



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

---

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

**ANÁLISIS *in situ* y PERFILES DE  
EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN TRES  
ESTADOS DE DESARROLLO DE HOJAS DE  
*Gmelina arborea ROXB.***

**DIEGO VÁZQUEZ AGUILAR**

**T E S I S**  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO**

**2019**

---

## CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe, **DIEGO VÁZQUEZ AGUILAR**, Alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. SERGIO S. GONZÁLEZ MUÑOZ** por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "**Análisis *in situ* y perfiles de expresión diferencial en tres estados de desarrollo de hojas de *Gmelina arborea Roxb***", y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo Mpio. Texcoco, Estado de México, febrero de 2019



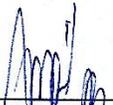
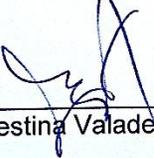
Diego Vázquez Aguilar



Vo. Bo. PhD Sergio S. González Muñoz  
IREGEP-GANADERÍA

La presente tesis titulada: “**Análisis *in situ* y perfiles de expresión diferencial en tres estados de desarrollo de hojas de *Gmelina arborea* Roxb.**” realizada por el alumno: **Diego Vázquez Aguilar** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**  
**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**  
**GANADERÍA**  
**CONSEJO PARTICULAR**

|           |  |
|-----------|--|
| CONSEJERO | <br>_____   |
|           | PhD. Sergio S. González Muñoz  |
| ASESOR    | <br>_____  |
|           | Dr. David Hernández Sánchez  |
| ASESOR    | <br>_____ |
|           | Dra. Ernestina Valadez Moctezuma   |

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2019

## **Análisis *in situ* y perfiles de expresión diferencial en tres estados de desarrollo de hojas de *Gmelina arborea* Roxb.**

Diego Vázquez Aguilar, M. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2019

### **RESUMEN**

El objetivo de esta investigación fue evaluar la composición química, degradación *in situ*, y perfiles de expresión diferencial en hojas de *Gmelina arborea* en tres estados de desarrollo: hojas jóvenes, hojas de mediano crecimiento y hojas a punto de llegar a la senescencia. **Experimento 1.** Composición química. La composición química de las hojas de cada tratamiento se determinó y las variables fueron materia orgánica (MO), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), extracto etéreo (EE), lignina, proteína, celulosa, hemicelulosa y cenizas. El diseño fue completamente al azar y las variables se analizaron mediante el procedimiento GLM ( $P < 0.05$ ). La etapa de desarrollo afectó significativamente el contenido de proteína, FDN, FDA, lignina y cenizas ( $P < 0.001$ ). **Experimento 2.** Las variables fueron degradación *in situ* de la materia seca (MS), la fibra detergente neutro (FDN) y la fibra detergente ácido (FDA). El diseño experimental fue un Cuadro Latino 3 x 3 y las medias de tratamientos se compararon con medidas repetidas. No hubo diferencias ( $P > 0.05$ ) en la degradación de MS entre los tratamientos. **Experimento 3.** En muestras de hojas de *G. arborea* se realizó una amplificación de marcadores moleculares (RAPDs). El número de bandas producidas por cada iniciador fue de 10 a 35 dependiendo de la etapa de desarrollo de las hojas evaluadas. El tamaño de los fragmentos amplificados fue de 120 a 2,500 pb donde se muestran los perfiles de expresión diferencial en las tres etapas de desarrollo de hojas de *G. arborea*.

**Palabras clave:** *Gmelina arborea*, análisis *in situ*, expresión diferencial.

## ***In situ* analysis and differential expression profiles in three development stages of leaves of *Gmelina arborea* Roxb.**

Diego Vázquez Aguilar, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

### **ABSTRACT**

The objective of this research was to evaluate the chemical composition, *in situ* degradation, and differential expression profile in *Gmelina arborea* leaves in three development stages: young leaves, medium growth leaves and leaves very close to senescence. **Experiment 1.** Chemical composition. The chemical composition of leaves from each treatment were determined and variables were organic matter (OM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), ether extract (EE), lignin, protein, cellulose, hemicellulose and ashes. The experimental design was complete randomized, and variables were analyzed using GLM procedure. Development stage significantly affected content of protein, NDF, ADF, lignin and ashes ( $P < 0.001$ ). **Experiment 2.** The variables were *in situ* degradation of dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF). The experimental design was a 3 x 3 Latin Square and treatments means were compared with repeated measurements. There were no differences ( $P > 0.05$ ) among treatments. **Experiment 3.** In samples of *G. arborea* leaves an amplification of molecular markers (RAPDs) was carried out. The number of bands produced for each primer was 10 to 35, according to the development stage of the evaluated leaves. The size of the amplified fragments was 120 to 2,500 pb, where the profiles of differential expression of *G. arborea* leaves, in three development stages, are shown.

**Key words:** *Gmelina arborea*, *in situ* analysis, differential expression.

## DEDICATORIA

Este pequeño trabajo de investigación está dedicado principalmente a Dios y a la vida.

Con mucho cariño a todas esas personas que estimo y me estiman.

A mi Hijo Ian Yamir por ser mi motivación día con día.

A mi hermana Carmen Elizabeth† que desde la inmensidad siempre me has acompañado.

A mi hermano Luis Alberto por tus enseñanzas de vida y fortaleza que me trasmites.

A mi Madre, Carmen por ser esa persona que siempre me ha brindado su apoyo y amor incondicional.

A mi padre, Mario, por sus consejos, por ser mi motor e inspiración, por animarme a seguir adelante y no conformarme, por enseñarme el valor de la vida y disfrutarla a pesar de cualquier circunstancia.

A mis amigos y compañeros, Yola, Hugo, Jazmín, Juan, Fidel, Beatriz, Francisco, por los buenos momentos.

A Jorge Pérez Cárcamo, por brindarme tu amistad incondicional, apoyo y ánimos durante estos dos años.

A Yennifer, por enseñarme a siempre sonreír y transmitir esa alegría en cada momento compartido.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento que hizo posible realizar mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados (COLPOS), Campus Montecillo, por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de Posgrado.

Al Dr. Sergio S. González Muñoz por su valioso apoyo y dirección en este trabajo de investigación.

Al Dr. David Hernández Sánchez por las sugerencias y ayuda brindada en la investigación.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por las facilidades brindadas en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia, de la Universidad Autónoma Chapingo, y por siempre buscar la manera para la realización de este trabajo.

A la Dra. María Magdalena Crosby Galván y a la Ingeniero Margarita Crosby Galván por su apoyo en la realización de los análisis en el laboratorio de Nutrición Animal.

Al Dr. Braulio Badillo Ortiz y su familia por las facilidades y apoyo para los muestreos realizados.

A la Dra. Yuridia Bautista por las sugerencias en los análisis estadísticos.

Al M.C. Aldo G. Bustamante por su ayuda y consejos en el área de biología molecular.

## CONTENIDO

|  |     |
|--|-----|
| RESUMEN.....   | iv  |
| ABSTRACT.....  | v   |
| DEDICATORIA.....   | vi  |
| AGRADECIMIENTOS.....   | vii |
| LISTA DE FIGURAS.....  | x   |
| LISTA DE CUADROS.....  | xi  |
| INTRODUCCIÓN.....  | 1   |
| OBJETIVOS.....   | 2   |
| General.....   | 2   |
| Específicos.....   | 2   |
| HIPÓTESIS.....   | 2   |
| REVISIÓN DE LITERATURA.....  | 3   |
| Taxonomía.....   | 3   |
| Origen y distribución.....   | 3   |
| Condiciones de crecimiento.....  | 3   |
| Usos.....  | 4   |
| Uso de la <i>Gmelina arborea</i> para la alimentación de especies pecuarias..... | 4   |
| Degradación <i>in situ</i> .....   | 4   |
| Fracciones de la fibra.....  | 5   |
| Lignina.....   | 5   |
| Identificación de genes asociados a biosíntesis de lignina.....                  | 5   |
| PCR.....   | 6   |
| RT-PCR.....  | 7   |
| RAPDs.....   | 8   |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 8   |
| Localización del lugar de recolección de muestras.....                           | 8   |
| Muestreo de hojas de <i>Gmelina arborea</i> Roxb. ....                           | 9   |
| Composición química.....   | 10  |
| Determinación de la materia seca (MS).....                                       | 10  |
| Determinación de las cenizas.....  | 10  |

|  |    |
|--|----|
| <b>Determinación de la proteína.</b> .....                                       | 10 |
| <b>Diseño experimental</b> .....   | 11 |
| <b>Degradación <i>in situ</i> de la materia seca (DISMS)</b> .....               | 12 |
| <b>Extracción de RNA en hojas de <i>Gmelina arborea</i> Roxb.</b> .....          | 13 |
| <b>Material vegetal.</b> .....   | 13 |
| <b>Síntesis de cDNA.</b> .....   | 14 |
| <b>Cuantificación de RNA y cDNA.</b> .....                                       | 14 |
| <b>Amplificación de fragmentos de DNA con PCR en electroforesis.</b> .....       | 14 |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | 18 |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....   | 25 |
| <b>Composición química.</b> .....  | 25 |
| <b>Degradación <i>in situ</i> de hojas de <i>Gmelina arborea</i> Roxb.</b> ..... | 26 |
| <b>Perfiles de expresión diferencial</b> .....                                   | 27 |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....  | 28 |
| <b>LITERATURA CITADA.</b> .....  | 29 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1. Degradación <i>in situ</i> de la materia seca de hojas de <i>Gmelina arborea</i> Roxb. en tres estados de desarrollo cen 8 horarios de incubación..</b> | <b>19</b> |
| <b>Figura 2. Degradación <i>in situ</i> de FDN de hojas de <i>Gmelina arborea</i> Roxb. en tres estados de desarrollo en 8 horarios de incubación. ....</b>          | <b>20</b> |
| <b>Figura 3. Degradación <i>in situ</i> de FDA de hojas de <i>Gmelina arborea</i> Roxb. en tres estados de desarrollo en 8 horarios de incubación. ....</b>          | <b>21</b> |
| <b>Figura 4. Perfiles de expresión diferencial obtenidos con 14 iniciadores aleatorios en tres estados de desarrollo de <i>Gmelina arborea</i> Roxb.).....</b>       | <b>23</b> |

