados en la síntesis de ROS son los peroxisomas, los cuales generan  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  como resultado de su actividad metabólica, que implica procesos tales como la fotorrespiración, el ciclo del glioxilato y  $\beta$ -oxidación (del Río, 2015). Estos diferentes grupos de ROS producidos en compartimentos distintos, se comunican entre sí en las células con el objetivo de regular el metabolismo de la planta.

El mantenimiento de los niveles de ROS también implica la participación de mecanismos antioxidantes, que están asociados con la eliminación de estas especies químicas, los cuales se pueden dividir en mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Entre los antioxidantes enzimáticos, la SOD es especialmente importante porque cataliza la eliminación de  $O_2^-$ , la primer ROS formada después de la exposición a varios estímulos. Otras enzimas antioxidantes incluyen la ascorbato peroxidasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa, que convierten  $H_2O_2$  a agua (Viehweger, 2014). En combinación con estas enzimas, los antioxidantes no enzimáticos, como el glutatión, el ascorbato y el tocoferol, también juegan un papel crucial en el mantenimiento de los niveles de las ROS, al actuar como amortiguadores redox en las células vegetales. Aunque la síntesis de estas moléculas antioxidantes puede inicialmente inhibirse para permitir la aparición del estallido oxidativo (del Río, 2015), una vez que se inicia la señal, estos mecanismos se activan y funcionan de manera conjunta (Farnese et al., 2016).

Las ROS desempeñan papeles importantes en todas las etapas de la vida de la semilla, desde la germinación (embriogénesis) hasta la muerte celular (muerte celular programada, PCD por sus siglas en inglés) (Farnese et al., 2016). Se ha asumido durante mucho tiempo que la acumulación de ROS, es perjudicial para la

viabilidad de la semilla, debido al estrés oxidativo impuesto durante la desecación o el envejecimiento de la semilla (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Sin embargo, estudios recientes sobre la fisiología de las semillas han demostrado que las ROS también cumplen funciones cruciales en la señalización celular, que sustenta la germinación de las semillas, la ruptura de la latencia, la movilización oxidativa de las reservas de la semilla y la protección contra patógenos (Li et al., 2018).

En este sentido, diversos estudios han encontrado una relación entre  $Ca^{2+}$ , ROS y las hormonas involucradas en la germinación, principalmente el ABA y GA. Durante la imbibición, comienza una difusión y distribución de las ROS que se acumularon de forma no enzimática durante la desecación de la semilla, así como las que se producen durante la imbibición de las mitocondrias y peroxisomas, con el fin mediar la señalización dependiente de ROS durante la germinación (El-Maarouf-Bouteau et al., 2015). Las ROS influyen tanto en la señalización de ABA como de GA y estas dos, a su vez tienen un efecto regulador sobre la generación de ROS para controlar la germinación de las semillas. Se ha demostrado que la acumulación de  $H_2O_2$  en la germinación de semillas está asociado con la degradación de ABA a través de la activación de ABA-8-hidroxilasa (Liu et al., 2010) y 9- *cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (Bahin et al., 2011), enzimas catalíticas de ABA, aunque la oxidación directa de ABA no puede excluirse (El-Maarouf-Bouteau et al., 2015). Mientras que ABA al actuar a través de ABI5 (un factor de transcripción de cremallera de leucina), inhibe la acumulación de ROS al activar la transcripción de enzimas antioxidantes (Ishibashi et al., 2017). Por otro lado,  $H_2O_2$  induce la biosíntesis de GA induciendo la expresión de enzimas que participan en este proceso, como GA 20-oxidasa y GA 3-oxidasa, que participan en la biosíntesis y activación de las GA, respectivamente (Li et al., 2018). Las ROS también activan el flujo de iones  $Ca^{2+}$  y sus señales dependientes, que se sabe inducen aún más la producción y señalización de este tipo de especies químicas. Por ejemplo, las ROS pueden inducir la expresión de genes que codifican para proteínas de unión a  $Ca^{2+}$ , por otro lado, las a NADPH oxidasas son proteínas con dominios EF-Hand que son activadas por unión a  $Ca^{2+}$  o vía fosforilación por los complejos CBL (Drerup et al., 2013). También ha sido

reportado que la generación de ROS a través de NADPH oxidasas es influenciada por GLR3.5, el cual es un canal de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que demuestra aún más el control de la señalización de ROS por  $\text{Ca}^{2+}$  (Ju et al., 2020).

De esta manera, resulta de gran relevancia el desarrollo de investigación orientada a la generación de conocimiento sobre la participación de ABA, GA, ROS y iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el mecanismo de respuesta de las semillas hacia las perturbaciones eléctricas causadas por los electrocultivos.

En la investigación de estos mecanismos es común ver el uso de plantas modelo, las cuales son especies de plantas ampliamente estudiadas y elegidas por la facilidad de investigar fenómenos biológicos particulares o por su valor en biotecnología o agronomía, por ejemplo, *Arabidopsis thaliana*, arroz, maíz, frijol y tomate. Este último siendo utilizado ampliamente para estudiar la fisiología y bioquímica del desarrollo, germinación y latencia de semillas. Sumado a ello, el tomate es considerado un buen candidato para la investigación genética, debido a su corto tiempo de generación (el tiempo desde la germinación de la semilla hasta la producción de frutos/semillas), genética diploide elemental, una metodología de transformación genética bien conocida, tolerancia de endogamia y un genoma completamente secuenciado (Sant'Ana & Lefsrud, 2018; Hilhorst et al., 1998).

#### **2.4 Generalidades del cultivo del tomate**

El tomate, (*Solanum lycopersicum*) es una planta dicotiledónea, herbácea y perenne que pertenece a la familia botánica *Solanaceae* (Fornaris, 2007). La planta presenta una raíz principal pivotante (que crece unos 3 cm al día hasta que alcanza los 60 cm de profundidad), simultáneamente se producen raíces adventicias y ramificaciones que pueden llegar a formar una masa densa y de cierto volumen (Sañudo-Torres, 2013).

El tallo es erguido y cilíndrico en planta joven, el cual puede llegar a medir de 40-250 cm, y a medida que ésta crece, el tallo cae y se vuelve anguloso. Presenta

tricomas (vellosidades) en la mayor parte de sus órganos y glándulas que segregan una sustancia color verde aromática. Muestra ramificación abundante y yemas axilares, y si al final del crecimiento todas las ramificaciones exhiben yemas reproductivas, éstas se clasifican como de crecimiento determinado; y si terminan con yemas vegetativas, son clasificadas como de crecimiento indeterminado (Rick, 1978).

Las hojas son cortas, de tamaño medio o largo, son compuestas y se insertan sobre los diversos nudos en forma alterna. El limbo se encuentra fraccionado en siete, nueve y hasta once foliolos, en tanto que el haz es de color verde y el envés de color grisáceo; su tamaño depende de las características genéticas de la variedad, mientras que la disposición de nervaduras en los foliolos es penninervia (Sañudo-Torres, 2013).

El fruto es una baya carnosa conformada de dos a 18 lóculos, la cual en estado de madurez se conforma por el epicarpio (piel), mesocarpio y endocarpio (parte carnosa del fruto). La superficie de la fruta es lisa o lobulada y brillante al madurar, mientras que su forma usualmente es globosa o deprimida en uno de los extremos. Sin embargo, existen las de forma cuasicuadrada, alargada, ovalada y en forma de pera (piriforme), así como variantes de las formas antes mencionadas. El color rojo brillante que presenta este fruto es debido al pigmento licopeno, el cual es un carotenoide, mientras que el color amarillo presente en madurez fisiológica, suele deberse a otros pigmentos carotenoides. Desde el punto de vista nutritivo, el tomate no tiene un alto valor en su contenido de proteínas, lípidos y azúcares; en contraparte, presenta compuestos bioactivos tales como el licopeno, vitamina A,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), tocoferoles y polifenoles (Pinela et al., 2012).

En lo que respecta al proceso de germinación del tomate, su principal regulador es el tejido del endospermo que rodea al embrión. El embrión de tomate está rodeado por un endospermo rígido y la región del endospermo que encierra la punta de la radícula (cubierta del endospermo), se tiene que debilitar para permitir que ésta emerja (Bradford & Nonogaki, 2007). Se cree que las enzimas como expansina,  $\beta$ -

1,3-glucanasa, endo- $\beta$ -mananasa y xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa están involucradas en el debilitamiento de la cubierta del endospermo; mientras que los niveles de transcripción de ARNm de los genes que codifican estas enzimas son inducidos por el GA, pese a que ABA regula de forma negativa la germinación mediante distintas vías, estas enzimas (con la excepción de GulB) no son inhibidas por ABA (Nakaune et al., 2012)

Por todo lo anterior, resulta de gran relevancia destacar el empleo del tomate, como un buen candidato para el estudio del efecto de estímulos eléctricos en plantas, debido a que es un cultivo de importancia económica en México y en el mundo, y a las facilidades que representa como modelo de estudio en la investigación de procesos fisiológicos (corto tiempo de desarrollo) y mecanismos genéticos (genoma completamente secuenciado).

## **CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN**

### **CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN**

Una de las necesidades más importantes de la sociedad actual, es asegurar los recursos y alimentos para la subsistencia del ser humano, para esto, a lo largo de los años ha sido utilizada la agricultura convencional. Desafortunadamente, esta tiene implicaciones ambientales graves, por lo que es necesario invertir tiempo y recursos en el desarrollo tecnológico e innovación para la mayor producción de alimentos sustentable. Debido a esto, ha surgido un gran interés en la aplicación de nuevas tecnologías en cultivos de relevancia agronómica como el tomate, ya que este fruto, es considerado como uno de los principales del comercio hortícola del mundo y de gran importancia a nivel económico en México, como principal exportador; además de ser considerado un organismo modelo para el estudio de procesos fisiológicos y mecanismos genéticos en plantas.

En los últimos años se ha dado un especial enfoque a nuevas tecnologías agronómicas, entre las que se incluyen, el uso de herramientas novedosas de monitoreo, el mejoramiento genético y el uso de tratamientos físicos estimulantes para semillas y plantas como la electrocultura, que engloba el uso de campos eléctricos, magnéticos y electromagnéticos en cultivos.

Antes de aplicar apropiadamente una nueva tecnología en campo, es necesario un conocimiento profundo que fundamente tanto el fenómeno que lo causa, como el efecto que pueda tener en el alimento y en el medio ambiente. Ya se ha comprobado en numerosos estudios, que la aplicación de estímulos eléctricos genera una mejora en la velocidad y tasa de germinación en semillas, mientras que en plantas logra un mayor desarrollo vegetativo y un mejor rendimiento. De tal manera, que la electrocultura puede considerarse como una tecnología con gran potencial de aplicación; sin embargo, el mecanismo por el cual las plantas parecen responder al tratamiento eléctrico ha sido muy poco estudiado.

Si bien se ha evidenciado que los campos eléctricos y magnéticos inducen en las plantas y semillas moléculas pertenecientes a la señalización del estrés (como la

producción de ROS), no existen estudios que permitan dilucidar el cómo estas especies podrían estar participando en la regulación de la germinación en semillas estimuladas eléctricamente. Asimismo, hasta el momento son pocas las investigaciones que abordan la explicación de estos fenómenos mediante el empleo de herramientas moleculares.

De esta manera, la presente propuesta de investigación plantea el estudio del efecto de estímulos eléctricos de baja intensidad en la germinación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*), así como en la producción de las especies reactivas de oxígeno y en la expresión de genes clave relacionados con los eventos metabólicos responsables de este proceso.

## **CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS**

## **CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS**

El campo eléctrico de baja intensidad inducirá un cambio en el desarrollo de la germinación, en la producción de especies reactivas de oxígeno y en la expresión de genes relacionados con la síntesis y catabolismo de las hormonas vegetales ABA y GA, así como en la degradación del endospermo en semillas de tomate.

## **CAPÍTULO 5. OBJETIVOS**

## CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Estudiar el efecto del campo eléctrico de baja intensidad en la emergencia, el crecimiento temprano y rutas de señalización asociadas a la germinación en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*)

### 5.2 Objetivos específicos

Evaluar las mejores condiciones de campos eléctricos de baja intensidad en función de porcentaje final de emergencia (FEP), el índice de emergencia (EI), el tiempo promedio de emergencia (MET) e índice de tasa de emergencia (ERI) en semillas de tomate.

Evaluar las mejores condiciones de campos eléctricos de baja intensidad con respecto a parámetros de desarrollo temprano (altura de plúmula, longitud de raíz, peso seco y húmedo) en semillas de tomate.

Determinar la producción de especies reactivas de oxígeno como  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  por influencia del electrocultivo en semillas de tomate.

Evaluar el nivel expresión de manera semicuantitativa en genes involucrados en la inducción de la germinación mediada por producción de las hormonas vegetales ABA y GA, y la consecuente degradación del endospermo en semillas de tomate sometidas a electrocultivos.

## **CAPÍTULO 6. MATERIAL Y MÉTODOS**

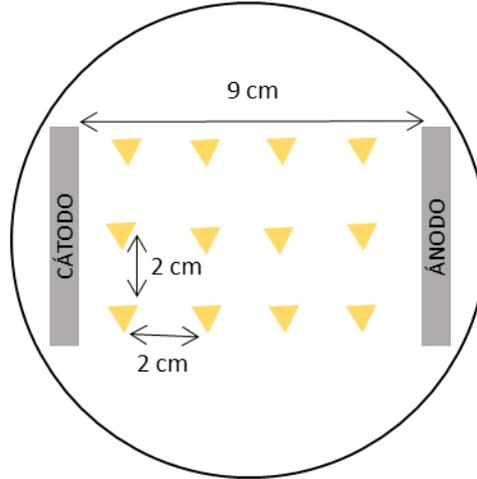
## CAPÍTULO 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico empleado en el estudio

Fueron utilizadas semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la marca “Hydro Enviromet”, cubiertas con el antifúngico Thiram. Antes de llevar a cabo el tratamiento de electrocultivo, las semillas fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio al 10 % (v/v) por 10 min y posteriormente lavadas 3 veces con agua destilada estéril. Por último, las semillas fueron sembradas para su posterior tratamiento.

