



Casa abierta al tiempo

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“Efecto del estrés oxidante en la viabilidad, germinación y vigor de semillas de *Escontria chiotilla* y *Stenocereus pruinosus*”

## TESIS

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud

## PRESENTA

M. en B. David Alejandro Guzmán Hernández  
2183801758  
dagh0709@gmail.com

## COMITÉ TUTORAL

Dra. Laura Josefina Pérez Flores (Codirectora)  
Dr. Juan Manuel Villa Hernández (Codirector)  
Dra. Claudia Barbosa Martínez (Asesora)

## JURADO

Dra. Laura Josefina Pérez Flores (Presidenta)  
Dr. Juan Manuel Villa Hernández (Secretario)  
Dra. Claudia Barbosa Martínez (Vocal)  
Dr. José Alejandro Zavala Hurtado (Vocal)  
Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera (Vocal)

Iztapalapa, Ciudad de México, 04 diciembre de 2024

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Ecofisiología Vegetal (AS-118) del Departamento de Biología y en el Laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (W-203) del Departamento de Ciencias en la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAMI), bajo la codirección de la Dra. Laura Josefina Pérez Flores, adscrita al Laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la UAMI, y del Dr. Juan Manuel Villa Hernández, adscrito al Instituto de Investigación de Genética de la Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido. El asesoramiento de este trabajo estuvo a cargo de la Dra. Claudia Barbosa Martínez, adscrita al Laboratorio de Ecofisiología Vegetal de la UAMI.

El autor agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 718628, que abarcó del periodo de octubre de 2018 a septiembre de 2022. El programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana forma parte del Sistema Nacional de Posgrados del CONAHCyT, con número de referencia 001480.

El jurado designado por la Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis presentada por:

M en B. David Alejandro Guzmán Hernández

El día 04 de diciembre de 2024

**JURADO:**



---

Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Presidenta



---

Dr. Juan Manuel Villa Hernández

Secretario



---

Dra. Claudia Barbosa Martínez

Vocal



---

Dr. José Alejandro Zavala Hurtado

Vocal



---

Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera

Vocal

## DEDICATORIA

A mis padres, Armando Guzmán Méndez y Martha Hernández Hernández, porque desde el momento en que nací, me dieron todo su amor y comprensión. A ustedes les dedico este logro, como una muestra de mi profundo agradecimiento.

A mis hermanos, Mario Alberto Guzmán Hernández y Diego Armando Guzmán Hernández, por siempre estar a mi lado. En cada paso de este camino, su sola presencia ha sido un recordatorio de que nunca he estado solo.

A mis profesores, por haber contribuido a mi crecimiento tanto personal como profesional. Agradezco profundamente su paciencia, generosidad y compromiso con su invaluable labor.

A mis amigos, que me han acompañado a lo largo de esta aventura y me han ayudado a creer en mí cuando dudaba de mis capacidades.

A todas aquellas personas con las que he tenido la oportunidad de coincidir en esta vida y que han contribuido a formar la persona que soy hoy. Cada encuentro, cada conversación y cada experiencia compartida han dejado una huella en mi camino.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONAHCyT, por el apoyo financiero que me proporcionó, el cual hizo posible llevar a cabo esta investigación. Gracias a esta beca, pude desarrollar mis habilidades y conocimientos de manera integral.

A la UAMI, por abrirme las puertas y brindarme no solo conocimientos académicos, sino también valores, experiencias y oportunidades que han enriquecido tanto mi vida personal como profesional.

A la Dra. Laura Josefina Pérez Flores, por la ayuda brindada en el trabajo experimental, así como en la interpretación y análisis de los resultados. Asimismo, agradezco sus observaciones y correcciones realizadas en este escrito y en el artículo de investigación que resultó de este proyecto.

Al Dr. Juan Manuel Villa Hernández, por su valiosa participación en el proyecto de investigación. Sus comentarios y sugerencias han sido fundamentales para enriquecer y mejorar significativamente el contenido de este trabajo.