## LISTA DE CUADROS

|  |    |
|--|----|
| Cuadro 1. Condiciones de mezcla de PCR para la amplificación de fragmentos en hojas de <i>Gmelina arborea</i> Roxb. en tres estados de desarrollo... | 16 |
| Cuadro 2. Reactivos para la preparación de geles de acrilamida 8 %. .....  | 17 |
| Cuadro 3. Oligonucleótidos aleatorios (RAPD's) seleccionados. ....   | 17 |
| Cuadro 4. Degradación <i>in situ</i> de la materia seca (DISMS) de hojas de <i>Gmelina arborea</i> Roxb. en tres etapas de desarrollo .....          | 18 |
| Cuadro 5. Composición química de hojas de <i>Gmelina arborea</i> Roxb. en tres etapas de desarrollo. ....  | 18 |
| Cuadro 6. Concentración y absorbancia de RNA en hojas de <i>Gmelina arborea</i> Roxb. en tres estados de desarrollo.....                             | 22 |

## INTRODUCCIÓN

El follaje de árboles y arbustos es importante en la producción ganadera debido a que contiene cantidades adecuadas de proteína (Sosa *et al.*, 2000; Carranza-Montaña *et al.*, 2003; López *et al.*, 2008), producen materia seca a lo largo del año y dependiendo de la especie llegan a producir 15 a 27 t ha<sup>1</sup> de materia seca por año. En países tropicales del continente americano el uso de especies arbóreas se realiza como componentes de sistemas agrosilvopastoriles o como forraje de corte. Al respecto, se ha documentado una gran diversidad de arbustos y árboles forrajeros en varios países; sin embargo, en muy pocas especies se han determinado sus características agronómicas y su impacto en la nutrición de especies pecuarias.

La *Gmelina arborea* Roxb. es una especie vegetal introducida en regiones tropicales de México, es de fácil manejo, resistente a plagas, tiene un bajo costo de establecimiento, rápido crecimiento y alta producción de biomasa (Madrigal *et al.*, 2018). El uso principal de esta especie está enfocado en el sector forestal para la obtención y aprovechamiento de madera y celulosa. Sin embargo, se ha evaluado la composición química en follaje de *G. arborea* y se considera como fuente de alimentación para ovinos y caprinos (Sosa *et al.*, 2004). El conocimiento generado sobre el aprovechamiento, potencial y el uso de hojas de *G. arborea* como alternativa en la nutrición de rumiantes en México es reducido y, además, no se consideran las etapas de desarrollo del follaje. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue analizar los cambios en la composición química, degradación *in situ* y observar los cambios de expresión de los genes mediante perfiles de DNA en hojas de *G. arborea* en tres estados de desarrollo.

## OBJETIVOS

### General

Analizar los cambios en la composición química, caracterización y degradación de fracciones de la pared celular y perfiles de expresión diferencial en hojas de *Gmelina arborea* Roxb. en tres estados de desarrollo.

### Específicos

Evaluar la degradación de la materia seca de *Gmelina arborea* Roxb.

Analizar la composición química de hojas de *Gmelina arborea* Roxb. en tres estados de desarrollo.

Determinar la presencia de taninos y compuestos fenólicos en hojas de *Gmelina arborea* Roxb. en tres estados de desarrollo.

Determinar de las diferencias de expresión genética en tres estados de desarrollo de hojas de *Gmelina arborea* Roxb.

## HIPÓTESIS

La etapa de desarrollo de las hojas de *Gmelina arborea* Roxb. induce cambios en la degradación de la materia seca, en la composición química y en los perfiles de expresión diferencial.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### **Taxonomía**

Reino: Vegetal

División: *Angiospermophyta*

Clase: *Manoliopsidae*

Orden: Labiales

Familia: *Verbenaceae*

Género: *Gmelina* L.

Especie: *Gmelina arborea* Roxb.

### **Origen y distribución**

*Gmelina arborea* Roxb. es originaria de los bosques caducifolios húmedos del sureste de Asia y se distribuye en Paquistán, India, Bangladesh, Nepal, Birmania, Malasia, Sri Lanka, China, Filipinas, Gambia, Burkina Faso, Costa de Marfil, Nigeria y Malawi. En América se encuentra distribuida en Cuba, Colombia, Brasil, Venezuela, Costa Rica y México. En nuestro país se cultiva en las regiones tropicales de los estados de Guerrero, Campeche, Tabasco, Veracruz, Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Nayarit, Colima y Yucatán, en los cuales el principal objetivo es la obtención de madera y celulosa (Cruz y Garza, 2003; Muñoz *et al.*, 2009).

### **Condiciones de crecimiento**

Esta especie crece en regiones húmedas y tolera hasta siete meses de la estación seca del trópico, en una temperatura media anual de 21 a 28 °C, mínima de 14 a 24 °C, máxima de 24 a 35 °C, una precipitación promedio anual de 762 a 15,000 mm y una altitud de 0 a 1,300 m (Muñoz *et al.*, 2009).

## **Usos**

*Gmelina arborea* Roxb. es una alternativa para el abastecimiento de materia prima en la industria forestal en el trópico y el subtrópico porque su manejo es fácil, el costo de establecimiento es bajo, su crecimiento es rápido en sus primeros estadios y la producción de biomasa en ciclos cortos es alta (Barrantes *et al.*, 2018).

### **Uso de la *Gmelina arborea* para la alimentación de especies pecuarias**

En los estudios sobre el aprovechamiento del follaje de *G. arborea* se muestra su utilización como fuente de alimentación en los sistemas de producción agropecuaria, principalmente para rumiantes, además de conejos y cerdos (Lowry, 1995; Kennedy y Lowry, 2002; Datta and Singh 2008; Datt *et al.*, 2008; Moemeka *et al.*, 2014). En los estudios mencionados las hojas se ofrecen recién cortadas y en sistemas silvopastoriles los rumiantes se alimentan de las hojas caídas de este árbol (Omokanye *et al.*, 2001). Además, Sosa *et al.* (2004) concluyen que el follaje de *G. arborea* se puede considerar como una fuente de alimentación para ovinos y caprinos.

### **Degradación *in situ***

La técnica *in situ*, también llamada de la bolsa de nylon (Ørskov *et al.*, 1980), permite estudiar la cinética de desaparición de muestras de alimento en rumiantes. Las muestras se colocan dentro de bolsas de nylon cerradas las cuales se introducen en la parte ventral del rumen, y el retiro de bolsas a lo largo del tiempo permite medir la cantidad de material que ha desaparecido. La fracción del alimento no recuperada dentro de las bolsas se considera como degradado. Esta metodología permite el estudio de la cinética de degradación y tiene un buen grado de asociación con el consumo y la digestibilidad para alimentos como forrajes frescos y henos (Orskov, 2000).

## **Fracciones de la fibra**

La fibra detergente neutro (FDN) es el material insoluble en una solución detergente neutra, y se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina. La fibra detergente ácido (FDA) es el material insoluble en una solución detergente ácida, está constituida por celulosa y lignina por lo cual representa la fracción de la fibra más indigestible o no digestible. La diferencia entre FDN y FDA corresponde al contenido de hemicelulosa.

## **Lignina**

La lignina es un componente importante de la pared celular de plantas vasculares y dentro de las características negativas que la resaltan es su impacto sobre la calidad de los forrajes. Los efectos negativos de la lignina sobre la degradación de la pared celular dependen de su contenido, composición de monómeros, grupos funcionales y del grado de entrecruzamiento con los polisacáridos de la pared celular. Una de las estrategias más exploradas para mejorar la digestibilidad de la lignina es la regulación negativa de las enzimas involucradas en la biosíntesis de los monolignoles.

## **Identificación de genes asociados a biosíntesis de lignina**

Las investigaciones realizadas con relación en la biosíntesis de lignina tienen como objetivo principal la manipulación de la expresión de lignina a través de técnicas de ingeniería genética para mejorar el valor nutritivo de los forrajes y así repercutir de manera directa sobre un incremento de la degradación de materia seca, la cual declina a medida que aumenta la edad de los forrajes.