### 6.2 Condiciones del tratamiento de electrocultivo

Para el tratamiento de electrocultivo, se empleó como medio electrolítico y de crecimiento suelo de tipo Vertisol en 70%, así como composta de fibra de mango y gabazo de caña marca Terrasana en un 30%; el suelo se saturó con agua corriente hasta un 20% (p/p). Como celda electroquímica se utilizó un envase de polioliefina de 500 mL de la marca Reyma, con una configuración de 2 electrodos, donde 2 mallas de titanio platinizado (área geométrica = 15.58 cm<sup>2</sup>) separadas a una distancia de 9 cm inmersos en el suelo, fungieron como ánodo y cátodo. En el medio electrolítico sólido se acomodaron cuatro hileras de semillas con una separación de 2 cm, con 3 semillas con una separación entre sí de 2 cm, teniendo un total de 12 semillas por celda (Figura 6.1). Por último, para inducir la perturbación eléctrica se utilizó un potencióstato/galvanostato Reference 3000 de la marca Gamry, aplicando para todos los experimentos campos eléctricos de corriente directa (DCEF) de 0.2, 0.4, 0.6, y 0.8 V/cm durante 3 h. Como control para cada condición experimental, se utilizaron semillas en ausencia de DCEF.



**Figura 6.1.** Representación esquemática del tratamiento de electrocultivo. Los triángulos invertidos representan las semillas de tomate.

### 6.3 Emergencia de plántulas e índices de crecimiento

Después de la exposición a los DCEF, las celdas de electrocultivo se transfirieron a una cámara de crecimiento con luz artificial, en la cual se aplicó un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad), empleando 3 lámparas fluorescentes de luz blanca fría de la marca DUBAI (60 Hz, 36 W) y 2 lámparas fluorescentes de luz blanca y amarilla de la marca Aguled o wanergy (50.60 Hz, 50W), con la finalidad de alcanzar una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La temperatura de la cámara se mantuvo a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y se monitoreó la emergencia cada 24 h durante 14 días. Los parámetros de emergencia de las plántulas se calcularon siguiendo las ecuaciones reportadas por Abedinpour & Rohani (2017).

Para determinar el porcentaje de emergencia final (FEP), se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{FEP} = (n_i / N) \times 100 \quad (1)$$

donde  $n_i$  es el número de plantas emergidas al final de los 14 días y  $N$  el número de semillas incluidas en la prueba.

De igual manera, para el cálculo del índice de emergencia (EI) y el tiempo promedio de emergencia (MET), fueron empleadas las siguientes ecuaciones:

$$EI = \Sigma (n_i / t_i) \quad (2)$$

$$MET = \Sigma (t_i) / \Sigma n_i \quad (3)$$

donde  $n_i$  es número de plantas emergidas cada 24 h y  $t_i$  el tiempo transcurrido en días.

Por otro lado, un parámetro importante a considerar en el estudio, es el índice de tasa de emergencia (ERI); el cual se estimó empleando la siguiente expresión matemática:

$$ERI = \sum_{tF}^{tI} [(\%n_i - \%n_{i-1})] / t_j \quad (4)$$

donde  $\%n_i$  representa el porcentaje de plantas emergidas cada día;  $\%n_{i-1}$  representa el porcentaje de plantas emergidas en el día anterior a  $\%n_i$ ;  $tI$  indica el primer día en que se surgieron las plantas,  $tF$ = último día de conteo (emergencia completa) y  $t_j$  el día en que se registra  $\%n_i$ .

Se estudiaron los efectos de los DCEF a los 8 y 14 días sobre la germinación, la altura de la plántula, la longitud de la raíz, peso seco y húmedo, así como los índices de crecimiento. Asimismo, se calcularon los índices de vigor I y II siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$\text{Indice de vigor I} = \% \text{ de emergencia} * \text{altura de plúmula} \quad (5)$$

$$\text{Indice de vigor II} = \% \text{ de emergencia} * \text{peso seco} \quad (6)$$

Posteriormente, con base en los resultados de estos ensayos, se llevó a cabo una selección de las condiciones de electrocultivo que mejor influyeron en los parámetros de crecimiento y emergencia. Así, a estos tratamientos seleccionados, se le realizaron los ensayos que se describen a continuación en los siguientes apartados.

#### **6.4 Medición de especies reactivas de oxígeno**

Con el fin de comprobar la producción de ROS, moléculas que participan en la señalización al estrés abiótico, las semillas de tomate se sometieron a la mejor condición de electrocultivo seleccionada en el apartado anterior, estas se mantuvieron en tierra hasta las 12 h y 24 h de imbibición, fueron retiradas, lavadas 3 veces con agua destilada e inmediatamente congeladas con nitrógeno líquido. Por último, las semillas congeladas con nitrógeno líquido se trituraron con un mortero y pistilo, hasta obtener un polvo fino que posteriormente se almacenó para usarse en los siguientes ensayos.

##### **6.4.1 Determinación del radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )**

La cuantificación de los radicales libres de  $O_2^{\bullet-}$  se realizó midiendo su capacidad para reducir el cloruro de tetrazolio nitroblue (NBT) en las semillas tratadas eléctricamente y en el control, según el método de Chaitanya y Naithani (1994), modificado para tomate por Anands y et al., (2019). Se homogenizaron las semillas de tomate (0.5 g) en buffer fosfato preenfriado (0.2 M, pH 7.2, 0-4 °C) seguido de una centrifugación a 10000 rpm durante 10 min y 4 °C. Se preparó una mezcla de reacción de 3 mL que contenía 100  $\mu$ L del sobrenadante, NBT 0.75 mM, carbonato

sódico 25 mM, EDTA 0.1 mM y L-metionina 13.3 mM, seguido de una incubación a 30 °C en un baño de agua durante 30 min. La absorbancia se registró mediante espectrofotometría usando un espectrofotómetro de microplaca de la marca BioTek 800 TS a una longitud de onda de 540 nm. El contenido de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se estimó utilizando un coeficiente de absorción molar de 12.8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> y fue expresado como μmol g<sup>-1</sup> de peso fresco.

#### **6.4.2 Determinación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se determinó mediante la formación del complejo de titanio-hidroperóxido (Mukherjee & Choudhuri, 1987). Las semillas de tomate (0.25 g) se homogenizaron en 1 mL de acetona en un tubo de 2 mL seguido de una centrifugación a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 2 mL y se completó con agua destilada a 4 °C hasta 1.5 mL. A 10 mL de este extracto se le añadió 100 μL de sulfato de titanio al 5% y 200 μL de NH<sub>4</sub>OH concentrado para precipitar el complejo de peróxido-titanio. Posteriormente, esta mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó repetidamente con acetona. Como acto seguido se disolvió el precipitado en 1.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M y el volumen final se completó hasta 2 mL con agua destilada fría (0-4 °C). La absorbancia de la solución se registró por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro de microplaca de la marca BioTek 800 TS a una longitud de onda de 415 nm frente a un blanco de agua. El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se calculó a partir de una curva estándar, en el rango de 0-10 μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados se expresaron como μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> de peso fresco.

### **6.5 Extracción, purificación y cuantificación del RNA de semillas de tomate**

#### **6.5.1 Extracción de RNA de semillas de tomate**

La extracción de RNA total se realizó mediante el método de Djami-Tchatchou & Straker (2012), con ligeras modificaciones. Polvo de semillas de tomate (0.1 g) fue

transferido a tubos de 2 mL, mezclado con 1 mL de buffer de extracción (CTAB al 2%, PVP K 40 al 2%, Tris-HCl 100 mM y pH 9.0, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, y 400  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol al 2%, añadido justo antes de su uso) precalentado a 65 °C e incubado a 65 °C durante 15 min y agitando en vortex cada 5 min durante 1 min. Luego, a los tubos se les añadieron 750  $\mu$ L de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v) y fueron centrifugados a 5000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo que contenía 750  $\mu$ L de una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), para posteriormente ser centrifugado nuevamente por 20 min a 5000 rpm. Después de la segunda centrifugación, el sobrenadante fue transferido a tubos estériles de 1.5 mL y se le añadió 125  $\mu$ L de LiCl 10 M. Después de incubar toda la noche a -20 °C, los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm por 30 min y 4 °C, y posteriormente la pastilla fue resuspendida en 500  $\mu$ L de buffer NaCl-dodecilsulfato de sodio-Tris-EDTA (NaCl 1 M, SDS al 0.5%, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) y precalentada a 60 °C e incubada por 5 min a 60 °C para asegurar una completa re-suspensión de la pastilla de RNA en el buffer. La suspensión fue transferida en un tubo de 1.5 mL y mezclada con 700  $\mu$ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), seguido de una centrifugación a 10000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo de 1.5 mL junto con 900  $\mu$ L de etanol al 100% y el RNA fue precipitado a -80 °C durante 1 h. Después de la incubación los tubos fueron centrifugados por 30 min a 13000 rpm y 4 °C. La pastilla obtenida fue lavada con 1 mL de etanol al 70% y centrifugada a 10,000 rpm por 2 min. Finalmente, la pastilla fue secada en aire y resuspendida en 30  $\mu$ L de agua tratada con dietilpirocarbonato al 1% (DEPC).

### **6.5.2 Tratamiento al RNA con DNasa I**

Para llevar a cabo el análisis de expresión de genes es necesario que el RNA obtenido se encuentre libre de DNA. Para esto se utilizó la enzima DNasa I, grado amplificación (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Para la purificación del RNA, se obtuvo una mezcla de reacción 1  $\mu$ L del RNA total, 1  $\mu$ L 10X DNasa 1 Buffer de reacción, 1  $\mu$ L DNasa I grado amplificación y agua DEPC hasta completar un volumen total de 10  $\mu$ L. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Para la inactivación de la enzima se añadió 1  $\mu$ L de EDTA 25 mM y se incubó por 10 min a 65 °C.

Para verificar la integridad de las muestras de RNA total tratado con DNasa, las muestras obtenidas se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.2% en 1x tris-acetato-ácido acético-EDTA (TAE), la corrida electroforética se realizó a 70 V durante 40 min. El RNA se tiñó utilizando el colorante Gel Red y se visualizó mediante un transiluminador con luz ultravioleta adaptado a un equipo fotodocumentador Kodak Gel Logic 100 Imaging System.

### **6.5.3 Cuantificación de RNA**

La cuantificación se llevó a cabo en un equipo Genoma-nano usando una longitud de onda de 260 nm. Para verificar la pureza del RNA obtenido se tomó en cuenta la relación de absorbancias 260/230 nm y 260/280 nm. El RNA verificado fue utilizado para el análisis de expresión mediante RT-PCR.

### **6.5.4 Síntesis de oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos a utilizar en el presente proyecto fueron sintetizados a través de un servicio especializado. Estos oligonucleótidos fueron el forward y reverse de los genes Expansina 4 (*SIEXP4*), Endo- $\beta$ -mananasa (*SIMAN2*),  $\beta$ -1,3-glucanasa (*SLGULB*), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), ácido abscísico 8'-hidroxilasa (*ABA-H/CYP707A2*) y Giberelina 3-oxidasa 1 (*GA3OX1*). Estos fueron utilizados para los ensayos de nivel de expresión, la secuencia de cada oligonucleótido se muestra a continuación en el Cuadro 6.1.

**Cuadro 6.1.** Secuencias de los oligonucleótidos Reverse y Forward de los genes analizados en el estudio.

No .	Enzima/ Propiedad	Nombre del gen	No. Adhesión	Par de oligonucleótidos	Referencia
1)	Expansina 4	<i>SIEXP4</i>	AF059488	F TGTTCTTCTCTGTTTTCTCACTGC R CTCCGTAACCTTGGCTGTATAAAT	Nakaune et. al. 2012
2)	Endo- $\beta$ - mananasa	<i>SIMAN2</i>	AF184238	F CCAGGATATAATCAAATATACGC R CATGGCATGAGACTGACTTGTA	Nakaune et. al. 2012
3)	$\beta$ -1,3-glucanasa	<i>SLGULB</i>	M80608	F GGGTTCATTTAGGAACGATGTTAG R TAGGTGCTGTAAAAAGAGCATACG	Nakaune et. al. 2012
4).	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	<i>GAPDH</i>	U93208.1	F GGAGACAATAGACCAAGCATATT R TGAATAATCAAGTCCACCACTC	Anand et al., 2019
5)	Ácido abscísico 8'-hidroxilasa	<i>ABA- H/CYP70 7A2</i>	HQ00877 4.1	F CCATCGCGATAACATCACTC R TTCTTGAGCTCCTCTCTGTAT	Anand et al., 2019
6)	Giberelina 3- oxidasa 1	<i>GA3OX1</i>	AB010991 .1	F GATGTGCTGCCTTACAATA R GGTAGAATCCGTATGTGCTG	Anand et al., 2019

### **6.5.5 Síntesis del cDNA**

Para realizar la Transcripción Reversa (RT) utilizando el RNA purificado libre de DNA, se usó la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen®), de acuerdo a las especificaciones del proveedor y utilizando los oligonucleótidos previamente mencionados para cada gen, para lo cual se siguió el procedimiento que se describe a continuación.

Se realizó una mezcla con los siguientes componentes: 0.5 µL de oligonucleótido dT20, 100 ng de RNA tratado con DNasa I, 0.5 µL dNTP's 10 mM y agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 65 °C durante 5 min y transcurrido este tiempo, se enfrió en hielo de 2-3 min para posteriormente ser centrifugado durante 1 min. Se preparó una segunda mezcla conteniendo 2 µL 5X First-Strand Buffer, 0.5 µL DTT 0.1 M, 0.5 µL RNase OUT (40U/µL) y 0.5 µL SSIII-RT (200 U/µL). A esta mezcla se le adicionó la segunda mezcla y se incubó a 55 °C durante 50 min. Finalmente, para inactivar la enzima se incubó a 70 °C durante 15 min. El cDNA obtenido fue usado como molde para la amplificación de los genes específicos mediante PCR.

### **6.5.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las PCR's se realizaron usando la enzima DreamTaq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific®) conforme a las especificaciones del proveedor. En un tubo de PCR de 0.2 mL se realizó la mezcla de reacción con los siguientes componentes: 7.0 µL de agua desionizada, 1 µL 10X DreamTaq Buffer, 0.2 µL dNTPs' 10 mM, 0.25 µL oligo Forward 10 µM y Reverse 10 µM, 100 ng cDNA y 0.25 µL DreamTaq DNA Polymerase. La reacción de PCR se llevó a cabo a 94 °C durante 5 min y 30 ciclos de amplificación (94 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s), y finalmente 72 °C durante 10 min; con excepción del gen *GA3OX1* cuya temperatura de alineamiento fue de 56.5 °C.