A la Dra. Claudia Barbosa Martínez, por su paciencia, apoyo y consejos brindados desde mis estudios de licenciatura hasta el doctorado. Además, le agradezco inmensamente la gran oportunidad y confianza que me proporcionó para introducirme en el campo de la docencia.

A la Dra. Mina Konigsberg Fainstein, por permitirme utilizar su espectrofotómetro, lo que facilitó la realización de las determinaciones del contenido de malondialdehído y del potencial redox en este proyecto de investigación.

Agradezco a la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera, al Dr. José Alejandro Zavala Hurtado, a la Dra. Norma Edith López Díaz y a la Dra. Helia Reyna Osuna Fernández por haber revisado mi tesis y por participar como jurado en mi examen predoctoral. Su tiempo, dedicación y valiosos comentarios han mejorado la calidad del trabajo.

A todas aquellas personas que contribuyeron en la realización de este trabajo.

**Declaración de originalidad**

El que suscribe, David Alejandro Guzmán Hernández, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, y autor de la tesis titulada “Efecto del estrés oxidante en la viabilidad, germinación y vigor de semillas de *Escontria chiotilla* y *Stenocereus pruinosus*”,

Declaro que:

1. La tesis que presento ante el Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, para la obtención del grado de Doctor, es de mi autoría y original creación, producto del trabajo de investigación personal e individual. Esta tesis cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido reconocimiento de los créditos autorales.
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y/o tablas sin el correspondiente reconocimiento de los créditos autorales y/o la fuente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana ante cualquier demanda o reclamación que pudiera formular una persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o la comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma y asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas en caso de que ésta no sea de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 04 de diciembre de 2024.

**Atentamente**



---

**M. en B. David Alejandro Guzmán Hernández**



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

### Carta de Cesión de Derechos

En la Ciudad de México, a 04 de diciembre de 2024, quien suscribe, David Alejandro Guzmán Hernández, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, manifiesta que es el autor intelectual de la tesis titulada “Efecto del estrés oxidante en la viabilidad, germinación y vigor de semillas de *Escontria chiotilla* y *Stenocereus pruinosus*”, bajo la dirección del Comité Tutoral conformado por la Dra. Laura Josefina Pérez Flores, el Dr. Juan Manuel Villa Hernández y la Dra. Claudia Barbosa Martínez. Asimismo, cede los derechos del trabajo de tesis a la Universidad Autónoma Metropolitana para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o los datos del trabajo sin permiso expreso del autor o del Comité Tutoral del trabajo. Para solicitar autorización, los usuarios podrán escribir al correo electrónico [guh@xanum.uam.mx](mailto:guh@xanum.uam.mx). Si se otorga el permiso, el usuario deberá seguir las indicaciones correspondientes y citar la fuente adecuadamente.

**Atentamente**

---

**M. en B. David Alejandro Guzmán Hernández**

# ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	12
ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
ABREVIATURAS .....	14
RESUMEN.....	15
ABSTRACT .....	16
1. INTRODUCCIÓN .....	17
2. ANTECEDENTES.....	19
2.1. Semilla.....	19
2.1.1. Diferencias entre las semillas de gimnospermas y de angiospermas .....	20
2.1.2. Importancia de las semillas.....	21
2.2. Germinación .....	21
2.3. Latencia.....	21
2.3.1. Tipos de latencia.....	22
2.4. Viabilidad .....	22
2.5. Vigor .....	23
2.6. Longevidad .....	23
2.6.1. Longevidad ecológica .....	23
2.6.2 Longevidad potencial .....	23
2.7. Banco de semillas en el suelo .....	24
2.7.1. Clasificación de los bancos de semillas en el suelo .....	24
2.8. Dinámica del banco de semillas en el suelo.....	25
2.8.1. Entrada .....	25
2.8.2. Persistencia.....	25
2.8.3. Salida .....	26
2.9. Clasificación de las semillas .....	26
2.9.1. Semillas ortodoxas .....	27
2.9.2. Semillas recalcitrantes .....	27
2.9.3. Semillas intermedias .....	28
2.10. Familia Cactaceae .....	28
2.10.1. Importancia de la familia Cactaceae en México .....	28
2.10.2. Problemas de conservación en la familia Cactaceae en México .....	29
2.10.3. Estrategias de conservación en la familia Cactaceae en México .....	32
2.11. Semillas de cactáceas.....	33