Algunos blancos para alterar el contenido y composición de las ligninas son COMT, CcoAOMT Y CAD, los cuales codifican para las enzimas O-metil transferasa del ácido cafeico (COMT), cafeoil coA-3-O-metiltransferasa (CcoAOMT) y cinamil alcohol

deshidrogenasa. Investigaciones realizadas utilizando plantas modelo como tabaco y álamo demostraron que la regulación negativa de la expresión de COMT, CAD y 4CL conducen a una alteración en la composición de la lignina o a una disminución de su contenido con incrementos significativos en la degradación de la materia seca. De acuerdo con Poovaiah *et al.* (2014), varios genes han sido regulados negativamente en cultivos comerciales para entender su efecto sobre la biosíntesis de lignina y la sacarificación, dentro de los cuales se resaltan los siguientes: 4CL, C4H, HCT, C3H, CCo-AOMT, CCR, F5H, COMT, CAD Y MYB4 en distintas especies de plantas. Giordano *et al.* (2014) concluyeron que la regulación negativa del gen cinamoil CoA reductasa (CCR) es una estrategia efectiva para la producción de forrajes C4 con baja concentración de lignina para así mejorar la digestibilidad de estos. En otro estudio realizado por Tu *et al.* (2010) se demostró que la interferencia de la expresión de los genes CCR1 y COMT1 alteró significativamente el contenido de lignina y la composición en pasto ballico y mejoró la digestibilidad, sin efectos negativos significativos sobre la aptitud de la planta y la producción de biomasa. Finalmente, en otra investigación efectuada por Stabile *et al.* (2011) se midió la expresión de los genes de la síntesis de lignina en pasto guinea, y los autores concluyeron que la madurez afectó la expresión diferencial de dos de seis genes que se propusieron en el experimento: cinnamato 4-hidroxilasa y cafeoil-CoA O-metiltransferasa (C4H y CCoAOMT); y los otros genes para dicho estudio fueron 4CL, CAD, PAL y GAPDH.

## **PCR**

La PCR (Reacción en Cadena Polimerasa) es un método aplicado en biología molecular. Consiste en fabricar múltiples copias de una secuencia diana de DNA mediante un

proceso de amplificación de una molécula inicial. Cualquier segmento de DNA o RNA (previamente convertido a cDNA) puede ser amplificado, siempre que se conozcan las secuencias flanqueantes con las que podrán hibridar oligonucleótidos complementarios que actúan como cebadores para que la polimerasa pueda copiar las hebras molde. Para que la reacción se lleve a cabo se necesita: DNA molde que se desea amplificar, Taq DNA polimerasa, cebadores de secuencia específica, nucleótidos para la síntesis del nuevo DNA y amortiguador de reacción que incluye las distintas sales requeridas por la enzima. El protocolo básico de PCR consiste en los siguientes pasos:

- 1.- Desnaturalización del DNA que será utilizado como molde.
- 2.- Alineamiento de cebadores sintéticos, donde su secuencia permite hibridar uno a cada lado de la secuencia diana.
- 3.- Extensión por parte de la TAQ DNA polimerasa de los oligonucleótidos alineados que actúan como cebadores.

Estos pasos se repiten durante 25 a 35 ciclos duplicando cada vez el número de moléculas del producto. La amplificación resulta en numerosas copias de la secuencia flanqueada (Méndez y Pérez, 2004).

### **RT-PCR**

La PCR de transcripción inversa (RT-PCR) utiliza cDNA proveniente del mRNA en lugar de DNA como plantilla inicial. En primer lugar, la enzima transcriptasa inversa usa la plantilla de mRNA para producir una cadena de DNA monocatenaria complementaria denominada cDNA en un proceso conocido como transcripción inversa. A continuación, se utiliza la DNA polimerasa para convertir el cDNA monocatenario en DNA bicatenario. Estas moléculas de cDNA ahora se pueden usar como plantillas para una

reacción de PCR (Carter y Shieh, 2015). El proceso de conversión de mRNA en cDNA se conoce como retrotranscripción y se lleva a cabo para estudiar secuencias de RNA, cuantificar la expresión de RNA mensajero en diferentes tejidos (espacio), etapas fenológicas (tiempo) o para comparar los niveles de expresión en tejido sano vs alterado (Bustin, 2000; Oriola, 2013).

## **RAPDs**

Dentro de la metodología para amplificar fragmentos mediante PCR se encuentran los marcadores RAPDs (Random Amplified Polimorphism DNA). Estos generan productos de amplificación por reconocimiento de sitios específicos homólogos en el DNA molde, que se distribuyen aleatoriamente en el genoma. Los RAPDs se utilizan para estudios de diversidad genética y fueron los primeros marcadores usados en especies forrajeras.

Entre las principales tecnologías para estudiar la expresión genética se encuentran el Despliegue Diferencial (DD-PCR), Análisis en Serie de la Expresión Genética (SAGE) y los Microarreglos de DNA. El Despliegue Diferencial no requiere el conocimiento previo de las secuencias, se basa en técnicas de biología molecular sencillas, económicas y de frecuente uso (RT-PCR y PAGE; Velculescu *et al.*, 1995), los resultados son reproducibles y es aplicable a un gran número de sistemas biológicos (Bauer *et al.*, 1994).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Localización del lugar de recolección de muestras**

El lugar de recolección se localiza en el municipio de Gutiérrez Zamora, Veracruz; ubicado a 20° 22' y 20° 32' N, y 97° 01' y 97' O, altitud entre 10 y 200 msnm, y colinda con los municipios de Papantla y Tecolutla. El clima es cálido húmedo con abundantes

lluvias en verano. La temperatura promedio es 26 °C con una precipitación promedio de 1600 mm (INEGI, 2016).

### **Muestreo de hojas de *Gmelina arborea* Roxb.**

Para cada uno de los tratamientos, en este caso tres etapas de desarrollo de *G. arborea*, se obtuvieron muestras de hojas de árboles elegidos al azar, considerando aspectos físicos de las hojas, destacando la coloración y que no mostraran daños foliares.

Para la primera etapa de desarrollo se recolectaron brotes con una edad aproximada de 10 a 30 días de crecimiento, en la segunda etapa de desarrollo hojas con un crecimiento avanzado de entre 40 y 60 días y finalmente para la tercera etapa de desarrollo se recolectaron hojas con una coloración amarillenta, lo cual nos indica que las hojas estaban llegando a un punto de senescencia foliar. Cada una de las muestras simples se integró para formar una muestra compuesta de cada uno de los tratamientos del experimento. Una vez recolectadas las muestras se almacenaron en cajas de plástico y toallas de papel humectadas con agua para evitar la deshidratación de las mismas y su descomposición, para ser trasladadas al laboratorio de nutrición animal. El material recolectado fue acondicionado en bolsas de papel con la identificación respectiva y fueron colocadas en una estufa de aire forzado durante 72 h a una T ° de 55 ° C hasta obtener un peso constante. La materia seca fue molida utilizando un molino tipo Thomas Willey con una criba de 1 mm para análisis de composición química y criba de 2 mm para el experimento de digestibilidad *in situ*. Finalmente, se almacenaron en bolsas selladas para su análisis posterior.

## **Composición química**

En cada una de las muestras se realizaron las siguientes pruebas de laboratorio: materia seca y cenizas (AOAC, 2000), proteína (Kjeldahl, 1992), fibra detergente neutro y fibra detergente ácido (Van Soest *et al.*, 1991)

### **Determinación de la materia seca (MS)**

Para el análisis de la MS se pesó 1 g de muestra y se colocó en una estufa de aire forzado a 55 °C durante 24 h, y se registró el peso final (AOAC, 2000).

### **Determinación de las cenizas**

La determinación de las cenizas se realizó por calcinación de las muestras a 600 °C en una mufla durante 24 h, después se colocaron en un desecador y luego se registró el peso en una balanza analítica (AOAC, 2000).

### **Determinación de la proteína.**

Para esta determinación se pesó 0.3 g de muestra, se colocaron en tubos de ensaye, se agregó 0.5 de mezcla catalizadora y 3 mL de ácido sulfúrico concentrado y se efectuó una digestión de las muestras a 600 °C. Al terminar el proceso de digestión, las muestras se destilaron y se titularon con una solución de ácido clorhídrico (Kjeldahl, 1992).

### **Determinación de la fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA)**

Las fracciones de fibra se determinaron de acuerdo con el método descrito por Ankom Technology, con base en el método de Van Soest *et al.* (1991). Para ello se utilizó un Analizador de Fibra Ankom 2000©, diseñado para determinar FDN y FDA, se usaron bolsas Ankom F 57 Ankom de 5 X 5 cm, y de 5 µm de tamaño de poro, las cuales se colocaron en una estufa de aire forzado a 55 °C durante 24 h hasta obtener un peso

constante. Luego las muestras se depositaron en un desecador y una vez frías se pesaron en una balanza analítica y se identificaron con un marcador industrial. De cada tratamiento de hojas de *G. arborea* se pesaron 0.5 g muestra, se depositaron en cada una de las bolsas y se sellaron con calor a 4 mm de su extremo abierto. Esas bolsas se colocaron en cada una de las charolas, se agregó la solución detergente neutro y en la parte superior se colocó el contrapeso del equipo y se cerró. Después de verificar que no hubiera fugas, se encendió el equipo a una temperatura de 100° C durante 1 h, luego se abrió la perilla para eliminar la solución, se abrió el equipo y se agregó agua destilada caliente; este proceso se repitió tres veces durante 15 min. Finalizados los lavados con agua destilada, las bolsas se retiraron del equipo y se eliminó el exceso de agua. Las bolsas se colocaron en un vaso de precipitados con acetona durante 3 min, se sacaron del vaso y se colocaron en una campana de extracción hasta obtener un secado completo. Las bolsas se colocaron en una estufa de aire forzado a una temperatura de 55 °C durante 24 h, se retiraron y se pusieron en un desecador para registrar el peso de cada una.