En las reacciones de PCR realizadas para cada gen, se incluyeron controles negativos, los cuales son componentes de la mezcla de reacción de PCR sin cDNA

y componentes de la mezcla de reacción de PCR más RNA tratado con DNasa I; esto con la finalidad de descartar posible contaminación con DNA y así asegurar la amplificación a partir de cDNA obtenido. Para la verificación del nivel de amplificación de cada gen bajo estudio, los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.2% de acuerdo a las condiciones antes mencionadas.

### **6.6 Estudio de expresión génica**

Se estudió la expresión génica de manera semicuantitativa a partir del análisis de imagen de productos de PCR según lo establecido por Antiabong et al. (2016) con algunas modificaciones. Los genes *SIEXP4*, *SIMAN2*, *SLGULB*, *GAPDH*, *ABA-H/CYP707A2* y *GA3OX1* fueron amplificados usando 100 ng de cDNA tanto en el control como en los tratamientos seleccionados, y fueron sometidos a electroforesis en agarosa a 3.5% en 1x Tris-Borato-EDTA (TBE) a 3.26 V/cm durante 50 min. Posteriormente, se tiñó utilizando el colorante Gel Red y se visualizó mediante un transiluminador con luz ultravioleta adaptado a un equipo fotodocumentador Kodak Gel Logic 100 Imaging System. El tamaño y grosor de la agarosa, así como la concentración de reactivos se mantuvieron constantes. El análisis de imagen se realizó usando el programa VisionWorks asociado al fotodocumentador. Se determinó la densidad de área promedio de los productos amplificados de cada gen y cada tratamiento, para finalmente ser normalizados los resultados usando los valores de densidad de área promedio del gen constitutivo actina (Jelka & Breljak, 2005). Los resultados se expresaron como densidad relativa en píxeles.

### **6.7 Análisis estadístico**

Para los ensayos de germinación se realizó un diseño completamente aleatorizado, se probaron los supuestos de distribución de normalidad de los datos (prueba de Kolmogorov smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene).

Posteriormente, se realizó el análisis de las muestras utilizando un modelo de análisis de varianza (ANOVA) de una vía y se aplicó la prueba de separación de medias de Fisher ( $p < 0.05$ ) para la determinación de las diferencias entre las condiciones de electrocultivo. Se seleccionaron aquellas que fueron significativamente mejores en términos de los parámetros de emergencia y en los índices de desarrollo temprano.

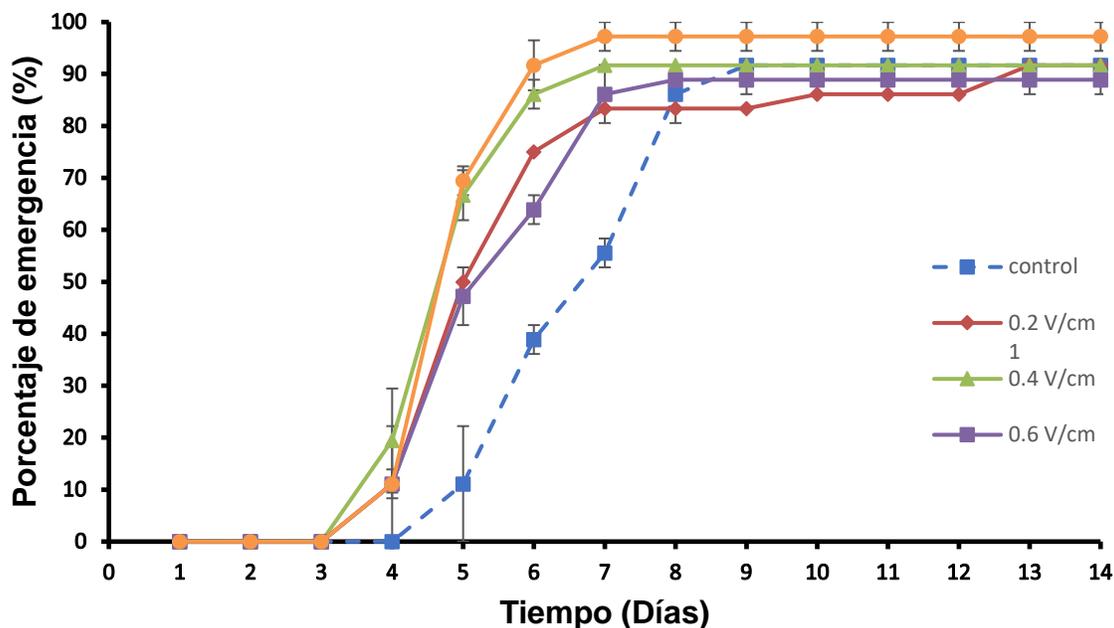
En los ensayos de determinación de ROS y ensayos de expresión génica se utilizó un modelo de análisis de varianza (ANOVA) de una vía y se aplicó la prueba de separación de medias de Fisher ( $p < 0.05$ ) para la determinación de las diferencias entre las condiciones de electrocultivo seleccionadas y sus respectivos controles. El análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico STATISTICA versión 12.

## **CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Emergencia de plántulas e índices de crecimiento

La germinación de las semillas y la emergencia de las plántulas son una de las fases más importantes y vulnerables en el ciclo de vida de las plantas. Se entiende como germinación al periodo desde la imbibición hasta el punto de la protusión del embrión a través de cualquier tejido de cobertura, mientras que la emergencia se refiere a la aparición de las plántulas en la superficie del suelo o sustrato, la cual es una etapa posterior a la germinación (Bradford & Nonogaki, 2007). El porcentaje de emergencia es uno de los principales parámetros para analizar el crecimiento temprano de semillas sometidas a algún tipo de tratamiento y así evaluar su efectividad (Mahmood & Usman, 2014). La efectividad en parámetros de emergencia de plántulas y parámetros de desarrollo temprano de las semillas de tomate sometidas a distintos DCEF (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 V/cm) se presentan en Figura 7.1



**Figura 7.1** Efectos del campo eléctrico sobre la germinación. Semillas ( $n = 25$ ) tratadas durante 3 h con 0.2 V/cm (rojo), 0.4 V/cm (verde), 0.6 V/cm (morado) y 0.8 V/cm (naranja) durante 14 días. Los resultados se compararon con un control no tratado (azul). Barras representan error estándar.

En la Figura 7.1 se evidencia como se desarrolló la emergencia de las plántulas durante los primeros 14 días después de la imbibición. Se puede observar como la emergencia comenzó al menos un día antes en todos los tratamientos con respecto al control. De manera similar, el porcentaje máximo de emergencia ocurrió entre el séptimo y octavo día en aquellas semillas sometidas al tratamiento eléctrico, mientras que en las semillas control se obtuvo el máximo de emergencia hasta después del noveno día. Un aspecto importante entre las características de germinación y emergencia es la homogeneidad (Bradford & Nonogaki, 2007), la cual se puede observar en los grupos de semillas sometidas a tratamiento eléctrico, pues la mayoría de las plántulas habían emergido entre el 5to y 6to día, mientras que en las plántulas control la emergencia se observó de forma más lenta entre el 5to y 8vo día (Figura 7.1).

Esta mejora tanto en la germinación y emergencia se ha reportado en numerosas ocasiones, tanto en la aplicación de campos eléctricos como magnéticos, siendo esta última la más ampliamente estudiada en diversas especies, como maíz (Azita et al., 2011), trigo (Cakmak et al., 2009), frijol (Cakmak et al., 2009) y tomate (de Souza et al., 2010). Con respecto al efecto de campos eléctricos en la germinación, si bien existen varios estudios sobre este tema, son escasas las investigaciones que reportan mejoras en la germinación inducida por la aplicación de DCEF de baja intensidad (Acosta-Santoyo et al., 2018; Dannehl, 2018; Morales et al., 2021).

En los hallazgos encontrados en el presente estudio al aplicar DCEF, no fue posible observar un efecto significativo ( $P < 0.05$ ) en el porcentaje final de emergencia (FEP) en los tratamientos estudiados con respecto al control (Cuadro 7.1). Este resultado contrasta con lo observado en otros estudios, en los que observaron una mejora en la germinación al aplicar campos eléctricos de baja intensidad en algunas especies como *Arabidopsis thaliana*, pepino y *M. mathildae*, entre algunas otras (Acosta-Santoyo et al., 2018; Morales et al., 2021). No obstante, en estos estudios no se había evaluado la efectividad de este tipo de estímulos en semillas de tomate, además de que los resultados obtenidos en este estudio, tanto en semillas control como en los tratamientos, el FEP fue mayor al 88%. Este hecho evidencia la excelente calidad de las semillas utilizadas en el presente estudio, trayendo como consecuencia márgenes de mejora demasiado cortos (Hilhorst et al., 1998). Un escenario similar fue reportado por Wang et al., (2009), donde midieron el porcentaje de germinación de semillas de arroz sometidas a campos electroestáticos de alto voltaje, no encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control; sin embargo, en semillas envejecidas, el porcentaje de germinación e índice de vigor de la semilla presentaron una mejora significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a semillas no tratadas.

Por lo tanto, podemos inferir que una opción para evaluar el efecto de DCEF en la germinación, sería utilizar semillas de tomate de menor calidad, sometidas a un proceso de envejecimiento acelerado o realizar la germinación en condiciones de estrés.

**Cuadro 7.1** Efecto en los parámetros de emergencia de semillas sometidas a distintos DCEF en un periodo de 3 h.

Campo eléctrico (V/cm)	FEP	ERI	MET	EI
0	91.66 ± 0.0	16.61 ± 1.92	6.9 ± 0.104	1.64 ± 0.043
0.2	91.66 ± 4.8	18.03 ± 0.443	6.22 ± 0.491	2.04 ± 0.197 *
0.4	91.66 ± 0.0	18.33 ± 0.706	5.12 ± 0.184 *	2.2 ± 0.084 *
0.6	88.88 ± 2.7	16.69 ± 0.28	5.66 ± 0.128 *	1.95 ± 0.081
0.8	97.22 ± 2.7	18.94 ± 0.162	5.21 ± 0.157 *	2.27 ± 0.019 *

**Nota:** Los valores con un asterisco dentro de cada bloque difieren significativamente ( $p < 0.05$ ). Los valores mostrados corresponden a la media ± error estándar.

Además del parámetro FEP, se estudiaron los parámetros de porcentaje de índice de velocidad de emergencia (ERI, por sus siglas en inglés), el tiempo medio de emergencia (MET) e índice de emergencia (EI). Valores altos de ERI y EI indican una emergencia uniforme y rápida (Mahmood & Usman, 2014). En el Cuadro 7.1 podemos observar que en el ERI no hay un efecto significativo de los tratamientos con respecto al control, sin embargo, resalta un valor muy alto de error estándar en el tratamiento control, que puede atribuirse a la alta variabilidad de los datos. En lo que respecta al EI se puede observar cómo los tratamientos de 0.2, 0.4 y 0.8 V/cm fueron significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control. Este hallazgo podría estar demostrando que estos tratamientos muestran una emergencia más rápida y uniforme, lo que concuerda con lo observado en el comportamiento de la germinación respecto al tiempo (Figura 7.1).

Valores altos en el MET indican más tiempo requerido para la emergencia de las plántulas (Rahman et al., 2020). En este estudio fueron obtenidos valores estadísticamente más bajos ( $p < 0.05$ ) en las semillas tratadas con campos eléctricos de 0.4, 0.6 y 0.8 V/cm con respecto al control, con valores que oscilan entre los 5.1 y 5.6 días después de ser sembradas; resultado que podría estar indicando una emergencia relativamente rápida (Mahmood & Usman, 2014). Estos hallazgos

coinciden con lo reportado en otros estudios, en los que reportan un comportamiento similar en semillas de tomate mejoradas mediante otros procesos, como la aplicación de extractos vegetales y sustancias como peróxido de hidrógeno (Rahman et al., 2020; Rezende et al., 2017). Desafortunadamente existen pocos estudios que reporten parámetros de emergencia como resultado del tratamiento eléctrico o magnético en semillas. Sin embargo, resultados similares han sido reportados para semillas de maíz que fueron tratadas con agua magnetizada; evidenciando incrementos de hasta un 60% y 26% para EI y ERI, respectivamente, así como una disminución del 17.9% en el MET en comparación con semillas no tratadas. Para estos hallazgos, los autores proponen que probablemente haya una mejora en la movilización y el transporte de nutrientes al eje embrionario después del tratamiento de las semillas con el agua magnetizada, no obstante, aclaran que los mecanismos necesitan mayor investigación para poder ser entendidos en su totalidad (Mahmood & Usman, 2014).

Por otro lado, los parámetros de emergencia se obtuvieron mediante la medición de las plántulas emergidas durante 14 días, mismo tiempo en el que se obtuvieron datos sobre el comportamiento de estas durante su desarrollo, específicamente, a los 8 y 14 días después de que las semillas fueron plantadas y tratadas con DCEF (Figura 7.2). Asimismo, empleando estos parámetros de crecimiento, fue posible estimar el vigor de las semillas y demostrar su estimulación por los tratamientos aplicados. Por lo tanto, a los 8 y 14 días fueron medidos los parámetros de altura de la plúmula, longitud de la raíz, peso seco y húmedo, mientras que a los 8 días se calcularon los índices de vigor de las semillas tratadas y el control.