2.12. Germinación de las semillas de cactáceas.....	34
2.13. Latencia en las semillas de cactáceas.....	34
2.14. Almacenamiento de las semillas de cactáceas en condiciones <i>ex situ</i> .....	35
2.15. Bancos de semillas de cactáceas en el suelo.....	39
2.16. Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	41
2.17. Mecanismos antioxidantes.....	41
2.18. Antioxidantes enzimáticos.....	41
2.18.1. Superóxido dismutasa (SOD).....	42
2.18.2. Catalasa (CAT).....	42
2.18.3. Peroxidasas (POD).....	42
2.18.4. Enzimas del ciclo ascorbato-glutación (AsA-GSH).....	43
2.19 Antioxidantes no enzimáticos.....	43
2.19.1. Ascorbato (AsA).....	43
2.19.2. Glutación (GSH).....	44
2.19.3. Betalaínas.....	44
2.19.4. Carotenoides.....	44
2.19.5. Tocoferoles, tocotrienoles y tococromanos.....	44
2.19.6. Compuestos fenólicos.....	45
2.20. Estrés oxidante.....	45
2.21. Efecto de las especies reactivas de oxígeno en las biomoléculas.....	45
2.21.1. Daño en los lípidos.....	45
2.21.2. Daño en las proteínas.....	46
2.21.3. Daño en el ADN.....	46
2.22. Especies reactivas de oxígeno en las semillas.....	47
2.23. Efecto dual de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología de las semillas.....	47
2.24. Especies reactivas de oxígeno como moléculas de señalización.....	47
2.24.1. Debilitamiento del endospermo.....	48
2.24.2. Ruptura de la latencia.....	48
2.24.3. Protección contra patógenos.....	48
2.25. Factores que intervienen en el envejecimiento de las semillas.....	49
2.26. Cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares asociados al envejecimiento de las semillas.....	50
2.26.1. Cambios fisiológicos.....	50
2.26.2. Cambios bioquímicos.....	50

2.26.3. Cambios moleculares .....	52
3. ANTECEDENTES DIRECTOS .....	53
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	54
5. HIPÓTESIS .....	55
6. OBJETIVOS .....	56
6.1. Objetivo General .....	56
6.2. Objetivos Específicos .....	56
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	57
7.1. Especies de estudio .....	57
7.1.1. <i>Escontria chiotilla</i> .....	57
7.1.2. <i>Stenocereus pruinosus</i> .....	58
7.2. Sitio de estudio .....	59
7.2.1. Ubicación, extensión y límites .....	59
7.2.2. Relieve .....	59
7.2.3. Fisiografía .....	60
7.2.4. Suelo .....	60
7.2.5. Clima .....	60
7.3. Muestreo de frutos y extracción de las semillas .....	62
7.4. Almacenamiento <i>ex situ</i> de las semillas .....	62
7.5. Enterramiento <i>in situ</i> de las semillas .....	63
7.5.1. Experimento 1: Comparación entre el almacenamiento <i>ex situ</i> y el enterramiento <i>in situ</i> .....	63
7.5.2. Experimento 2: Efecto de los factores ambientales (sequías y lluvias) en el deterioro de las semillas enterradas <i>in situ</i> .....	63
7.6. Pruebas de viabilidad .....	64
7.7. Análisis de vigor .....	65
7.8. Determinación de la oxidación de los lípidos .....	65
7.9. Extracción y cuantificación de las proteínas solubles .....	66
7.10. Determinación del contenido de las proteínas oxidadas .....	66
7.11. Contenido de glutatión reducido, glutatión oxidado y estado redox .....	66
7.12. Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes .....	67
7.13. Análisis estadísticos .....	68
8. RESULTADOS .....	69
8.1. Experimento 1: Comparación entre el almacenamiento <i>ex situ</i> y el enterramiento <i>in situ</i> .....	69