### **Diseño experimental**

El diseño experimental para evaluar las variables de composición química fue completamente al azar, con cinco repeticiones por tratamiento.

El modelo estadístico para el análisis de las variables respuesta es:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

donde:

$Y_{ij}$  = variable respuesta en tratamiento  $i$ , repetición  $j$

$\mu$  = Media general

$t_i$  = Efecto tratamiento (hojas jóvenes, hojas de mediano crecimiento y hojas viejas)

$\epsilon_{ij}$  = Error experimental.

Para el análisis estadístico se utilizó el procedimiento GLM en el análisis de varianza de SAS versión 9.3, 2010 (Statistical Analysis System, Institute Inc., Cary, NC).

### **Degradación *in situ* de la materia seca (DISMS)**

La degradación *in situ* de la MS se evaluó usando la metodología de Orskov (1979) y se utilizaron tres toros Holstein con un peso vivo promedio de 700 kg y con cánula permanente en rumen, los cuales fueron adaptados a una dieta con mayor porcentaje de fibra durante 8 días, previos al experimento. Los horarios de incubación fueron 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 y 72 h con 3 repeticiones por tratamiento, para un total de 72 muestras; además se utilizaron 3 bolsas blancas como factor de corrección en el estudio. Para esta determinación se usaron bolsas de poliseda (10 x 20 cm) identificadas y se colocaron en una estufa de aire forzado durante 24 h hasta obtener un peso constante. Luego se colocaron en un desecador, se enfriaron, y el peso se registró para los cálculos posteriores. En una balanza analítica se pesaron 5 g de muestra y se colocaron en las bolsas atadas con hilo para evitar pérdidas de las muestras. Después las bolsas se fijaron en cadenas galvanizadas (de unos 30 cm), se introdujeron en la parte ventral del rumen de los toros Holstein, de forma inversa a los horarios para retirar todas las muestras en un mismo horario. Al término de la incubación las bolsas se retiraron del rumen, se lavaron sumergiéndolas con agua corriente hasta que la coloración fuera totalmente clara, las bolsas se dejaron escurrir durante 24 h y se colocaron en una estufa de aire forzado para determinar la desaparición de la MS.

La degradación *in situ* de la MS se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Degradación } in \text{ situ } (\%) = \frac{(\text{Peso inicial} - \text{Peso final})}{\text{Peso inicial}} * 100$$

### **Extracción de RNA en hojas de *Gmelina arborea* Roxb.**

#### **Material vegetal.**

El material vegetal para el análisis de expresión diferencial fueron hojas de *G. arborea* en tres estados de desarrollo: hojas jóvenes, de mediano crecimiento y a punto de llegar a la senescencia. Las hojas se lavaron con agua estéril eliminando algunos contaminantes que pudieran afectar la calidad de RNA a extraer, se colocó 0.1 g de hoja de *G. arborea* de cada tratamiento en un mortero esterilizado y congelado, y se trituró con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se transfirió a un microtubo Eppendorf de 1.5 mL donde se agregó 1 mL de TRIzol®, éste se mezcló con vórtex y se incubó 5 min a temperatura ambiente (20 °C). La mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C, el líquido sobrenadante se transfirió a otro microtubo y se incubó 5 min a temperatura ambiente (20 °C). En ese microtubo con el sobrenadante se agregaron 200 µL de cloroformo, se agitó por inversión 15 s y se incubó 3 min a 20 °C. El microtubo se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C, se transfirió la fase acuosa superior que contiene el RNA a otro microtubo, se agregaron 500 µL de isopropanol frío, se mezcló tres veces por inversión y se incubó 10 min a 20 °C. Luego se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante por inversión del microtubo. Al microtubo se adicionó 1 mL de etanol al 70 %, se mezcló con vórtex, se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min a 4 °C y se eliminó el etanol al 70 % por inversión del tubo; este lavado se repitió una vez más. El tubo se mantuvo invertido abierto sobre una toallita de papel estéril y fue secado por 15 min; se agregaron 50 µL de agua HPLC para disolver el ARN, se incubó

en un termoblock Labnet D-1200 a 65 °C por 5 min y de inmediato se colocó en baño de hielo durante 3 min.

### **Síntesis de cDNA.**

Una vez obtenido el RNA en cantidad y calidad adecuada, se utilizó el kit de Thermo Scientific (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, USA) para la síntesis de cDNA. En un tubo Eppendorf estéril libre de nucleasas se preparó una mezcla con 1 µL del primer Oligo (dT), 10 µL de RNA de cada muestra y 1 µL de agua libre de nucleasas y se incubaron a 65 °C por 5 min en un termoblock Labnet D-1200. Después se incubaron 5 min en hielo, se centrifugaron en la minicentrífuga (Eppendorf Centrifuge, Labnet, USA) unos segundos para concentrar el volumen y se añadieron 4 µL de Buffer Reaction (5X), 1 µL de RiboLock RNase Inhibitor (20 U µL<sup>-1</sup>), 2 µL de dNTP Mix (10 mM), 1 µL de RevertAid M-MuLV RT (200 U µL<sup>-1</sup>) para obtener un volumen final de 20 µL. Luego se incubó 60 min a 42 °C en el termoblock y se terminó la reacción aumentando a 70 °C durante 5 min.

### **Cuantificación de RNA y cDNA.**

La cuantificación y pureza del RNA y cDNA se evaluó por espectrofotometría con absorbancia de luz UV a una longitud de onda de 260 nm y 230 nm en un Espectrofotómetro NanoDrop® (ND 1000 V.3.5.2 Thermo Scientific, USA) utilizando 2 µL de la muestra obtenida.

### **Amplificación de fragmentos de DNA con PCR en electroforesis.**

A partir del cDNA obtenido se realizaron diluciones con agua HPLC a una concentración final de 50 ng µL<sup>-1</sup>. Para la amplificación de fragmentos se utilizaron 100 ng de cDNA que

fueron amplificados con 14 oligonucleótidos aleatorios (RAPDs) (Cuadro 3) en los tratamientos mencionados anteriormente.

Las características de la mezcla para PCR se muestran el Cuadro 1. Para este proceso se utilizó un termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 5 min de desnaturalización a 94 °C, seguido por 35 ciclos de amplificación (1 min a 94 °C, 1 min a 40 °C, 1:30 min a 72 °C) y un ciclo final a 72 °C por 5 min. Los fragmentos amplificados por DD-PCR se detectaron y evaluaron por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida 8 %, de acuerdo con Valadez-Moctezuma y Kahl (2000), y con esa concentración se pueden observar fragmentos que se encuentran entre 200 pb y 2.5 kb.

Las placas se prepararon limpiando los cristales con etanol 70 % con papel Kim Wipes®. La preparación del gel se realizó debajo de una campana de extracción a una concentración final 8 % en un aplicador de 100 mL (Cuadro 2). La poliacrilamida se vertió en las placas de cristales colocando enseguida un peine de 50 pozos y dejándolo polimerizar por 30 min. Trascorrido ese tiempo y ya gelificado el gel se colocaron ambas placas en la cámara dual C.B.S. (Scientific CO® modelo MVG-216-33, USA) con una fuente de poder E-C (Apparatus Vorporations®, EC-105, USA); se añadió amortiguador de corrida TBE 1x y se cargaron 5 µL de muestra mezclados con 3 µL de amortiguador de carga en cada uno de los pozos. La electroforesis se corrió a 230 voltios por 1.5 h. Trascorrido el tiempo, los geles se desmontaron y se colocaron en bandejas para su revelado. Luego se tiñeron y secaron para después fotodocumentarlos con una cámara fotográfica Nikon COOLPIX S2700 y un transiluminador de luz blanca. El tamaño de los fragmentos generados se estimó por comparación de las muestras con los

marcadores de peso molecular o *ladder* de 100 pb y 1 kb (Invitrogen), colocados cada uno en los dos pozos de los extremos del gel en las imágenes digitalizadas mediante el Software Adobe Ilustrador CS4® (AI, 1987).