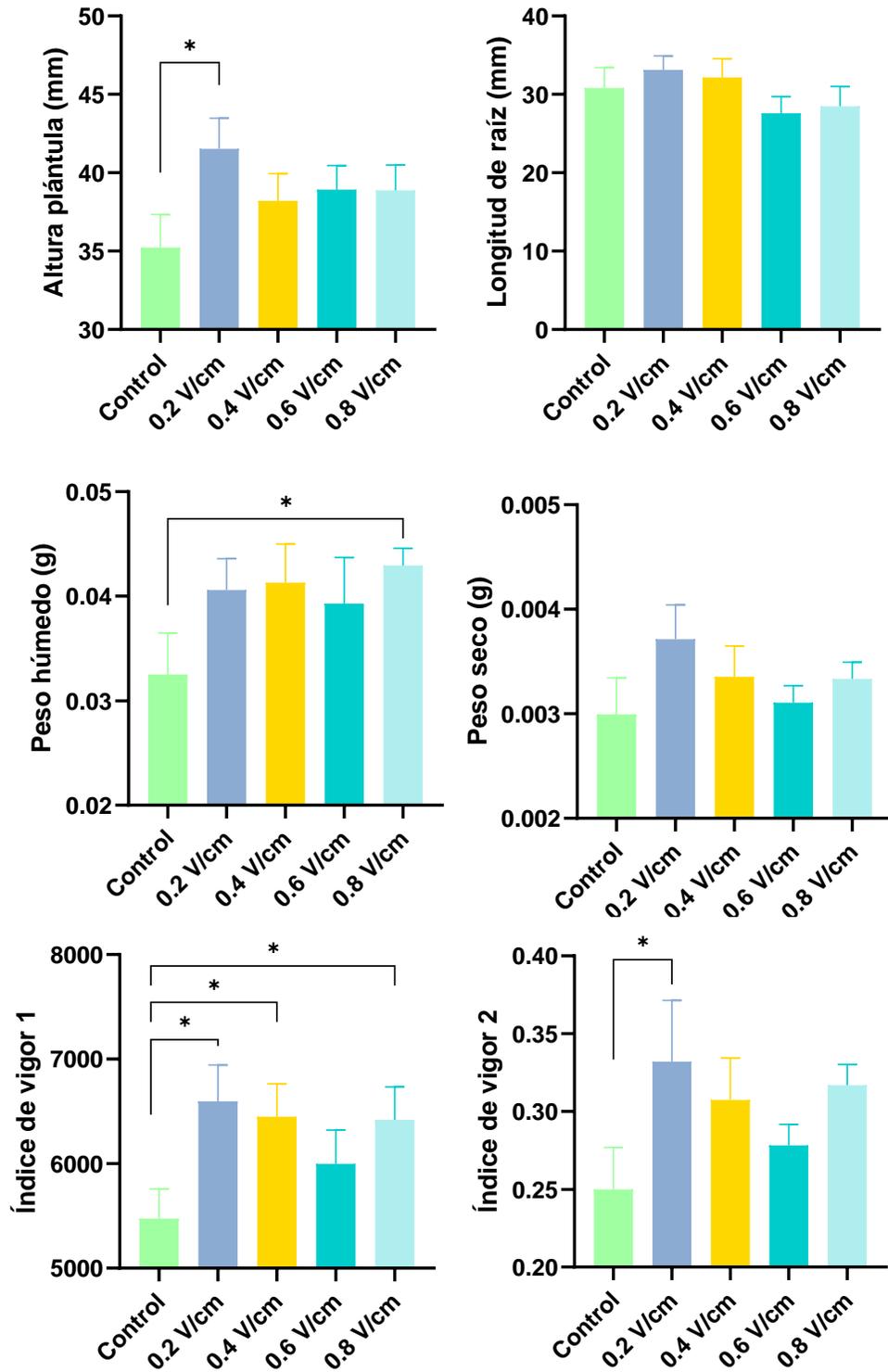
**Figura 7.2** Plántulas de tomate después de la aplicación de los DCEF; (a) a los 8 días y (b) a los 14 días.

En las Figuras 7.2 y 7.3 podemos observar que, a los 8 días de ser sembradas las semillas, existe un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la altura de la planta en el tratamiento de 0.2 V/cm con respecto al control. Asimismo, es posible observar que a los 14 días (Figura 7.4) tanto en el tratamiento de 0.2 V/cm como en el tratamiento de 0.6 V/cm ya existía un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la altura de la plántula en comparación con el control. En diversos estudios se ha reportado la mejora en la altura de las plántulas sometidas a electrocultivos en comparación con aquellas no tratadas. Por ejemplo, Mahmood y Usman (2014), demostraron que la aplicación de agua magnetizada en maíz generaba aumentos de hasta un 10 y 15% en la

altura de plántulas de 15 días, con respecto al control. De igual manera, en otros estudios han sido reportados aumentos de hasta 20% en la altura de plántulas de pepino, en comparación con aquellas no tratadas al aplicar campos eléctricos de baja intensidad (0.2 V/cm durante 4 h) a nivel semilla (Morales et al., 2021; Pimentel et al., 2019). Así, este resultado indicaría que los tratamientos eléctricos de baja intensidad estimulan el crecimiento en etapas tempranas de desarrollo.

En lo que respecta a la longitud de raíz, no se encontraron diferencias significativas en todos los tratamientos con respecto al control para ambos tiempos de evaluación (8 y 14 días); no obstante, fue posible observar a los 14 días un ligero aumento en la longitud de la raíz en el tratamiento de 0.6 V/cm. Estos resultados son contrastantes con los hallazgos encontrados en otros estudios, donde después de la aplicación de electrocultivos, han reportado mejoras significativas ( $p < 0.05$ ) en la longitud de la raíz a los 14 días de ser aplicados los DCEF en semillas de pepino (Morales et al., 2021; Pimentel et al., 2019) y soya (Radhakrishnan & Ranjitha Kumari, 2012).

Esta diferencia encontrada en presente estudio podría ser explicado en función de que la raíz del tomate es especialmente delicada en etapas tempranas de desarrollo (E. P. Heuvelink et al., 2020). Asimismo, se podría inferir que el hecho de que la tierra utilizada en este ensayo no haya sido sometida a un proceso de tamizado con la finalidad de evitar un fenómeno de compactación, pudo dificultar la extracción de la raíz de forma íntegra, pues estas se anclan fuertemente a piedras y otros materiales sólidos que conforman el suelo utilizado en este estudio. Por esta razón, para futuros estudios se recomendaría utilizar un tipo distinto de suelo como medio electroquímico.



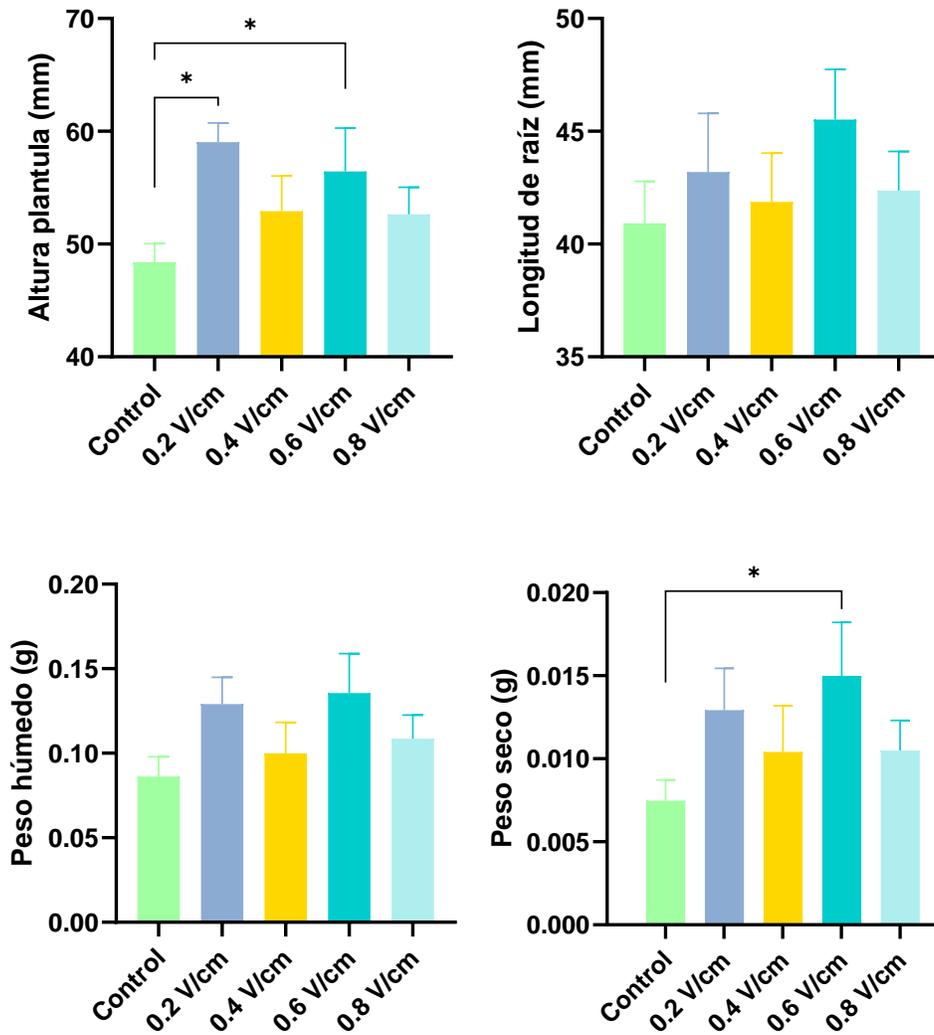
**Figura 7.3** Parámetros de crecimiento en plántulas 8 días después del tratamiento con DEFC. Las barras de error representan error estándar y \* representa  $p < 0.05$ .

En el caso del peso húmedo, se observaron solo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el tratamiento 0.2 V/cm a los 8 días de ser sembradas las semillas en comparación con el control. Aunque a los 14 días no se observaron diferencias significativas, los valores del peso húmedo en los tratamientos de 0.2 y 0.6 V/cm se mostraron ligeramente superiores al control, sugiriendo un temprano y mejorado desarrollo en etapas tempranas del desarrollo del tomate. Por otro lado, el peso seco medido a los 8 días no mostró diferencias significativas en ningún tratamiento con respecto al control, aunque en el tratamiento de 0.2 V/cm se observó ligeramente superior; mientras que a los 14 días se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tratamiento de 0.6 V/cm y el control. Tanto el peso seco como el peso húmedo son parámetros importantes, pues dan una idea de la biomasa generada por la planta. En diversas ocasiones se han reportado incrementos en la biomasa de plántulas, tras someter a semillas a estímulos tanto eléctricos como magnéticos. En particular, en el caso de estímulos magnéticos, se han encontrado mejoras en trigo (Hussain et al., 2020; Cakmak et al., 2009), soya (Radhakrishnan & Ranjitha, 2012) y tomate (de Souza et al., 2010). Mientras que, en el caso de campos eléctricos, resultados similares a este estudio, se han reportado para pepino, donde los autores utilizaron electrodos de  $\text{IrO}_2/\text{Ta}_2\text{O}_5$  (como ánodo) y Ti (como cátodo) aplicando un estímulo de 0.2 V/cm durante un periodo de cuatro horas, logrando una mejora del 53% en la biomasa con respecto al control. Estos autores sugirieron que esta mejora podría estar mediada por la electromigración de nutrientes y la electro-ósmosis de bacterias y hongos en el suelo, dando como resultado una absorción más efectiva de los nutrientes por parte de la planta (Morales et al., 2021).

La determinación de pruebas de vigor en semillas se ha llevado a cabo como un procedimiento regular en el estudio de semillas, ya que el vigor es considerado un indicador de su calidad. En este estudio se determinaron 2 índices de vigor; el primero utilizando el porcentaje de emergencia y la longitud de la plúmula como indicador de vigor (índice de vigor I) y el segundo utilizando el porcentaje de emergencia y el peso seco (índice de vigor II); ambos determinados al final de los 8

días de emergencia (Figura 7.3). En lo que respecta al índice de vigor I se pudieron observar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en todos los tratamientos con respecto al control, con excepción del tratamiento a 0.6 V/cm; mientras que en el índice de vigor II solo fue posible observar un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) del vigor en el tratamiento 0.6 V/cm.

Como se mencionó con anterioridad, los índices de vigor están fuertemente influenciados por el porcentaje de emergencia o germinación de las semillas estudiadas. En este caso en el tratamiento de 0.6 V/cm se obtuvo un valor en el FEP de 88%, dando como consecuencia que el índice de vigor I no mostrara diferencias significativas. Por otro lado, en el índice de vigor II la conversión de biomasa en el tratamiento de 0.6 V/cm fue tan alta que incluso teniendo un valor de emergencia menor que el resto de los tratamientos, mostró un valor significativamente más alto en comparación con el control. En estudios previos se ha reportado el efecto de campos magnéticos sobre los índices de vigor I y II en trigo (reina et al., 2020), donde reportaron un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el índice de vigor I al aplicar un tratamiento de 10 mT durante 10 min, mientras que en el índice de vigor II los tratamientos de 10 mT y 15 mT por 15 min, presentaban un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) con respecto al control. Sin embargo, es este estudio los autores no plantean explicación alguna acerca del posible mecanismo involucrado para los resultados obtenidos.



**Figura 7.4** Parámetros de crecimiento en plántulas 14 días después del tratamiento con DEFC. Las barras de error representan error estándar y \* representa  $p < 0.05$

Como se mencionó en capítulos anteriores, entre las hipótesis propuestas para explicar cómo las semillas podrían estar sensando los estímulos eléctricos o magnéticos, se propone que este tipo de estímulos podrían estar induciendo una hiperpolarización de la membrana plasmática al perturbar canales de calcio dependientes de voltaje e induciendo un aumento en el flujo de iones y otras sustancias, como el agua. Esto último es especialmente importante, específicamente para los parámetros de germinación y emergencia, ya que una

rápida absorción de agua hidrataría con más premura los tejidos de la semilla y por tanto se activarían con más rapidez los procesos metabólicos que darían lugar a la germinación, más rápida y homogénea, que indicaría una mejoría en la calidad de las semillas (Dannehl, 2018; Goldsworthy, 2008). Esta rápida absorción de agua, inducida por la aplicación de estímulos eléctricos, podría deberse a cambios en la concentración de iones como el  $\text{Ca}^{2+}$  que podrían estar alterando la magnitud de la densidad de corriente iónica a través de la membrana celular, así como provocar modificaciones en la presión osmótica y en la capacidad de absorción de agua de los tejidos celulares (Reina & Pascual, 2001). Además de que el ion  $\text{Ca}^{2+}$  forma parte integral de la regulación de las especies reactivas de oxígeno y hormonas vegetales, y esta regulación es indispensable para que se lleve a cabo el proceso de germinación.

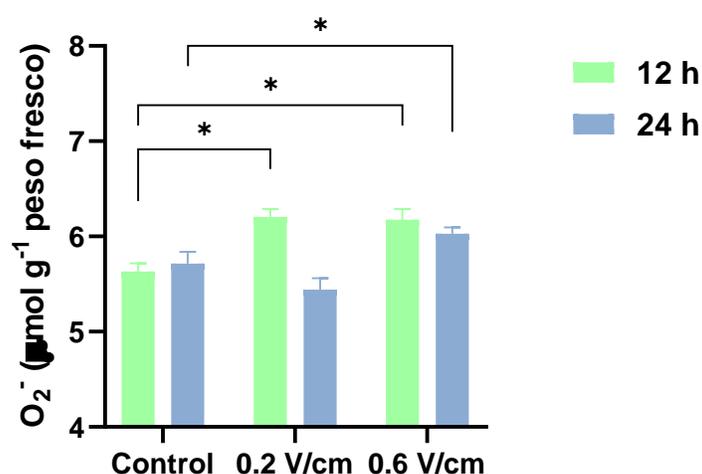
En base a los resultados descritos con anterioridad, se puede concluir que la aplicación de DCEF mejora los parámetros de emergencia y de crecimiento temprano de las semillas de tomate, específicamente con los tratamientos de campos eléctricos de 0.2 y 0.6 V/cm. Por lo tanto, con base en estos hallazgos estas dos condiciones de campo eléctrico fueron seleccionadas para llevar a cabo los ensayos de especies reactivas de oxígeno y genéticos de este proyecto. Los resultados encontrados se muestran a continuación en los siguientes apartados.