8.1.1. Efecto del almacenamiento <i>ex situ</i> y el enterramiento <i>in situ</i> sobre la viabilidad y el vigor de las semillas.....	69
8.1.2. Efecto del almacenamiento <i>ex situ</i> y el enterramiento <i>in situ</i> sobre los marcadores de estrés oxidante .....	73
8.2. Experimento 2: Efecto de los factores ambientales (sequías y lluvias) en el deterioro de las semillas enterradas <i>in situ</i> .....	78
8.2.1. Análisis de correlación del experimento 2 .....	84
9. DISCUSIÓN.....	85
10. CONCLUSIONES .....	90
11. PERSPECTIVAS .....	91
12. REFERENCIAS .....	92
12. ANEXOS.....	111

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Especies y subespecies de cactáceas que se distribuyen en México y que, de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010, presentan problemas de conservación .....	30
<b>Tabla 2.</b> Viabilidad de las semillas de diferentes especies de cactáceas almacenadas <i>ex situ</i> durante diferentes períodos de tiempo. ....	36
<b>Tabla 3.</b> Tipos de bancos de semillas en el suelo reportados en diferentes especies de cactáceas .....	40
<b>Tabla 4.</b> Correlación entre la viabilidad, el estado redox, la conductividad eléctrica, el contenido de malondialdehído, las proteínas solubles y oxidadas, y la actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas en las semillas de <i>E. chiotilla</i> .....	84
<b>Tabla 5.</b> Correlación entre la viabilidad, el estado redox, la conductividad eléctrica, el contenido de malondialdehído, las proteínas solubles y oxidadas, y la actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas en las semillas de <i>S. pruinosus</i> .....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de una semilla típica.....	19
<b>Figura 2.</b> Procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que ocurren durante las fases de imbibición de las semillas.....	22
<b>Figura 3.</b> Esquema de una semilla típica de cactáceas.....	34
<b>Figura 4.</b> <i>Escontria chiotilla</i> .....	57
<b>Figura 5.</b> <i>Stenocereus pruinosus</i> .....	58
<b>Figura 6.</b> Mapa de la ubicación y límites del Municipio de Santiago Chazumba, Oaxaca.....	59
<b>Figura 7.</b> Temperatura y precipitación promedio mensual (período de 1961-2003) en el municipio de Santiago Chazumba, Oaxaca .....	61
<b>Figura 8.</b> Estaciones climáticas consultadas durante el período de estudio (2016-2019).....	62
<b>Figura 9.</b> Prueba de Cloruro 2, 3, 5-trifeniltetrazolio en las semillas de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i> .....	64
<b>Figura 10.</b> Efecto del almacenamiento <i>ex situ</i> y el enterramiento <i>in situ</i> durante 0, 12 y 24 meses sobre la viabilidad, el $T_{50}$ y la conductividad eléctrica en las semillas de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i> .....	70
<b>Figura 11.</b> Efecto del almacenamiento <i>ex situ</i> y el enterramiento <i>in situ</i> durante 0, 12 y 24 meses en la sobrevivencia de las plántulas de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i> .....	71
<b>Figura 12.</b> Efecto del almacenamiento <i>ex situ</i> y el enterramiento <i>in situ</i> durante 0, 12 y 24 meses en el crecimiento de las plántulas de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i> .....	72
<b>Figura 13.</b> Efecto del almacenamiento <i>ex situ</i> y enterramiento <i>in situ</i> durante 0, 12 y 24 meses sobre el contenido de malondialdehído, las proteínas solubles y oxidasas en las semillas de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i> .....	75
<b>Figura 14.</b> Efecto del almacenamiento <i>ex situ</i> y el enterramiento <i>in situ</i> durante 0, 12 y 24 meses sobre el contenido de glutatión y el estado redox en las semillas de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i> .....	76
<b>Figura 15.</b> Efecto del almacenamiento <i>ex situ</i> y el enterramiento <i>in situ</i> durante 0, 12 y 24 meses sobre la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas en las semillas de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i> .....	77
<b>Figura 16.</b> Viabilidad, $T_{50}$ y conductividad eléctrica en las semillas de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i> enterradas <i>in situ</i> durante 0, 6, 12, 14 y 16 meses .....	80
<b>Figura 17.</b> Contenido de malondialdehído, proteínas solubles y oxidadas en las semillas de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i> enterradas <i>in situ</i> durante 0, 6, 12, 14 y 16 meses .....	81
<b>Figura 18.</b> Contenido de glutatión y estado redox en las semillas de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i> enterradas <i>in situ</i> durante 0, 6, 12, 14 y 16 meses. ....	82
<b>Figura 19.</b> Actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas en las semillas de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i> enterradas <i>in situ</i> durante 0, 6, 12, 14 y 16 meses. ....	83