**Cuadro 1. Condiciones de mezcla de PCR para la amplificación de fragmentos en hojas de *Gmelina arborea* Roxb. en tres estados de desarrollo.**

| <b>Reactivos</b>     | <b>[Stock]</b>         | <b>[Final]</b> | <b>Volumen final x 1<br/>reacción (µL)</b> |
|----------------------|------------------------|----------------|--|
| GoTaq Buffer         | 5X                     | 1x             | 5  |
| MgCl <sub>2</sub>    | 1mM                    | 2.5 mM         | 2.5  |
| DNTPs                | 1mM                    | 200 µM         | 5  |
| Primer Rapd's        | 100pM                  | 10 pM          | 2  |
| GoTaq DNA Polymerase | 5U µ L <sup>-1</sup>   | 1.5U           | 0.3  |
| cDNA                 | 50 ng µL <sup>-1</sup> | 100ng          | 2  |
| Agua HPLC            |                        |                | 8.2  |
| Volumen total        |                        |                | 25   |

**Cuadro 2. Reactivos para la preparación de geles de acrilamida 8 %.**

| <b>Preparación de acrilamida</b>   | <b>1 gel</b> | <b>2 geles</b> |
|--|--------------|----------------|
| Solución de acrilamida 30 %<br>(acrilamida-bisacrilamida (29: 1))                            | 13 mL        | 26 mL          |
| Buffer TBE 5X  | 12 mL        | 24 mL          |
| H <sub>2</sub> O destilada estéril   | 35 mL        | 70 mL          |
| APS 10 %<br>(Persulfato de amonio)   | 420 µL       | 840 µL         |
| TEMED<br>(N, N, N', N'-tetramethylethane-1,2-<br>diamine (Thermo Fisher Scientific,<br>USA)) | 35 µL        | 70 µL          |

**Cuadro 3. Oligonucleótidos aleatorios (RAPD's) seleccionados.**

| <b>Oligonucleótidos</b> | <b>Secuencia</b> |
|-------------------------|------------------|
| Roth - F01              | ACG-GAT-CCT-G    |
| Roth - F03              | CCT-GAT-CAC-C    |
| Roth - F04              | GGT-GAT-CAG-G    |
| Roth - F06              | GGG-AAT-TCG-G    |
| Roth - F14              | TGC-TGC-AGG-T    |
| Roth - G02              | GGC-ACT-GAG-G    |
| Roth - G06              | GTG-CCT-AAC-C    |
| Roth - G13              | CTC-TCC-GCC-A    |
| Roth - G16              | AGC-GTC-CTC-C    |
| Roth - H03              | AGA-CGT-ACA-C    |
| Roth - H04              | GGA-AGT-CGC-C    |
| Roth - H16              | TCT-CAG-GTG-G    |
| Roth - H18              | GAA-TCG-GCC-A    |
| Roth - H19              | CTG-ACC-AGC-C    |

## RESULTADOS

**Cuadro 4. Degradación *in situ* de la materia seca (DISMS) de hojas de *Gmelina arborea* Roxb. en tres etapas de desarrollo**

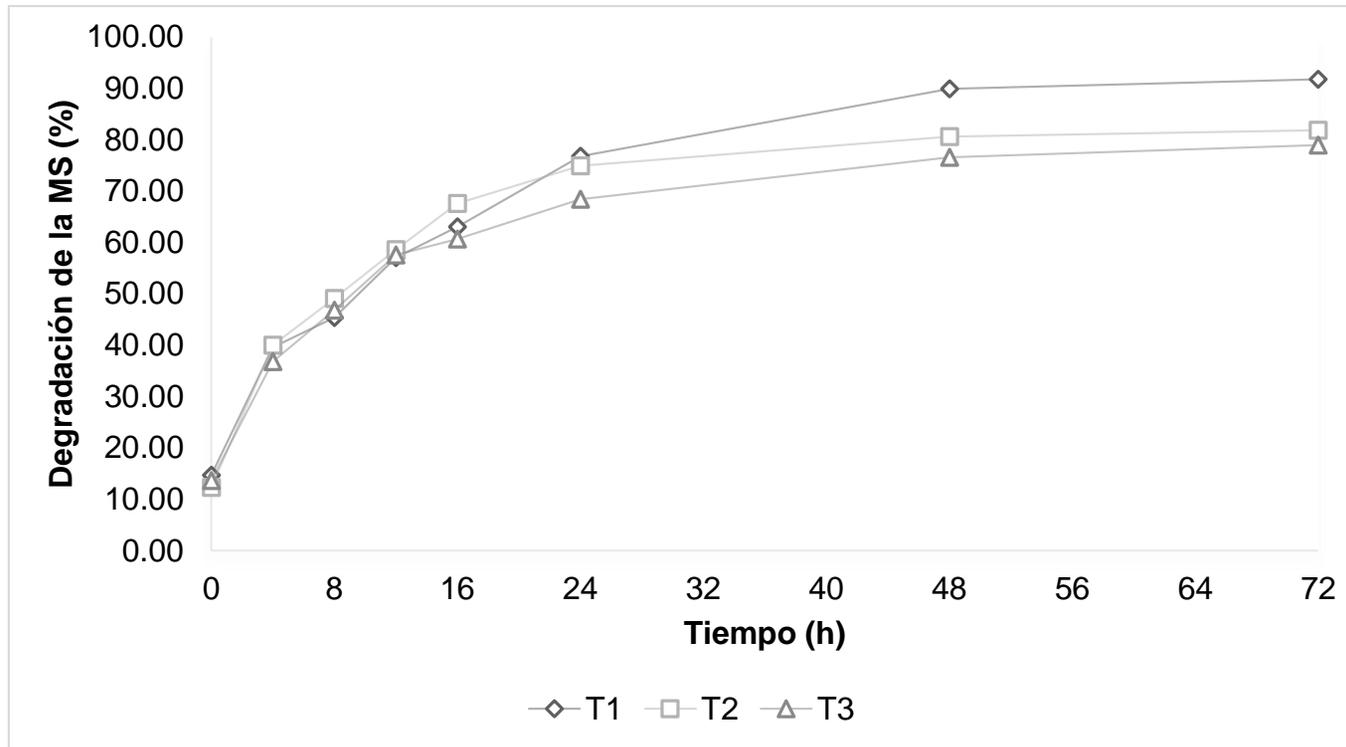
| Variable | Tratamientos |       |       |      | Periodos |       |       |       |       |       |       |       |      | P > F  |        |        |
|----------|--------------|-------|-------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|--------|--------|--------|
|          | 1            | 2     | 3     | EEM  | 0        | 4     | 8     | 12    | 16    | 24    | 48    | 72    | EEM  | T      | P      | T*P    |
| DMS      | 59.77        | 58.15 | 55.07 | 2.63 | 13.52    | 38.89 | 47.12 | 57.68 | 63.78 | 73.44 | 82.74 | 84.15 | 2.28 | 0.4852 | <.0001 | 0.3255 |

T1: hojas jóvenes, T2; hojas de mediano crecimiento y T3; hojas a punto de llegar a la senescencia. EEM. Error estándar de la media.

**Cuadro 5. Composición química de hojas de *Gmelina arborea* Roxb. en tres etapas de desarrollo.**

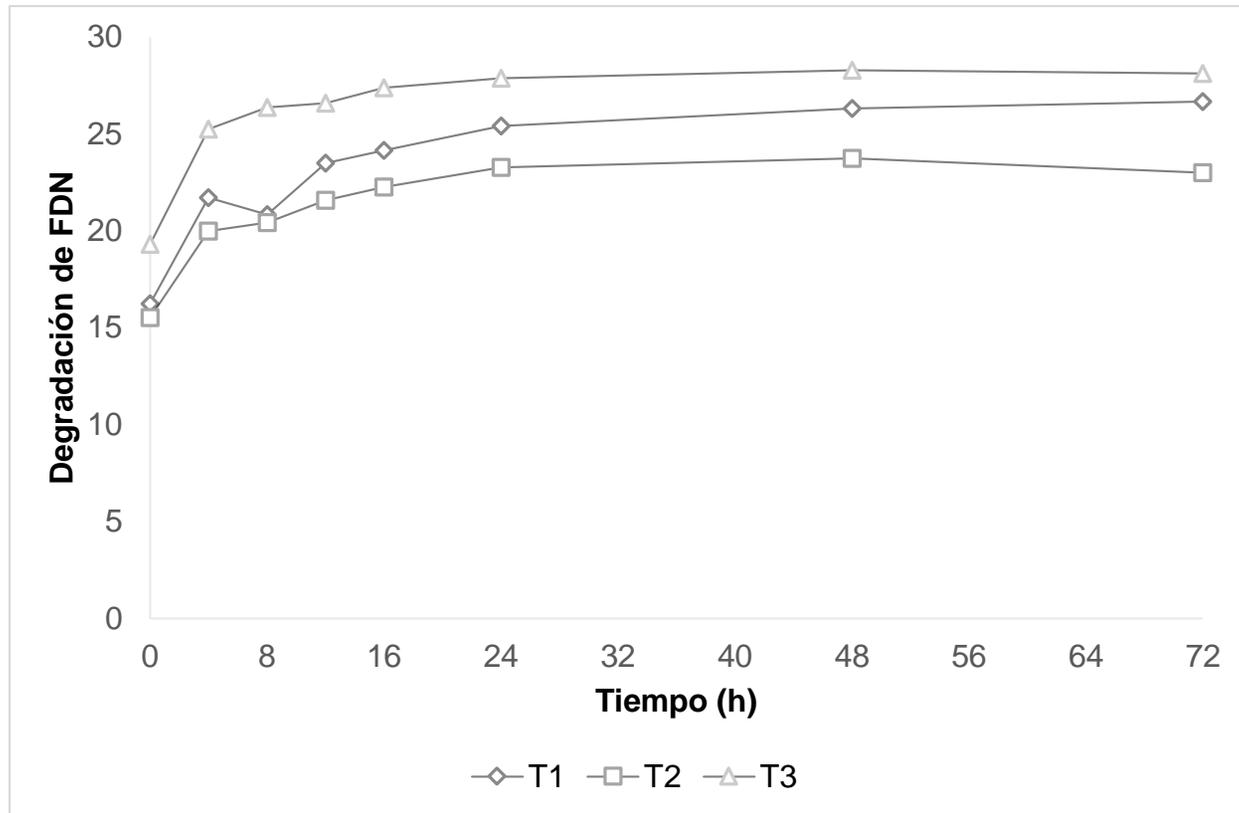
| Estado de desarrollo | Cenizas                | FDN                     | FDA                     | Lignina                 | MO        | Proteína                | EE       | Hemicelulosa | Celulosa  |
|----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|-------------------------|----------|--------------|-----------|
| T1                   | 7.35 <sup>c</sup> ±0.7 | 39.04 <sup>b</sup> ±0.4 | 27.85 <sup>b</sup> ±0.7 | 17.11 <sup>b</sup> ±0.7 | 84.86±1.2 | 11.32 <sup>c</sup> ±0.4 | 2.62±0.2 | 11.19±0.8    | 10.73±1.4 |
| T2                   | 8.22 <sup>b</sup> ±0.9 | 34.60 <sup>c</sup> ±0.8 | 24.99 <sup>c</sup> ±0.8 | 12.98 <sup>c</sup> ±1.0 | 84.62±1.2 | 15.10 <sup>a</sup> ±0.2 | 2.39±0.3 | 9.60±1.3     | 12.01±0.7 |
| T3                   | 9.30 <sup>a</sup> ±1.6 | 42.02 <sup>a</sup> ±0.2 | 31.38 <sup>a</sup> ±0.4 | 18.67 <sup>a</sup> ±0.3 | 84.24±2.3 | 12.16 <sup>b</sup> ±0.2 | 1.67±0.1 | 10.64±0.3    | 12.71±0.6 |