## **7.2 Medición de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Una vez comprobado el efecto positivo de la aplicación de DCEF de baja intensidad en semillas de tomate sobre la emergencia de plántulas e índices de crecimiento temprano, se procedió con la búsqueda de una posible explicación de este fenómeno. Se ha demostrado que la aplicación de campos magnéticos y eléctricos sobre plantas, desencadena un estallido oxidativo (Dannehl, 2018); proceso de suma importancia, ya que ROS como el  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  de hidrógeno funcionan como moléculas de regulación en diversos procesos, que puedan dar lugar al proceso de germinación. A continuación, se muestran los resultados concernientes a la

determinación de estas especies reactivas de oxígeno a las 12 y 24 h después de la aplicación del tratamiento eléctrico.

En la Figura 7.5 se presenta el comportamiento del radical  $O_2^-$  en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  para los tratamientos de 0.2 y 0.6 V/cm, donde se puede observar un aumento significativo en la concentración del radical  $O_2^-$  a las 12 h ( $p < 0.05$ ), en comparación con las semillas control.

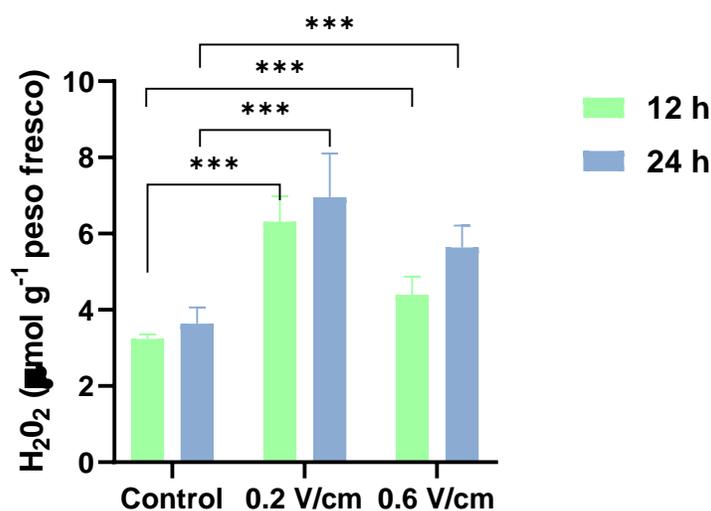


**Figura 7.5.** Efecto de DCEF en semillas de tomate sobre la producción de radical superóxido a las 12 y 24 h después de la aplicación del tratamiento. Las barras de error representan error estándar y \* representa  $p < 0.05$ .

En esta gráfica (Figura 7.5) fue posible observar, con respecto al control, un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la concentración del radical  $O_2^-$  en el tratamiento de 0.6 V/cm a las 24 h. Curiosamente el tratamiento de campo eléctrico de 0.2 V/cm a las 24 h no mostró diferencias significativas con respecto al control, a pesar que a las 12 h se observó una concentración mayor de este radical. Sin embargo, es importante recordar que ROS como  $O_2^-$  tienen un tiempo de vida muy corto en el orden de nanosegundos (Hayyan et al., 2016). En este sentido, las muestras

utilizadas para esta determinación son de grupos distintos (12 y 24 h), por lo que es posible que durante la manipulación de las mismas y el desarrollo del método para cuantificar este radical, se pudieron inducir alteraciones, dando como consecuencia el resultado anteriormente descrito.

Por otro lado, en la Figura 7.6 podemos observar los resultados obtenidos para la concentración de  $H_2O_2$  en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de peso fresco para las semillas tratadas eléctricamente (0.2 V/cm y 0.6 V/cm) y el control. Resalta a la vista que en ambos tratamientos estudiados se evidencia un aumento significativo ( $p < 0.001$ ) en la concentración de esta molécula con respecto al control, siendo más marcada la diferencia en las muestras de semillas que fueron tratadas con DCEF de 0.2 V/cm. También es posible observar un incremento de la concentración de  $H_2O_2$  en todas las muestras a las 24 h con respecto a lo obtenido a las 12 h.



**Figura 7.6.** Efecto de DCEF en semillas de tomate sobre la producción del peróxido de hidrógeno a las 12 y 24 h después de la aplicación del tratamiento. Las barras de error representan error estándar y \*\*\* representa  $p < 0.001$

El proceso de germinación *sensu stricto* comienza con la hidratación de los tejidos y termina con la protrusión de la radícula a través de la testa de la semilla (Rajjou et al., 2012). En este sentido, en cuanto los tejidos se ven hidratados comienza una importante producción de ROS, donde sus principales fuentes durante este proceso son las mitocondrias, el peroxisoma y las NADPH oxidasas de la membrana plasmática. Los niveles de ROS deben estar estrictamente regulados para cumplir su función como moléculas mensajeras, de tal manera que las semillas deben tener un sistema antioxidante eficiente para regular la concentración de ROS (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2015).

Estudios previos han reportado que la aplicación de campos eléctricos y magnéticos estimulaban tanto la producción de ROS como la actividad de enzimas antioxidantes en semillas (Anand et al., 2019; Z. G. Li et al., 2019; Ozuna et al., 2018; de Souza et al., 2010; Vashisth & Nagarajan, 2010). Shine et al. (2012) aplicaron campos magnéticos de 150 y 200 mT a un tiempo de 1 h en semillas de soya, observando mejoras en la germinación y el desarrollo de las plantas, así como aumentos significativos en la producción del radical superóxido y en la concentración de peróxido de hidrógeno. De igual manera, resultados similares fueron reportados para tomate, aplicando campos magnéticos de 100 mT por 30 min (Anand et al., 2019), donde los valores de concentración tanto del radical superóxido como del peróxido de hidrógeno en las semillas magneto primadas, fueron muy similares a los resultados encontrados en la presente investigación, tanto a las 12 como a las 24 h de ser sometidas las semillas al tratamiento de DCEF de baja intensidad.

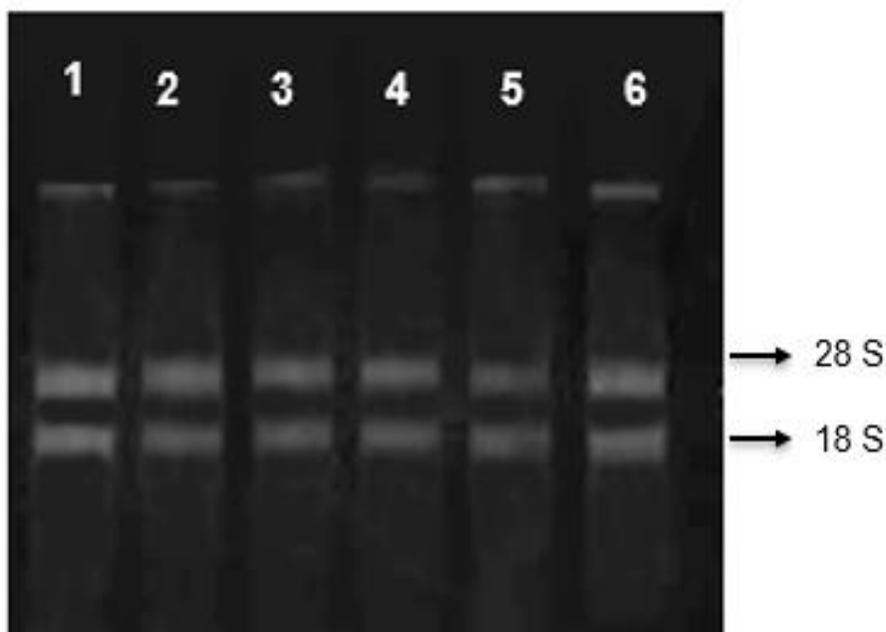
Una vez demostrado que los DCEF de baja intensidad inducían cambios en la concentración celular de ROS como  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , se procedió a plantear una posible explicación sobre su mecanismo de acción. En estudios recientes, se han informado sobre las interacciones entre ROS y hormonas vegetales durante la germinación de semillas, así como el crecimiento temprano de las plántulas (Ju et al., 2020). Se ha sugerido que el  $H_2O_2$  puede regular la latencia de las semillas a través de la activación de la señalización y/o biosíntesis del GA y el catabolismo del ABA, hormonas antagonistas que tienen un papel clave en la germinación de las semillas;

donde el GA induce la transcripción de enzimas hidrolasas ( $\alpha$ -amilasa, Endo- $\beta$ -manasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa etc.) que degradan la pared celular del endospermo y a su vez son inhibidas por ABA (Anand et al., 2019; Z. Li et al., 2018; El-Maarouf-Bouteau et al., 2015). Por lo tanto, con el fin de comprobar que estos supuestos están sucediendo, se llevó a cabo la estimación del efecto de DCEF de baja intensidad en la expresión de genes que codifican para enzimas encargadas de la síntesis y catabolismo de las hormonas GA y ABA. Asimismo, se procedió a evaluar la presencia de algunas enzimas hidrolíticas importantes en la germinación *sensu stricto* utilizando herramientas genéticas.

### **7.3 Extracción purificación y cuantificación del RNA**

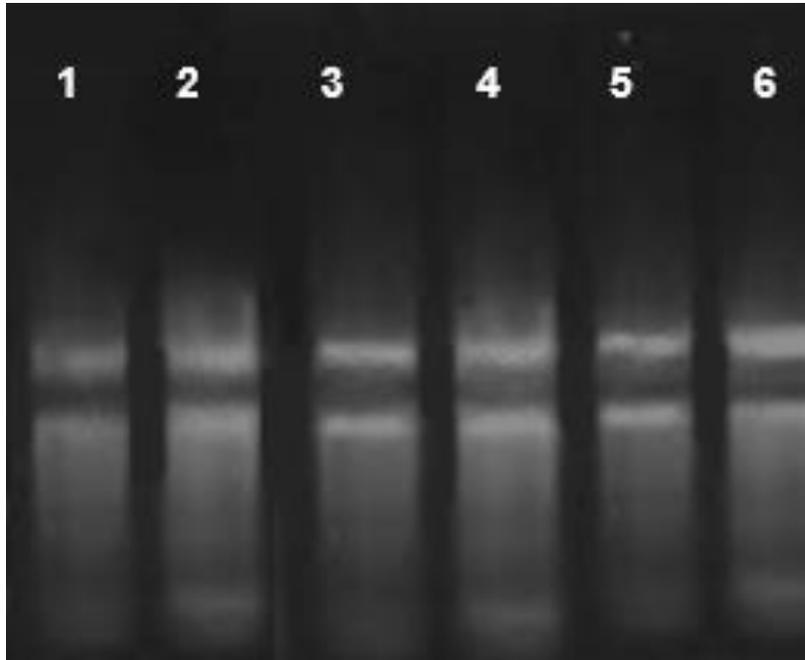
Para brindar una explicación molecular a los resultados obtenidos hasta este punto, se extrajo RNA de las semillas control y las tratadas con DCEF, a las 12 y 24 h de haber sido sometidas al estímulo, para posteriormente someter las muestras de RNA a una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

En la Figura 7.7, se observa la presencia de dos bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28 S y 18 S, así como una marcada banda ubicada en la parte superior de la imagen correspondiente al DNA genómico.



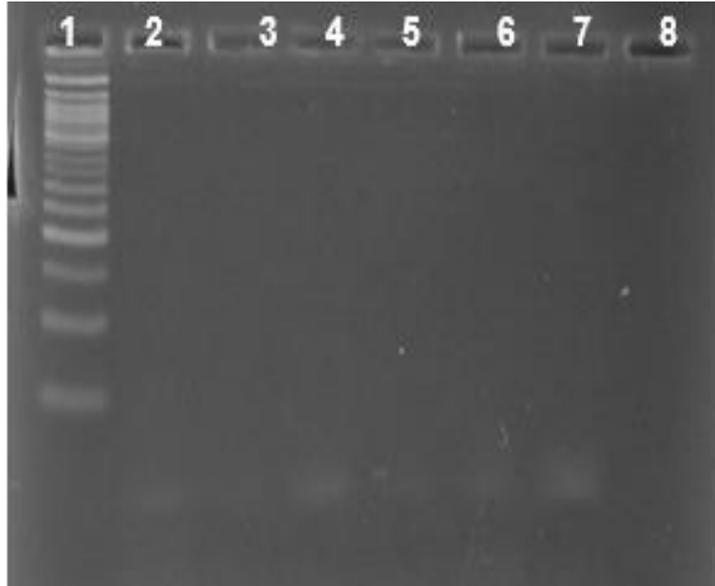
**Figura 7.7** Electroforesis en gel de agarosa de muestras de RNA de semillas de tomate. Carril 1: Muestras control a las 12 h de haber sido sembrada; carril 2: Muestras control a las 24 h de haber sido sembrada; carril 3: Muestras a las 12 h después de ser sometidas a 0.2 V/cm durante 3 h; carril 4: Muestras a las 24 h después de ser sometidas a 0.2 V/cm durante 3 h; carril 5: Muestras a las 12 h después de ser sometidas a 0.6 V/cm durante 3 h; carril 6: Muestras a las 24 h después de ser sometidas a 0.6 V/cm durante 3 h.

Para este tipo de análisis es necesario realizar un tratamiento para eliminar este DNA genómico, puesto que el RNA extraído será usado para la síntesis de cDNA. Para esto, las muestras de RNA fueron tratadas con DNasa I y sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%, con la finalidad de poder evaluar de forma visual algún remanente de DNA.



**Figura 7.8** Electroforesis en gel de agarosa de muestras de RNA tratadas con DNAsa I. RNA de semillas de tomate. Carril 1: Muestras control a las 12 h de haber sido sembradas; carril 2: Muestras control a las 24 h de haber sido sembrada; carril 3: Muestras a las 12 h después de ser sometidas a 0.2 V/cm durante 3 h; carril 4: Muestras a las 24 h después de ser sometidas a 0.2 V/cm durante 3 h; carril 5: Muestras a las 12 h después de ser sometidas a 0.6 V/cm durante 3 h; carril 6: Muestras a las 24 h después de ser sometidas a 0.6 V/cm durante 3 h.