## ABREVIATURAS

<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>AsA</b>	Ascorbato
<b>APx</b>	Ascorbato peroxidasa
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CTT</b>	Cloruro 2, 3, 5-trifeniltetrazolio
<b>CE</b>	Conductividad eléctrica
<b>DHA</b>	Dehidroascorbato
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>GA</b>	Giberelinas
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>mV</b>	Milivoltios
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MDHA</b>	Monodehidro ascorbato
<b>PCD</b>	Muerte celular programada
<b>POD</b>	Peroxidasas
<b>PS</b>	Peso seco
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa

## RESUMEN

Las semillas pueden permanecer viables *in situ*, en bancos de semillas en el suelo, o *ex situ*, en bancos de germoplasma, después de su maduración y dispersión. El estudio de estos dos tipos de bancos es esencial para la gestión sostenible y la preservación del patrimonio natural, ya que son vitales para el mantenimiento y la renovación de las comunidades vegetales. No obstante, en el caso de las cactáceas, existen pocas investigaciones sobre este tema. Además, los mecanismos que subyacen al envejecimiento de las semillas, ya sea por almacenamiento artificial o natural, no se comprenden completamente. En este trabajo se proporciona información nueva sobre el envejecimiento de las semillas de *Escontria chiotilla* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) y *Stenocereus pruinosus* (Otto ex Pfeiff.) Buxbaum, almacenadas en diferentes condiciones y durante distintos periodos de tiempo. Las semillas se almacenaron *ex situ* a  $25 \pm 3$  °C, en condiciones controladas de humedad ( $20 \pm 2$  %) y oscuridad, e *in situ*, enterradas en el suelo de un matorral xerófilo. Se evaluaron la capacidad y velocidad de germinación, la fuga de solutos y los indicadores del equilibrio redox, incluidos el contenido de glutatión, el estado redox ( $E_{GSSG/2GSH}$ ), los niveles de malondialdehído (MDA), las proteínas solubles y oxidadas, y la actividad de las enzimas antioxidantes. Los resultados demostraron que las semillas de ambas especies conservaron la viabilidad durante 24 meses de almacenamiento *ex situ*, con un contenido de agua del 7-9 %, en comparación con las semillas enterradas *in situ*. En un segundo experimento *in situ*, las semillas de *E. chiotilla* sobrevivieron a una estación húmeda y otra seca durante 12 meses, pero perecieron rápidamente durante la segunda estación lluviosa. Por el contrario, las semillas de *S. pruinosus* empezaron a perder viabilidad a los 6 meses de estar enterradas; al final de la temporada de lluvias, la mayoría de las semillas murieron, y al término de la temporada seca no hubo sobrevivencia. Estas respuestas entre especies se relacionaron con cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes y en el estado redox. En ambos experimentos, la pérdida de viabilidad de las semillas se asoció con un cambio del  $E_{GSSG/2GSH}$  a un estado más oxidante durante el enterramiento. Pero, los niveles de MDA y proteínas oxidadas no mostraron relación con el desequilibrio redox ni con la pérdida de viabilidad, lo que indica que estos compuestos no son buenos marcadores del estrés oxidante en las semillas de los cactus estudiados.