MO; materia orgánica, EE; extracto etéreo, FDN; fibra detergente neutro, FDA; fibra detergente ácido. T1: hojas jóvenes, T2; hojas de mediano crecimiento y T3; hojas a punto de llegar a la senescencia. Medias con distinta letra en una hilera son estadísticamente diferentes (Tukey, p<0.05).



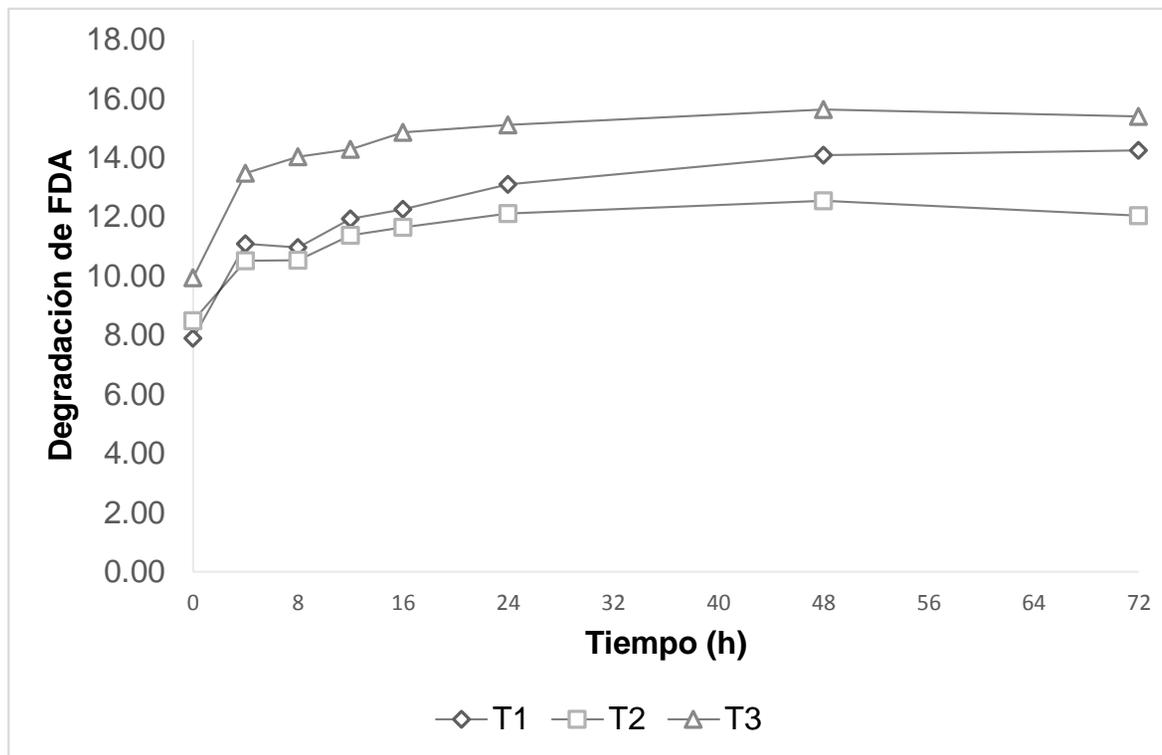
**Figura 1. Degradación *in situ* de la materia seca de hojas de *Gmelina arborea* Roxb. en tres estados de desarrollo cen 8 horarios de incubación.**

T1: hojas jóvenes, T2; hojas de mediano crecimiento y T3; hojas a punto de llegar a la senescencia



**Figura 2. Degradación *in situ* de FDN de hojas de *Gmelina arborea* Roxb. en tres estados de desarrollo en 8 horarios de incubación.**

T1: hojas jóvenes, T2; hojas de mediano crecimiento y T3; hojas a punto de llegar a la senescencia



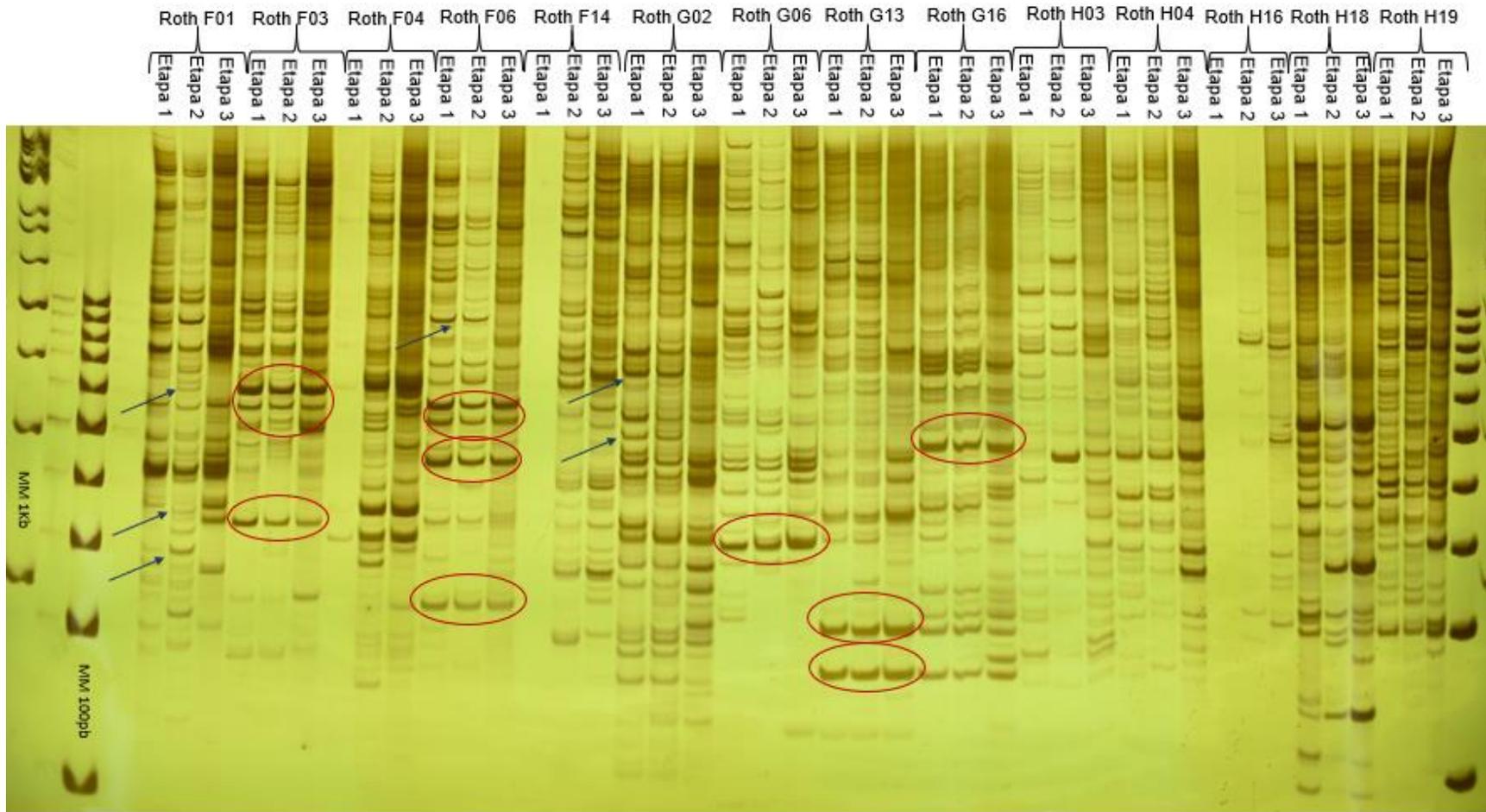
**Figura 3. Degradación *in situ* de FDA de hojas de *Gmelina arborea* Roxb. en tres estados de desarrollo en 8 horarios de incubación.**

T1: hojas jóvenes, T2; hojas de mediano crecimiento y T3; hojas a punto de llegar a la senescencia

**Cuadro 6. Concentración y absorbancia de RNA en hojas de *Gmelina arborea* Roxb. en tres estados de desarrollo.**

T1: hojas jóvenes, T2; hojas de mediano crecimiento y T3; hojas a punto de llegar a la senescencia.

| <b>Concentración</b> |                           |                |
|----------------------|---------------------------|----------------|
| <b>Muestra</b>       | <b>ng uL<sup>-1</sup></b> | <b>260/230</b> |
| T1R1                 | 537.86                    | 2.18           |
| T1R2                 | 3655.39                   | 2.1            |
| T2R1                 | 939.98                    | 2.3            |
| T2R2                 | 1699.25                   | 2.27           |
| T3R1                 | 93.54                     | 0.49           |
| T3R2                 | 77.62                     | 0.33           |



**Figura 4. Perfiles de expresión diferencial obtenidos con 14 iniciadores aleatorios en tres estados de desarrollo de *Gmelina arborea* Roxb.**

Las etiquetas muestran el iniciador evaluado con los tratamientos (Etapa 1; Hojas jóvenes, Etapa 2; mediano crecimiento y etapa 3; a punto de llegar a la senescencia). En el carril 1 y 3 se encuentran los marcadores de peso molecular 1kb y 100 pb.