En la Figura 7.8 se observan las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 18S y 28S, sin apreciar ninguna banda correspondiente a contaminación por DNA genómico. Antes de ser sintetizado el cDNA es necesario comprobar que este se encuentra libre de contaminación, por lo que se realizaron PCRs utilizando el RNA tratado con la DNAsa, como molde para amplificar el gen de actina. Sumado a ello, se realizó una PCR en ausencia templado para descartar la contaminación por parte de los reactivos. Los resultados se muestran en la Figura 7.9, donde se observa una ausencia de bandas en todos los carriles donde se cargaron las reacciones descritas con anterioridad, lo que demuestra que no existe contaminación por DNA genómico.



**Figura 7.9** Electroforesis en gel de agarosa. PCR gen de Actina; carril 1, DNA Ladder 50bp; carril 2-7, PCR usando como molde RNA de semilla de tomate tratado con DNAsa I; carril 8, PCR muestra sin templado.

El RNA tratado con la DNAsa fue cuantificado y se reportó el rendimiento de la extracción. En el Cuadro 7.2 se presentan los rendimientos de extracción utilizando el método de Djamy-Tchatchou & Straker, 2012 (2012), así como las relaciones entre las absorbancias a los valores de longitud de onda de 260, 280 y 230 nm ( $260\text{ nm}/280\text{ nm}$  y  $260\text{ nm}/230\text{ nm}$ ).

El rendimiento en la extracción fue considerablemente bajo en comparación con lo obtenido para el sistema biológico en el que fue estandarizado el método (aguacate,  $164.67 \pm 6.09\ \mu\text{g g}^{-1}$  peso fresco). En estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación se ha probado la extracción de RNA de semillas de tomate con el método de TRIzol, así como otros métodos basados en fenol, aunque en las semillas bajo estudio en esta investigación se ensayaron estos protocolos de extracción aplicando distintas variaciones, se obtuvieron nulos resultados en la extracción (datos no mostrados); lo que es atribuido a la presencia de un alto

contenido de proteínas, carbohidratos y polifenoles en las semillas de tomate (Fahimdanesh, 2013; Demirbas, 2010; SOGI, 2005). Por lo descrito anteriormente, se planteó utilizar el método de Djamy-Tchatchou & Straker (2012), que mediante experimentos preliminares se había demostrado su eficacia para la extracción de muestras, aunque con un rendimiento menor.

Una forma de evaluar la pureza de la extracción de RNA es midiendo la relación entre los valores de las absorbancias en las longitudes de onda de 260 nm, 280 nm y 230 nm ( $260\text{ nm}/280\text{ nm}$  y  $260\text{ nm}/230\text{ nm}$ ), ya que ha sido reportado que a las longitudes de onda antes descritas, absorben los ácidos nucleicos, algunas proteínas y compuestos fenólicos, y algunos contaminantes de extracción como EDTA, isotiocyanato de guanidina, entre otros, respectivamente. Es importante enfatizar que se considera como “puro” cuando los valores están cercanos a 2 en ambas relaciones descritas con anterioridad (Djami-Tchatchou & Straker, 2012; Kistner & Matamoros, 2005).

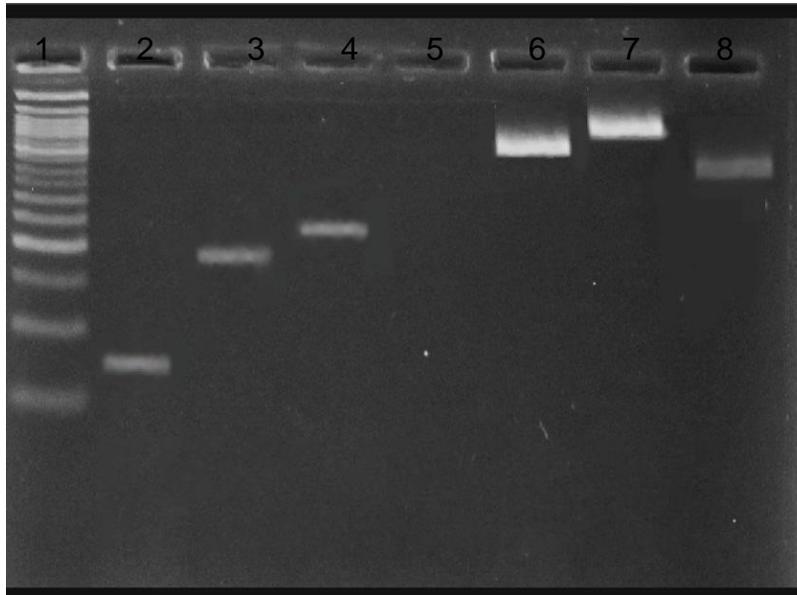
Como puede observarse en el Cuadro 7.2, en la mayoría de los tratamientos, con excepción de los tratamientos a 0.2 V/cm, se tienen valores alejados de 2 para ambas relaciones de absorbancia ( $260\text{ nm}/280\text{ nm}$  y  $260\text{ nm}/230\text{ nm}$ ), sugiriendo que el RNA extraído muestra signos de contaminación. Este hallazgo puede atribuirse a que durante la extracción de RNA, en el paso de eliminar el sobrenadante con cloruro de litio (encargado de precipitar el RNA), se dejó una parte de este, pues se encontró que el RNA no se precipitaba apropiadamente (resultados no mostrados). No obstante, se decidió continuar con la síntesis del cDNA, principalmente porque ningún otro método probado fue efectivo para la extracción de RNA.

**Cuadro 7.2** Medición de concentración y calidad del RNA extraído. RNA de semillas de tomate.

Campo eléctrico (V/cm)	Tiempo	Rendimiento RNA (ng/ $\mu$ L)		A <sub>260/280</sub>		A <sub>260/230</sub>	
0	12	16.54 $\pm$	1.49	1.65 $\pm$	0.13	1.49 $\pm$	0.06
0.0	24	14.4 $\pm$	1.31	1.72 $\pm$	0.10	2.22 $\pm$	0.11
0.2	12	16.57 $\pm$	0.51	2.14 $\pm$	0.09	1.86 $\pm$	0.07
0.2	24	48.6 $\pm$	0.83	2.24 $\pm$	0.12	1.89 $\pm$	0.02
0.6	12	34.4 $\pm$	1.21	1.62 $\pm$	0.04	1.52 $\pm$	0.08
0.6	24	31.41 $\pm$	1.29	1.9 $\pm$	0.06	1.80 $\pm$	0.01

**Nota:** Los valores mostrados corresponden a la media  $\pm$  error estándar. \*Corresponde al tiempo en el que las muestras se tomaron después del tratamiento.

Utilizando DNA genómico se probaron mediante PCR los oligonucleótidos previamente sintetizados por una empresa especializada, lo anterior, con la finalidad de verificar la funcionalidad de estos. En la Figura 7.10 podemos observar desde los carriles 2-4 un solo producto correspondiente a los genes *SIGULB*, *SIMAN2* y *GA3Ox1* del tamaño esperado (210 pb, 156 pb y 86 pb, respectivamente). Desafortunadamente, en el carril 5, puede observarse una nula expresión del gen constitutivo GAPDH, por lo que se decidió utilizar oligonucleótidos del gen de actina (carril 7, 590 pb), empleados en nuestro grupo de trabajo, como nuevo gen constitutivo. En los carriles 6 y 8, correspondientes a los genes EXP4 y ABA-H, pudo observarse un solo producto, sin embargo, no correspondió a los tamaños esperados de los pares de oligonucleótidos sintetizados, por lo que se tomó la decisión de descartar estos genes para el presente estudio.



**Figura 7.10** Electroforesis en gel de agarosa 3.5%. PCR con DNA genómico de tomate como templado. Carril 1, DNA Ladder 50 pb; carril 2, *GA3Ox1*; carril 3, *SIMAN2*; carril 4, *SIGULB*; carril 5, *GAPDH*; carril 6, *EXP4*, carril 7, *Actina*; carril 8, *ABA-H*.

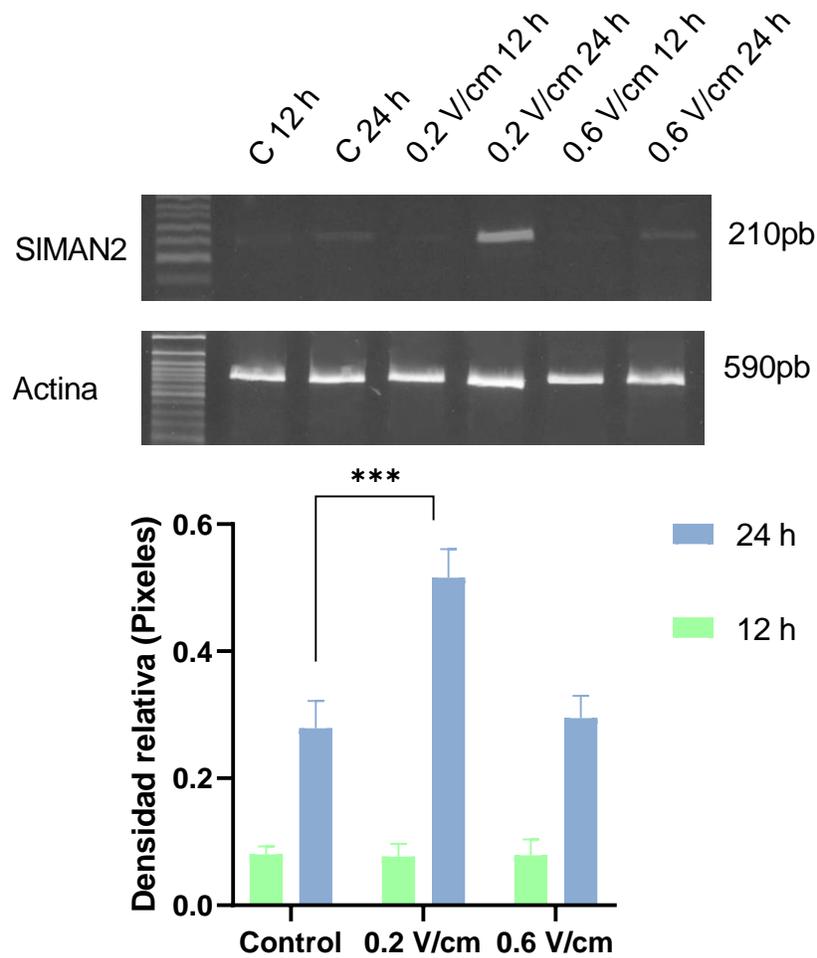
#### **7.4 Estudio de expresión génica mediante RT-PCR**

Como se mencionó anteriormente, son pocos los estudios que han dirigido sus investigaciones a la explicación de los cambios provocados por la aplicación de electrocultivos en semillas, sin embargo, se han propuesto probables mecanismos de acción. A la hora de fundamentar un posible mecanismo de acción en respuesta a algún estímulo, es conveniente realizar un análisis de expresión génica. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las principales herramientas utilizadas para este tipo de análisis, donde la PCR convencional es un ensayo de punto final, por lo que los productos amplificados solo se detectan al final mediante una electroforesis y los resultados solo se pueden interpretar como positivos (detectables) o negativos (no detectables). Sumado a ello, la PCR en tiempo real es una variante que arroja datos cuantitativos y posee mayor sensibilidad que la convencional, desafortunadamente para algunos laboratorios el acceso a esta tecnología es aún limitado (Antiabong et al., 2016).

Una manera de utilizar la PCR convencional para estimar de forma semicuantitativa el nivel de expresión de un gen, es realizando un análisis de imagen de los productos amplificados después de someterlos a electroforesis (D. Breljak et al., 2005). Uno de los principales problemas de usar este método, es que es difícil asegurar una cantidad igual de RNA en cada muestra. Por esta razón, en el presente estudio con la finalidad de compensar esta variación en la cantidad de RNA en cada muestra, se utilizó el gen constitutivo Actina, una proteína filamentosa de protoplasma celular que permite normalizar la expresión de los genes *SIGULB*, *SIMAN2* y *GA3Ox1*.

La tapa del endospermo se activa en términos de expresión génica durante la imbibición (Liu et al., 2005), el cual es considerado como la principal limitante físico de la germinación en el tomate. En las semillas de tomate, la dureza de la cubierta del endospermo es debido en esencia, a los galactomananos que componen dicha cubierta (Groot et al., 1988). Asimismo, se ha reportado que *MAN2* es un gen de endo- $\beta$ -mananasa que se expresa exclusivamente en la tapa del endospermo, lo que sugiere la participación de la actividad MAN en el debilitamiento del endospermo (Martínez-Andújar et al., 2012).

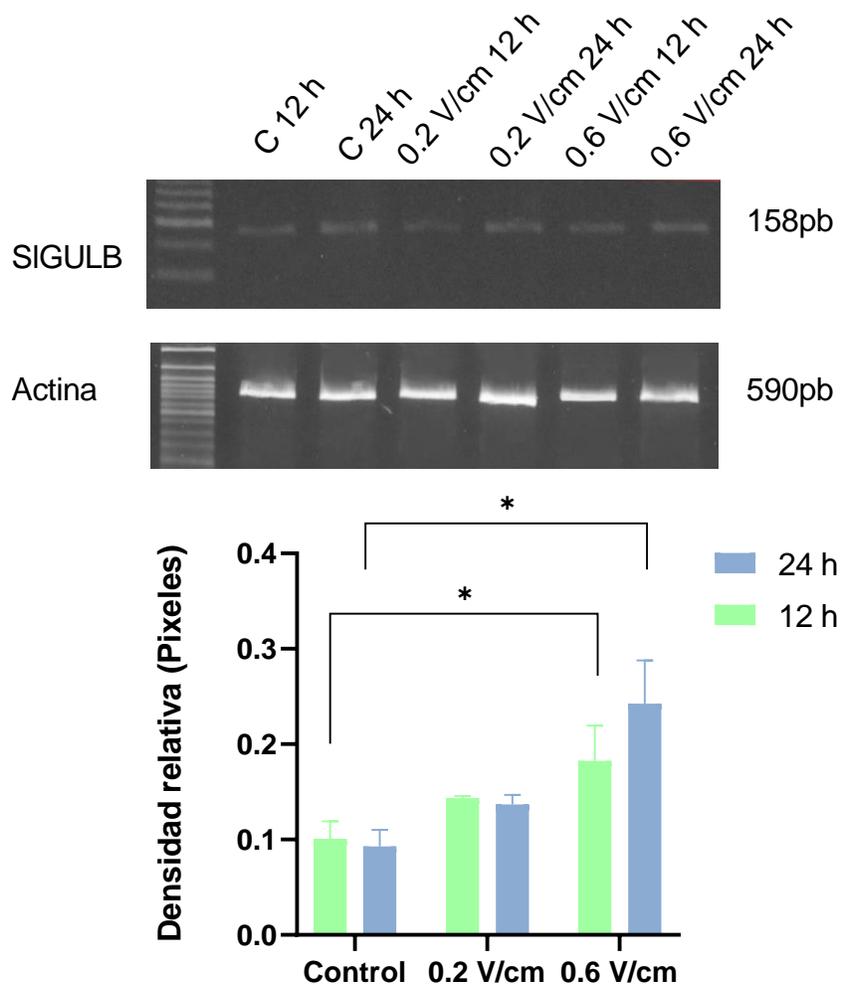
En la Figura 7.11 se muestran los resultados de densidad relativa del gen *SIMAN2*, donde resalta a la vista, una expresión de este gen significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) en el tratamiento de 0.2 V/cm con respecto al control a las 24 h, mientras que a las 12 h la expresión es particularmente baja sin evidenciar diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Estos resultados son similares a lo antes reportado por Nakaune et al. (2012), los cuales estudiaron el efecto del *priming* salino en semillas de tomate, donde reportaron un pico de expresión del gen *SIMAN2* a las 36 h de imbibición, siendo estadísticamente superior que las semillas no tratadas.



**Figura 7.11** Densidad relativa del gen *SIMAN2* en pixeles, a las 12 y 24 h de ser las muestras tratadas con DCEF. Las barras de error representan error estándar y \*\*\* representa  $p < 0.001$ .

Durante la germinación, las  $\beta$ -glucanasas se sintetizan principalmente en la aleurona y el escutelo, siendo secretadas por las células del endospermo. Estas enzimas son responsables de la degradación de los  $\beta$ -glucanos, teniendo una participación en el debilitamiento del endospermo, y por lo tanto, en la germinación *sesu stricto*. En la Figura 7.12 se observan los resultados de densidad relativa del gen *SIGULB*, donde se evidencia para ambos tiempos estudiados (12 y 24 h), un

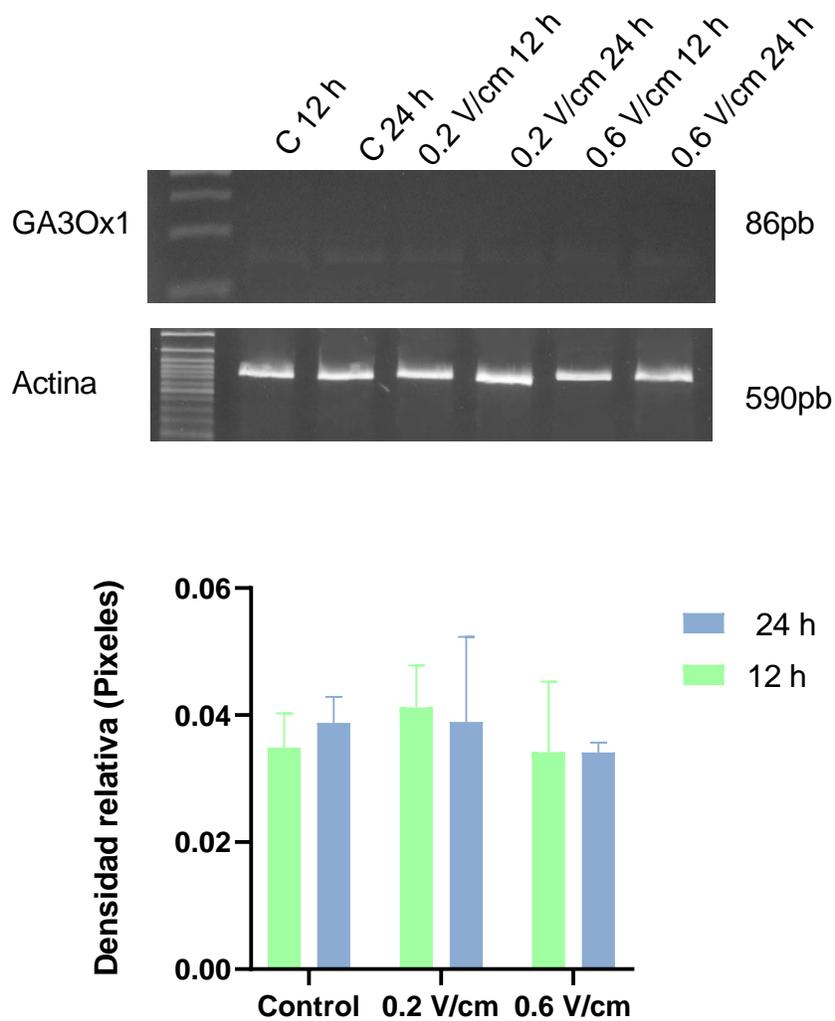
aumento significativo de la densidad de las bandas en el tratamiento 0.6 V/cm con respecto al control.



**Figura 7.12** Densidad relativa del gen *SIGULB* en píxeles, a las 12 y 24 h de ser las muestras tratadas con DCEF. Las barras de error representan error estándar y \* representa  $p < 0.05$ .

Resultados similares fueron obtenidos por Nakaune et al., (2012), quienes encontraron un aumento significativo en la expresión del gen *SIGULB* a partir de las 12 h de imbibición, en el estudio del efecto del *priming* salino en semillas de tomate.

Los valores de densidad relativa del gen *GA3Ox1* se muestran en la Figura 7.13, donde se puede apreciar que estos son considerablemente bajos (menores a 0.05). También, no se encontró para todos los tratamientos analizados con respecto al control, una diferencia significativa en los dos tiempos estudiados.



**Figura 7.13** Densidad relativa del gen *GA3OX1* en pixeles, a las 12 y 24 h de ser las muestras tratadas con DCEF.

Estos resultados son muy interesantes, ya que como se mostró anteriormente, aparentemente sí existe una diferencia en la expresión de los genes *SIGULB* y *SIMAN2*, enzimas hidrolíticas que se expresan en el endospermo micropilar y que son inducidas específicamente por GA, por lo que se esperaría un cambio también en la expresión de *GA3Ox1*. Adicionalmente, los pocos estudios reportados sobre el efecto de estímulos eléctricos y magnéticos en tomate difieren con los resultados obtenidos en el presente estudio. Anand et al. (2018), trataron semillas de tomate con campos magnéticos (100 mT por 30 min), donde además de efectos positivos en la germinación, demostraron que este tratamiento inducía una regulación positiva de los genes codificantes a ABA 8' -hidroxilasa y *GA3Ox1*, que eventualmente conducía a la disminución de la relación ABA/GA3. Mientras que García et al. (2021), después de someter a semillas de tomate a un campo eléctrico (10 kV/cm por 30 s), reportaron un aumento en los niveles del GA y una disminución de los niveles de ABA, así como cambios significativos en los niveles de transcripción del gen *GA20Ox*, que forma parte de la síntesis de GA.

Desafortunadamente, la expresión relativa de *GA3Ox1* estudiada en el presente estudio se encontró demasiado baja como para encontrar diferencias significativas, por lo que es recomendable que para la estimación de la expresión de *GA3Ox1*, sea necesario utilizar una herramienta de análisis más sensible y específica, como lo es la PCR en tiempo real.

## **CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES**

## CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

La aplicación de campos eléctricos de corriente directa de baja intensidad (0.2 y 0.6 V/cm) en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*), mejoran el índice y el tiempo promedio de emergencia, además de parámetros como los índices de desarrollo temprano (altura de plúmula, peso seco y húmedo, e índice de vigor I y II). Además de un incremento en la concentración de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , lo que podría influir en la biosíntesis y degradación de las hormonas ABA y GA.

La aplicación de campos eléctricos de 0.2 y 0.6 V/cm durante 3 h en semillas de tomate aumentan la densidad relativa de bandas de los genes de enzimas hidrolíticas responsables de la degradación del endospermo micropilar *SIMAN2* y *SLGULB*, que son inducidas por GA.

De manera general, se concluye que es necesario realizar más estudios genéticos, preferente usando PCR en tiempo real, para confirmar que la mejora en parámetros de emergencia y de desarrollo temprano en semillas de tomate sometidas a perturbaciones eléctricas de baja intensidad, está relacionada con las especies reactivas de oxígeno y las hormonas vegetales ABA y GA.

## PERSPECTIVAS

A partir de lo presentado y discutido en esta tesis se podrían abrir tres principales vertientes para la realización de futuros trabajos,

1. Es importante continuar el estudio del efecto de los DCEF de baja intensidad en las semillas. Se podrían complementar los resultados de las ROS con ensayos enzimáticos, por ejemplo, ensayos de CAT, SOD y actividad antioxidante total. Además, es importante realizar una determinación de las hormonas GA y ABA mediante cromatografía líquida, principalmente para tener un resultado más tangible del efecto de los DCEF de baja intensidad sobre estas hormonas vegetales. En lo que respecta al estudio genético, actualmente son escasos los estudios que usan esta herramienta para dar una explicación a los fenómenos que se presentan en las semillas sometidas a campos eléctricos o magnéticos, por lo que es sumamente importante seguir estudiando la expresión de genes relacionados con la germinación *sensu stricto*, así como aquellos genes que participan en las rutas de señalización asociadas a la síntesis y metabolismo, tanto de las hormonas vegetales ABA y GA, como de las ROS. También, es recomendable incluir algunos genes que se sabe participan en la vía de señalización del ion  $Ca^{2+}$ , con la finalidad de seguir estudiando la hipótesis planteada en esta tesis.

2. Se considera de gran relevancia continuar con la optimización de la aplicación de los DCEF de baja intensidad. El método utilizado para estimular las semillas utilizadas en esta tesis, presentó algunos inconvenientes que afectaron los análisis genéticos y bioquímicos, pues la aplicación de los estímulos eléctricos fue realizada en suelo y en consecuencia deja a las semillas propensas a contaminación, lo cual no es recomendable para este tipo de análisis de alta sensibilidad. Además, de que el rendimiento de semillas estimuladas por hora es bajo, lo que lo hace poco factible para aplicarse en gran escala. Para ello, utilizando los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda estandarizar un método de mejoramiento de semillas mediante DCEF de baja intensidad empleando medios electrolíticos distintos, como

soluciones salinas a bajas concentraciones, y probando distintos materiales de electrodos.

3. Se plantea en futuros estudios evaluar el efecto del tratamiento de los DCEF de baja intensidad en semillas a largo plazo. Sería de gran interés estudiar cómo se comportan las plantas tratadas en su etapa de semilla a lo largo de todo su desarrollo vegetativo y etapa de floración, así como en la cantidad y calidad de los frutos producidos. Además, sería de gran relevancia estudiar nuevas características que podrían adquirir las plantas una vez fueron estimuladas con este tipo de perturbaciones, como la resistencia hacia algunos estresores bióticos y abióticos

## **CAPÍTULO 9. REFERENCIAS**

## CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

- Abedinpour, M., & Rohani, E. (2017). Effects of magnetized water application on soil and maize growth indices under different amounts of salt in the water. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 7(3). <https://doi.org/10.2166/wrd.2016.216>
- Acosta-Santoyo, G., Herrada, R. A., de Folter, S., & Bustos, E. (2018). Stimulation of the germination and growth of different plant species using an electric field treatment with IrO<sub>2</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>|Ti electrodes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93(5), 1488–1494. <https://doi.org/10.1002/jctb.5517>
- Afzal, I., Mukhtar, K., Qasim, M., Basra, S. M. A., Shahid, M., & Haq, Z. (2012). Magnetic stimulation of marigold seed. *International Agrophysics*, 26(4), 335–339. <https://doi.org/10.2478/v10247-012-0047-1>
- Anand, A., Kumari, A., Thakur, M., & Koul, A. (2019). Hydrogen peroxide signaling integrates with phytohormones during the germination of magnetoprimed tomato seeds. *Scientific Reports*, 9(1), 8814. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45102-5>
- Antiabong, J. F., Ngoepe, M. G., & Abechi, A. S. (2016). Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction electrophoresis gel: Potential applications in low-income veterinary laboratories. *Veterinary World*, 9(9), 935–939. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.935-939>
- Azita, S., Ahmad, M., & Masoud, S. (2011). Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on growth, cytogenetic, protein content and antioxidant system of *Zea mays* L. *African Journal of Biotechnology*, 10(46), 9362–9369. <https://doi.org/10.5897/AJB11.097>
- Bailey-Serres, J., & Voeselek, L. A. C. J. (2008). Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 313–339. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092752>

- Bradford, K. J., & Nonogaki, H. (2007). *Seed Development, Dormancy and Germination* (Vol. 1).
- Breljak, D. & A.-R. A. & K. S. & C. T. & G. Jelka. (2005). Comparison of Three RT-PCR Based Methods for Relative Quantification of mRNA. *Food Technology and Biotechnology*, 43, 379–388.
- Breljak, D., Ambriovi-Ristov, A., Kapitanovi, S.ba, & Gabrilovac, J. (2005). Comparison of Three RT-PCR Based Methods for Relative Quantification of mRNA. *Food Technol. Biotechnol*, 43(4), 379–388. <http://www.appliedbiosystems.com>
- Cai, Z., Riedel, H., Thaw Saw, N. M. M., Kütük, O., Mewis, I., Jäger, H., Knorr, D., & Smetanska, I. (2011). Effects of pulsed electric field on secondary metabolism of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Fréaux suspension culture and exudates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(4), 443–453. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9146-2>
- Cakmak, T., Dumlupinar, R., & Erdal, S. (2009). Acceleration of germination and early growth of wheat and bean seedlings grown under various magnetic field and osmotic conditions. *Bioelectromagnetics*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/bem.20537>
- Chaitanya, K. S. K., & Naithani, S. C. (1994). Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn.f. *New Phytologist*, 126(4), 623–627. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02957.x>
- Chen, S. (2018). China is making its vegetables grow bigger, faster and stronger ... using electricity. *South China Morning Post*.
- Dannehl, D. (2018). Effects of electricity on plant responses. *Scientia Horticulturae*, 234, 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.007>
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>