**Cuadro 7. Secuencias utilizadas, número de bandas y tamaño de fragmentos en hojas de *Gmelina arborea* Roxb.**

| No. del iniciador | Nombre del oligo | Secuencia     | No. de bandas (T1) | No. de bandas (T2) | No. de bandas (T3) |
|-------------------|------------------|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1                 | Roth - F01       | ACG-GAT-CCT-G | 20                 | 35                 | 25                 |
| 2                 | Roth - F03       | CCT-GAT-CAC-C | 28                 | 25                 | 22                 |
| 3                 | Roth - F04       | GGT-GAT-CAG-G | 1                  | 28                 | 21                 |
| 4                 | Roth - F06       | GGG-AAT-TCG-G | 23                 | 19                 | 22                 |
| 5                 | Roth - F14       | TGC-TGC-AGG-T | -                  | 34                 | 34                 |
| 6                 | Roth - G02       | GGC-ACT-GAG-G | 28                 | 28                 | 24                 |
| 7                 | Roth - G06       | GTG-CCT-AAC-C | 29                 | 24                 | 20                 |
| 8                 | Roth - G13       | CTC-TCC-GCC-A | 28                 | 27                 | 14                 |
| 9                 | Roth - G16       | AGC-GTC-CTC-C | 25                 | 29                 | 24                 |
| 10                | Roth - H03       | AGA-CGT-ACA-C | 27                 | 21                 | 24                 |
| 11                | Roth - H04       | GGA-AGT-CGC-C | 29                 | 29                 | 28                 |
| 12                | Roth- H16        | TCT-CAG-GTG-G | -                  | 10                 | 17                 |
| 13                | Roth - H18       | GAA-TCG-GCC-A | 32                 | 22                 | 22                 |
| 14                | Roth - H19       | CTG-ACC-AGC-C | 33                 | 32                 | 21                 |

## DISCUSIÓN

### Composición química.

El análisis de hojas de *G. arborea* incluye MS, FDN, MO, cenizas, aminoácidos y se determina para incluir las hojas en la alimentación de rumiantes (Moemeka *et al.*, 2014; Zumbado *et al.*, 2015). En la presente investigación la proteína, FDN, FDA, lignina y cenizas fueron afectadas significativamente por la etapa de desarrollo (Cuadro 5). En cuanto a los porcentajes de proteína los valores fueron 11.32, 15.10 y 12.16 % para los tratamientos 1, 2 y 3, respectivamente, y el más elevado fue para el tratamiento 2. En forrajes el contenido de proteína es alto durante los primeros días de crecimiento y, a medida que transcurre el tiempo, disminuye su valor nutritivo. De acuerdo con Ramírez *et al.* (2008), la reducción del contenido de proteína al aumentar la edad en forrajes se atribuye a una disminución de la actividad metabólica de la planta, por lo cual a una mayor edad del forraje la síntesis de compuestos proteínicos en la planta será menor. Una característica importante en especies arbóreas es que deben tener un valor nutritivo alto para considerarse como un forraje y, de esta forma, *G. arborea* presenta valores adecuados de proteína que pueden promover cambios benéficos en la nutrición de rumiantes y, por consecuencia, considerarse como una alternativa para complementar los requerimientos de alimentación.

Los contenidos de FDA fueron de 39.04, 34.60 y 42.02 %, con el mayor porcentaje se en el tratamiento 3, seguido del 1 y finalmente el 2. Las variaciones en los contenidos de FDN y FDA entre las hojas de *G. arborea* se atribuyen principalmente a las características morfológicas de la planta, sitio, edad del árbol, tipo de suelo, la edad de rebrote, la posición de la fracción en la rama y el componente de la rama.

El valor menor de lignina fue 12.98 % para el tratamiento 2, para el tratamiento 1 fue 17.11 % y para el tratamiento 3 fue 18.67%. Se esperaba que estos valores fueran en aumento de acuerdo con la etapa de desarrollo de las hojas; sin embargo, el presente estudio muestra una tendencia diferente. Esto podría explicarse debido a la proporción de hojas respecto a la nervadura central, la cual contiene un mayor porcentaje de lignina. De acuerdo con Dixon y Paiva (1995), el estrés causado por baja temperatura, precipitación, corte de alguna estructura, ataque de patógenos y deficiencias de nitrógeno, fósforo o hierro provocan un aumento en la producción de compuestos fenólicos y entre ellos, lignina.

El presente estudio muestra valores similares a los obtenidos en otros experimentos realizados para determinar la composición química en hojas de *G. arborea* (Omokanye *et al.*, 2001; Sosa *et al.*, 2004; Ahamefule *et al.*, 2006 y Adbub *et al.*, 2012), y con los siguientes resultados: materia seca 78.49 %, materia orgánica 68.59 %, proteína 15.92 a 26.7 %, cenizas 9.77 a 10 %, fibra detergente neutro 36.85 a 45 %, fibra detergente ácido 19.76 a 34.7 %.

### **Degradación *in situ* de hojas de *Gmelina arborea* Roxb.**

La degradación *in situ* de las hojas en cada tratamiento se observa en la figura 1 y se muestran los horarios de incubación y el valor de degradación correspondiente. La degradación de MS a las 72 h fue 91.84, 81.82 y 78.97 %. De acuerdo con estos resultados hay un valor alto de degradación de las hojas, pero no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, lo cual indica que la etapa de crecimiento de las hojas no afecta la degradación de la materia seca en esta especie. Según Norton (1994), la degradación del material vegetal en el rumen está relacionada con la proporción de las

paredes celulares, y se considera que especies arbóreas con contenidos de 20 a 35 % de FDN presentan valores altos de degradación. Sin embargo, la degradación no solo depende del contenido de FDN, sino también del grado de lignificación de las paredes celulares (Ahn *et al.*, 1989).

### **Perfiles de expresión diferencial**

El material empleado fue óptimo para la generación de perfiles de expresión diferencial mediante la técnica RAPD (Cuadro 6). Los catorce oligonucleótidos utilizados mostraron perfiles de expresión claros y reproducibles. El número de bandas producidas por cada iniciador fue de 10 a 35 dependiendo de la etapa de desarrollo de las hojas evaluadas. El tamaño de los fragmentos amplificados fue de 120 a 2,500 pb (Figura 4). La expresión diferencial es afectada por la etapa de crecimiento evaluada, por lo que a mayor edad de las hojas se observan cambios en el nivel de expresión de genes observados a manera de bandas polimórficas. Los perfiles de expresión muestran fragmentos que no cambian de acuerdo a la etapa, lo cual indica que ese gen se encuentra presente en el metabolismo durante las tres etapas evaluadas del desarrollo de las hojas. Sin embargo, para determinar cuáles genes se están expresando de forma puntual y de acuerdo con la etapa de crecimiento es necesario secuenciar estos fragmentos amplificados.

La importancia de este tipo de estudios reside en la información obtenida para comprender mejor los resultados de los análisis de los componentes de las hojas y de su degradación *in situ*, así como de la interacción con la etapa de desarrollo, lo cual se expresa en los resultados mostrados anteriormente. El conocimiento de los genes en la fenología de las hojas de *G. arborea* Roxb. ayudaría a identificar aquellos genes que puedan tener un efecto positivo o negativo en la utilización de este tipo de forraje, según

el estado de desarrollo de la hoja. Como perspectiva para otras investigaciones, se pretende secuenciar los productos de PCR obtenidos a través de metagenómica y su posterior análisis bioinformático, con el fin de conocer genes de la planta que codifican para algunas proteínas de importancia para la alimentación o nutrición en animales y su expresión de acuerdo con la etapa de desarrollo.