- Day, I. S., Reddy, V. S., Ali, S., & Reddy, A. (2002). *Analysis of EF-hand-containing proteins in Arabidopsis*. <http://genomebiology.com/2002/3/10/research/0056.1>
- de Souza, A., Sueiro, L., García, D., & Porras, E. (2010). Extremely low frequency non-uniform magnetic fields improve tomato seed germination and early seedling growth. *Seed Science and Technology*, 38(1), 61–72. <https://doi.org/10.15258/sst.2010.38.1.06>
- Demirbas, A. (2010). Oil, micronutrient and heavy metal contents of tomatoes. *Food Chemistry*, 118(3), 504–507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.007>
- del Río, L. A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2827–2837. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv099>
- Djami-Tchatchou, A. T., & Straker, C. J. (2012). The isolation of high quality RNA from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill.). *South African Journal of Botany*, 78. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.04.009>
- Drerup, M. M., Schlücking, K., Hashimoto, K., Manishankar, P., Steinhorst, L., Kuchitsu, K., & Kudla, J. (2013). The Calcineurin B-Like Calcium Sensors CBL1 and CBL9 Together with Their Interacting Protein Kinase CIPK26 Regulate the Arabidopsis NADPH Oxidase RBOHF. *Molecular Plant*, 6(2), 559–569. <https://doi.org/10.1093/mp/sst009>
- E. P. Heuvelink, Robert C.O. Okello, Mary Peet, James J. Giovannon, & Martine Dorais. (2020). Tomato. In C. H. Wien & H. Stützel (Eds.), *Physiology of Vegetable Crops* (2nd ed., Vol. 1, pp. 138–175). CAB International.
- Elahi, E., Weijun, C., Zhang, H., & Nazeer, M. (2019). Agricultural intensification and damages to human health in relation to agrochemicals: Application of artificial intelligence. *Land Use Policy*, 83, 461–474. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2019.02.023>
- El-Maarouf-Bouteau, H., Sajjad, Y., Bazin, J., Langlade, N., Cristescu, S. M., Balzergue, S., Baudouin, E., & Bailly, C. (2015). Reactive oxygen species, abscisic acid and

ethylene interact to regulate sunflower seed germination. *Plant, Cell & Environment*, 38(2), 364–374. <https://doi.org/10.1111/pce.12371>

Fahimdanesh, M. (2013). Evaluation of Physicochemical Properties of Iranian Tomato Seed Oil. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 03(03). <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000206>

Farnese, F. S., Menezes-Silva, P. E., Gusman, G. S., & Oliveira, J. A. (2016). When Bad Guys Become Good Ones: The Key Role of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in the Plant Responses to Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00471>

Fornaris Guillermo J. (2007). Conjunto Tecnológico Para La Producción De Tomate. Características De La Planta. Universidad De Puerto Rico. Pp:2-10

Garcia, D., Zhao, Y., Zhao, S., Ming, L. C., & Huang, D. (2021). Hydroelectrostatic hybrid priming stimulates germination performance via ABA and GA regulation: New promising evidence for tomato gene expression. *Current Plant Biology*, 27, 100215. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100215>

Gilroy, S., Białasek, M., Suzuki, N., Górecka, M., Devireddy, A. R., Karpiński, S., & Mittler, R. (2016). ROS, Calcium, and Electric Signals: Key Mediators of Rapid Systemic Signaling in Plants. *Plant Physiology*, 171(3), 1606–1615. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00434>

Goldsworthy, A. (2008). Effects of Electrical and Electromagnetic Fields on Plants and Related Topics. In *Plant Electrofisiology, Theory and Methods* (pp. 247–265).

Groot, S. P. C., Kieliszewska-Rokicka, B., Vermeer, E., & Karssen, C. M. (1988). Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta*, 174(4), 500–504. <https://doi.org/10.1007/BF00634479>

Gurovich, L. A. (2012). Electrophysiology of Woody Plants. In *Electrophysiology - From Plants to Heart*. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)

- Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical Reviews*, 116(5), 3029–3085. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407>
- Hilhorst, H. M., Groot, S. C., & Bino, R. (1998). The tomato seed as a model system to study seed development and germination. In *Acta Bot. Neerl* (Vol. 47, Issue 2).
- Hussain, M. S., Dastgeer, G., Afzal, A. M., Hussain, S., & Kanwar, R. R. (2020). Eco-friendly magnetic field treatment to enhance wheat yield and seed germination growth. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 14. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100299>
- Ishibashi, Y., Aoki, N., Kasa, S., Sakamoto, M., Kai, K., Tomokiyo, R., Watabe, G., Yuasa, T., & Iwaya-Inoue, M. (2017). The Interrelationship between Abscisic Acid and Reactive Oxygen Species Plays a Key Role in Barley Seed Dormancy and Germination. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00275>
- Jajic, I., Sarna, T., & Strzalka, K. (2015). Senescence, Stress, and Reactive Oxygen Species. *Plants*, 4(3), 393–411. <https://doi.org/10.3390/plants4030393>
- Ju, C., Song, Y., & Kong, D. (2020). *Arabidopsis* GLR3.5-modulated seed germination involves GA and ROS signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 15(3), 1729537. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1729537>
- Kistner, C., & Matamoros, M. (n.d.). RNA isolation using phase extraction and LiCl precipitation. In *Lotus japonicus Handbook* (pp. 123–124). Springer-Verlag. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3735-X\\_9](https://doi.org/10.1007/1-4020-3735-X_9)
- Kong, D., Ju, C., Parihar, A., Kim, S., Cho, D., & Kwak, J. M. (2015). *Arabidopsis* Glutamate Receptor Homolog3.5 Modulates Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Level to Counteract Effect of Abscisic Acid in Seed Germination. *Plant Physiology*, 167(4), 1630–1642. <https://doi.org/10.1104/pp.114.251298>

- Kudla, J., Batistič, O., & Hashimoto, K. (2010). Calcium Signals: The Lead Currency of Plant Information Processing. *The Plant Cell*, 22(3), 541–563. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072686>
- Lázaro, J. J., Jiménez, A., Camejo, D., Iglesias-Baena, I., Martí, M. del C., Lázaro-Payo, A., Barranco-Medina, S., & Sevilla, F. (2013). Dissecting the integrative antioxidant and redox systems in plant mitochondria. Effect of stress and S-nitrosylation. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00460>
- Li, Z. G., Gou, H. Q., & Li, R. Q. (2019). Electrical stimulation boosts seed germination, seedling growth, and thermotolerance improvement in maize (*Zea mays* L.). *Plant Signaling and Behavior*, 14(12). <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1681101>
- Li, Z., Gao, Y., Zhang, Y., Lin, C., Gong, D., Guan, Y., & Hu, J. (2018). Reactive Oxygen Species and Gibberellin Acid Mutual Induction to Regulate Tobacco Seed Germination. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01279>
- Liu, P.-P., Koizuka, N., Homrichhausen, T. M., Hewitt, J. R., Martin, R. C., & Nonogaki, H. (2005). Large-scale screening of Arabidopsis enhancer-trap lines for seed germination-associated genes. *The Plant Journal*, 41(6), 936–944. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02347.x>
- Mahmood, S., & Usman, M. (2014). Consequences of Magnetized Water Application on Maize Seed Emergence in Sand Culture. In *J. Agr. Sci. Tech* (Vol. 16).
- Martínez-Andújar, C., Pluskota, W. E., Bassel, G. W., Asahina, M., Pupel, P., Nguyen, T. T., Takeda-Kamiya, N., Toubiana, D., Bai, B., Górecki, R. J., Fait, A., Yamaguchi, S., & Nonogaki, H. (2012). Mechanisms of hormonal regulation of endosperm cap-specific gene expression in tomato seeds. *The Plant Journal*, 71(4), 575–586. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05010.x>
- Meemken, E.-M., & Qaim, M. (2018). Organic Agriculture, Food Security, and the Environment. *Annual Review of Resource Economics*, 10(1), 39–63. <https://doi.org/10.1146/annurev-resource-100517-023252>

- Mohanta, T., Yadav, D., Khan, A., Hashem, A., Abd\_Allah, E., & Al-Harrasi, A. (2019). Molecular Players of EF-hand Containing Calcium Signaling Event in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1476. <https://doi.org/10.3390/ijms20061476>
- Morales, C., Solís, S., Bacame, F. J., Reyes-Vidal, M. Y., Manríquez, J., & Bustos, E. (2021). Electrical stimulation of *Cucumis sativus* germination and growth using IrO<sub>2</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>|Ti anodes in Vertisol pelic. *Applied Soil Ecology*, 161, 103864. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103864>
- Mukherjee SP, Choudhuri MA. (1983). Implications of wáter stress-induced changes in the leaves of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiol Plant* 58:166–170
- Nakaune, M., Hanada, A., Yin, Y.-G., Matsukura, C., Yamaguchi, S., & Ezura, H. (2012). Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.11.005>
- Omoarelojie, L. O., Kulkarni, M. G., Finnie, J. F., & van Staden, J. (2022). Smoke-derived cues in the regulation of seed germination: are Ca<sup>2+</sup>-dependent signals involved? *Plant Growth Regulation*, 97(2), 343–355. <https://doi.org/10.1007/s10725-021-00745-1>
- Ozuna, C., Cerón-García, A., Elena Sosa-Morales, Ma., Salazar, J. A. G., Fabiola León-Galván, Ma., & del Rosario Abraham-Juárez, Ma. (2018). Electrically induced changes in amaranth seed enzymatic activity and their effect on bioactive compounds content after germination. *Journal of Food Science and Technology*, 55(2), 648–657. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2974-0>
- Pimentel, O., Acosta, G., Acuña, J., & Bustos, E. (2019). Germinacion y crecimiento de *Cucumis sativus* aplicando un campo eléctrico empleando superficies modificadas co óxidos de metales de transición. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 10(1), 41–55. [http://www.exeedu.com/publishing.cl/av\\_cienc\\_ing/41](http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/41)

- Radhakrishnan, R., & Ranjitha Kumari, B. D. (2012). Pulsed magnetic field: A contemporary approach offers to enhance plant growth and yield of soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 51, 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.10.017>
- Rahman, S. U., Hammad, M., Tahir, N., Ali, Z., Nawaz, F., & Jameel, S. (2020). Effect of osmopriming and hydropriming on seedling traits of soybean. *Agricultural Sciences Journal*, 2(1), 67–73. <http://asj.mnsuam.net/index.php>
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., & Job, D. (2012). Seed Germination and Vigor. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 507–533. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>
- Ramana, S., Biswas, A. K., Kundu, S., Saha, J. K., & Yadava, R. B. R. (2002). Effect of distillery effluent on seed germination in some vegetable crops. *Bioresource Technology*, 82, 273–275.
- Reina, F. G., & Pascual, L. A. (2001). Influence of a stationary magnetic field on water relations in lettuce seeds. Part I: Theoretical considerations. *Bioelectromagnetics*, 22(8), 589–595. <https://doi.org/10.1002/bem.88>
- Rezende, É. M. de, Oliveira, J. A., Carvalho, E. R., Clemente, A. da C. S., & Oliveira, G. E. (2017). Physiological quality of tomato seeds treated with polymers in combination with paclobutrazol. *Journal of Seed Science*, 39(4), 338–343. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v39n4164432>
- Rick, C. M. (1978). The Tomato. *Scientific American*, 239(2), 76–89. <http://www.jstor.org/stable/24960356>
- Sant’Ana, D. V. P., & Lefsrud, M. (2018). Tomato proteomics: Tomato as a model for crop proteomics. *Scientia Horticulturae*, 239, 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.041>

- Sañudo-Torres, R. R. (2013). EL CULTIVO DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Y EL POTENCIAL ENDOFÍTICO DE DIFERENTES AISLADOS DE *Beauveria bassiana*. Universidad Autónoma Indígena de Mexico.
- Shi, S., Li, S., Asim, M., Mao, J., Xu, D., Ullah, Z., Liu, G., Wang, Q., & Liu, H. (2018). The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinases (CDPKs) and Their Roles in Plant Growth Regulation and Abiotic Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1900. <https://doi.org/10.3390/ijms19071900>
- SIAP. (2021). *Escenario mensual de productos agroalimentarios*. <https://www.gob.mx/siap/documentos/escenarios-de-productos-agroalimentarios-266425>
- Singh, J. S., Pandey, V. C., & Singh, D. P. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 140(3–4), 339–353. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.01.017>
- Sogi, D. (2005). Biological evaluation of tomato waste seed meals and protein concentrate. *Food Chemistry*, 89(1), 53–56. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.083>
- Sumberg, J. E. (2017). *Agronomy for development: the politics of knowledge in agricultural research*. Taylor & Francis
- Tripathi, S., Srivastava, P., Devi, R. S., & Bhadouria, R. (2020). Influence of synthetic fertilizers and pesticides on soil health and soil microbiology. In *Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation* (pp. 25–54). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103017-2.00002-7>
- Ulian, T., Diazgranados, M., Pironon, S., Padulosi, S., Liu, U., Davies, L., Howes, M. R., Borrell, J. S., Ondo, I., Pérez-Escobar, O. A., Sharrock, S., Ryan, P., Hunter, D., Lee, M. A., Barstow, C., Łuczaj, Ł., Pieroni, A., Cámara-Leret, R., Noorani, A., ... Mattana, E. (2020). Unlocking plant resources to support food security and promote

sustainable agriculture. *PLANTS, PEOPLE, PLANET*, 2(5), 421–445.  
<https://doi.org/10.1002/ppp3.10145>

Vashisth, A., & Nagarajan, S. (2010). Characterization of water distribution and activities of enzymes during germination in magnetically-exposed maize (*Zea mays* L) seeds. In *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* (Vol. 47).

Venkateswar, K., Raisa, S., Jareena, S., & Nagaraju, M. (2012). Exposure of Greengram Seeds (*Vigna radiante* var. *Radiata*) to Static Magnetic Fields: Effects on germination and alfa-amylase Activity. *Research Journal of Seed Science*, 5(3), 106–114.

Verma, G., Khan, S., Agarwal, S. K., & Sharma, S. (2019). Role of apoplastic calcium during germination and initial stages of seedling establishment in *Vigna radiata* seeds. *Journal of Plant Physiology*, 236, 66–73.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.02.009>

Viehweger, K. (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55(1), 35.  
<https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-35>

Wang, G., Huang, J., Gao, W., Lu, J., Li, J., Liao, R., & Jaleel, C. A. (2009). The effect of high-voltage electrostatic field (HVEF) on aged rice (*Oryza sativa* L.) seeds vigor and lipid peroxidation of seedlings. *Journal of Electrostatics*, 67(5), 759–764.  
<https://doi.org/10.1016/j.elstat.2009.05.004>

Ward, R. G. (1996). The influence of electric currents on the growth of tomato plants. *Acta Physiol. Plant.*, 18, 121–127.

Weitbrecht, K., Müller, K., & Leubner-Metzger, G. (2011). First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3289–3309.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/err030>