## **CONCLUSIONES**

Los resultados de la presente investigación confirman que la etapa de desarrollo modifica la composición química de hojas de *Gmelina arborea* Roxb. en los estadios evaluados a través del tiempo, además de los perfiles de expresión diferencial. Sin embargo, la degradación *in situ* de MS no mostró cambios significativos entre tratamientos. Las hojas de este árbol presentan valores adecuados de proteína, además de una tasa alta de degradación de materia seca, lo cual puede ser benéfico en la nutrición de rumiantes y, por lo tanto, sería una alternativa para complementar sus requerimientos de alimentación. Pero es necesario implementar un manejo adecuado de esta especie en sistemas de producción agrosilvopastoriles, en los cuales se pueda aprovechar el potencial de la *G. arborea*. Los perfiles de expresión diferencial desarrollados en la presente investigación fueron claros y reproducibles; además mostraron polimorfismos en los tres estados de desarrollo de las hojas de *G. arborea*. El conocimiento de la presencia de genes específicos que se expresen durante la fenología de las hojas ayudaría a identificar aquellos genes de interés agrosilvopastoriles.

## LITERATURA CITADA.

- Abdu, S. B., Hasan, M. R., Adamu, H. Y., Yashimi, S. M., and Abdullahi, M. J. 2012. Intake, nutrient digestibility and nitrogen balance of *Acacia Auriculata*, *Gmelina arborea*, *Albizia lebeck* and *Butryospermun parkii* by Yakansa bucks. Iranian Journal of Applied Animal Science. 2(2): 121-125.
- Adbud, S. B. Hassan M. R., Jokthan G. E., Adamu H. Y., Yashim A. M. and Yusuf K. 2012. Effect of varied inclusion levels of (*Gmelina arborea*) leaf meal on intake, digestibility and nitrogen in Red Sokoto bucks fed on sorghum glume based complete diets. Advances in Agriculture, Sciences and Engineering Research. 2: 79- 84.
- Ahamefule, F. O., Obua, B. E., J. A. Ibeawuchi, J. A. and Udosen, N. R. 2006. The nutritive value of some plants browsed by cattle in Umudike, Southeastern Nigeria. Pakistan Journal of Nutrition. 5: 404-409.
- Ahn, J. H., Robertson, B. M., Elliott, R., Gutteridge, R. C., & Ford, C. W. 1989. Quality assessment of tropical browse legumes: tannin content and protein degradation. Animal Feed Science and Technology. 27(1-2): 147-156.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Avellán-Zumbado, M.J., Murillo-Cruz, R., Alvarado-Hernáned, A., and Ávila-Arias, C. 2015. Variación del contenido foliar de nutrimentos de *Gmelina arborea* en los cantones de Osa, Golfito y Corredores, Costa Rica. Revista de Ciencias Ambientales. 49(1):1–15
- Bardakci, F. 2001. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Turkish Journal of Biology. 25(2): 185-196

- Barrantes Madrigal, K., Ávila Arias, C., Murillo Cruz, R., Solís Ramos, L., Porras Murillo, R., & Herrera Vargas, P. 2018. Relación de la clorofila y el nitrógeno foliar de *Gmelina arborea* Roxb. en vivero y en campo. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 9(46): 209-239.
- Burte, R.G., Raut, M. Y., Jadhav, S.S., Wadekar, V.V. and Yadav, D.N. 2006. Nutritive value of shivan (*Gmelina arborea*) tree leaves for goats. *Indian Journal of Small Ruminants*. 12(1): 110-112.
- Bustin S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169-193.
- Carranza Montaña, M. A., Sánchez Velásquez, L. R., Pineda López, M. D. R., y Cuevas Guzmán, R. 2003. Calidad y potencial forrajero de especies del bosque tropical caducifolio de la Sierra de Manantlán, México. *Agrociencia*. 37: 203-210.
- Chander Datt, Datta, M and Singh, N.P. 2008. Assessment of fodder quality of leaves of multipurpose trees in subtropical humid climate of India. *Journal of Forestry Research*. 19(3): 209-214.
- Cruz-Fernández, M. y J. A. de la Garza-Núñez. 2003. La melina, establecimiento y aprovechamiento en la Huasteca Potosina. INIFAP-CIRNE. Campo experimental Huichihuayán. Folleto para productores No. 5:14 pp.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*. 7:1085-1097.
- Giordano, A., Liu, Z., Panter, S. N., Dimech, A. M., Shang, Y., Wijesinghe, H., & Patron, N. J. 2014. Reduced lignin content and altered lignin composition in the warm

- season forage grass *Paspalum dilatatum* by down-regulation of a Cinnamoyl CoA reductase gene. *Transgenic Research*. 23(3): 503-517.
- Herrera, M. A. L., Lorca, J. A. R., Reyes, L. O., Mex, J. G. E., Magaña, M. Á. M., García, J. R. S., y Vázquez, Á. C. S. 2008. Contenido nutritivo y factores antinutricionales de plantas nativas forrajeras del norte de Quintana Roo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 46(2): 205
- Kennedy, P. M., and Lowry, J. B. 2002. Do tree leaves promote digestion of grass by cattle? *Animal Production Australia*. 24:121-124.
- López, H. M. A., Rivera, L. J. A., Ortega, R. L., Escobedo, M. J. G., Magaña, M. M. A., Sanginés. G. J. R., Sierra, V. A. C. 2008. Contenido nutritivo y factores antinutricionales de plantas nativas forrajeras del norte de Quintana Roo. *Técnica Pecuaria México*. 46: 205-215.
- Lowry, J. B., 1995. Deciduous trees: a dry season feed resource in Australian tropical woodlands? *Tropical Grasslands*. 29: 13–17.
- Matt Carter, and Jennifer Shieh. 2015. *Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology in Guide to Research Techniques in Neuroscience*. Second Edition, Academic Press. 219-237.
- Méndez-Álvarez, S., y Pérez-Rotha, E. 2004. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22(3): 183-192.
- Moemeka, M. A., Okagbare, G. O., and Sorhue, G. U. 2014. The optimum feeding level of *Gmelina arborea* leaves supplemented with *Pennisetum purpureum* to West African Dwarf (WAD) goats. *Animal Biology and Animal Husbandry. International Journal of the Bioflux Society*. 6(2): 134-139.

- Muñoz Flores, H. Jesús, Coria Ávalos, Víctor M., García Sánchez, J. Jesús, y Balam Che, Manuel. (2009). Evaluación de una plantación de tres especies tropicales de rápido crecimiento en Nuevo Urecho, Michoacán. *Ciencia Forestal en México*. 34(106): 61-87.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S140535862009000200004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S140535862009000200004&lng=es&tlng=es).
- Norton, B. W. 1994. The nutritive value of tree legumes. In: Gutteridge RC, Shelton HM editors. *Forage tree legumes in tropical agriculture*. Wallingford, UK: CAB International. pp: 177-191.
- Okafor, E. C., Lakpini, C. A. M., and Fayomi, A. 2012. Dried Gmelina (*Gmelina arborea* Roxb) leaves as replacement forage to groundnut haulms in the diet of fattening Red Sokoto buks. *International Journal of Agriculture Biosciences*. 1(1): 5-10.
- Omokanye, A. T., Balogun, R. O., Onifade, O. S., R. A. Afolayan, R. A. and Olayemi, M. E. 2001. Assessment of preference and intake of browse species by Yankasa sheep at Shika, Nigeria. *Small Ruminant Research*. 42: 203-210.
- Omokanye, A. T., Lamidi, O. S. and Oyeleke, L. S. 2014. *Gmelina arborea* at Shika, Nigeria: Nutritive indices, preferences and intake of plant parts by Yankasa Sheep. *International Journal of Research in Agriculture and Forestry*. 1(2): 31-36.
- Oriola J. 2013. Qué técnicas de biología molecular deben conformar el armamentario para la investigación básica en uro-oncología. *Archivos Españoles de Urología* 66: 409-415.
- Ørskov, E. R, Hovell, F. D. De, B. and Mould, F. 1980. The use of nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Tropical Animal Production*. 5: 195-213.

- Ørskov, E. R. 2000. The in situ technique for the estimation of forage degradability in ruminants. *In: Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. CAB International, New York. pp: 175-188.
- Poovaiah, C. R., Nageswara-Rao, M., Soneji, J. R., Baxter, H. L., & Stewart Jr, C. N. 2014. Altered lignin biosynthesis using biotechnology to improve lignocellulosic biofuel feedstocks. *Plant Biotechnology Journal*. 12(9): 1163-1173.
- Rubio, E. E. S., Lara, L. I. S., Buenfil, G. D. J. Z., y Reyes, L. O. 2000. Composición botánica y valor nutricional de la dieta de bovinos en un área de vegetación secundaria en Quintana Roo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 38(2). 105-118.
- Sosa Rubio, E. E., Pérez Rodríguez, D., Ortega Reyes, L., y Zapata Buenfil, G. 2004. Evaluación del potencial forrajero de árboles y arbustos tropicales para la alimentación de ovinos. *Técnica Pecuaria en México*. 42(2), 129-144.
- Stabile, S. S., Bodini, A. P., Jank, L., Rennó, F. P., Santos, M. V., & Silva, L. F. P. 2012. Expression of genes from the lignin synthesis pathway in guineagrass genotypes differing in cell - wall digestibility. *Grass and Forage Science*. 67(1): 43-54.
- Tu, Y., Rochfort, S., Liu, Z., Ran, Y., Griffith, M., Badenhorst, P., & Mouradov, A. 2010. Functional analyses of caffeic acid O-methyltransferase and cinnamoyl-CoA-reductase genes from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *The Plant Cell*, 22 (10). 3357-3373
- Valadez-Moctezuma, E.; Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Mundi-Prensa. México, D. F., México. 147 p

Van Soest, P. V., Robertson, J. B., and Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74(10): 3583-3597.