**Palabras clave:** bancos de semillas, envejecimiento, semillas de cactáceas.

## ABSTRACT

Seeds can remain viable *in situ* in soil seed banks or *ex situ* in germplasm banks after maturation and dissemination. The study of these two types of banks is essential for the sustainable management and preservation of the natural heritage since they are vital for the for maintaining and renewing plant communities. However, not much research has been done on cactus. Moreover, nothing is known about the mechanisms underlying seed aging, whether it results from artificial or natural storage. This study offers new data on the aging of *Escontria chiotilla* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) and *Stenocereus pruinosus* (Otto ex Pfeiff.) Buxbaum seeds, stored under different conditions and time periods. The seeds were kept *in situ*, buried in the xerophytic scrub soil, and *ex situ* at  $25 \pm 3$  °C, under controlled conditions of humidity ( $20 \pm 2$  %) and darkness. Evaluations were conducted on the solute leakage, germination speed and capacity, and redox balance markers such as glutathione, redox state ( $E_{GSSG/2GSH}$ ), malondialdehyde (MDA), soluble protein and oxidized protein levels, and antioxidant enzyme activity. The findings demonstrated that seeds of both species retained viability throughout 24 months of *ex situ* storage, with a water content of 7–9 %, in contrast to seeds buried *in situ*. In a second *in situ* experiment, *E. chiotilla* seeds survived a wet and a dry season for 12 months, but during the second rainy season, the seeds quickly perished. In contrast, *S. pruinosus* seeds started to lose viability after 6 months of being buried and at the end of the rainy season, most of the seeds died and at the end of the dry season there was no survival. These species-to-species responses were linked to changes in antioxidant enzyme activity and redox status. The loss of seed viability in both storage studies was linked to a change in state after burial from  $E_{GSSG/2GSH}$  to a more oxidized state. MDA levels and oxidized soluble proteins, on the other hand, did not correlate with redox imbalance or viability loss in the cactus seeds under study, indicating that these compounds are not reliable indicators of oxidative stress.

**Keywords:** ageing, cacti seeds, seed banks.



## 1. INTRODUCCIÓN

La persistencia de las semillas se refiere a la sobrevivencia de estas después de alcanzar la madurez en la planta madre (Reed *et al.*, 2011). Una vez que las semillas maduran, pueden persistir *in situ* en bancos en el suelo o *ex situ* en bancos artificiales (Long *et al.*, 2015). Para las plantas espermatofitas, la creación de bancos de semillas en el suelo es una estrategia reproductiva importante que les permite a las poblaciones vegetales resistir condiciones adversas y persistir en el tiempo y en el espacio. Por otro lado, el propósito de los bancos artificiales es almacenar semillas viables en entornos fríos y secos durante el mayor tiempo posible (Hay & Whitehouse, 2017). Si bien las semillas deben mantener su viabilidad para cumplir sus diferentes propósitos, ya sea en condiciones *in situ* o *ex situ*, ésta disminuye progresivamente, aunque a diferentes ritmos según las condiciones de almacenamiento (Hay & Probert, 2013; Nascimento & Meiado, 2017).

El envejecimiento o deterioro de semillas implica la reducción gradual de su viabilidad y vigor durante el almacenamiento (Jyoti & Malik, 2013). La temperatura, la humedad, la concentración de oxígeno (O<sub>2</sub>), la composición genética y el estado de madurez influyen en el tiempo que tardan las semillas en envejecer (Gerna *et al.*, 2022). Las semillas que persisten en un banco en el suelo están expuestas a diversos factores de estrés, tanto bióticos (depredadores y microorganismos patógenos) como abióticos (temperatura, humedad, pH, salinidad), especialmente en suelos cálidos y húmedos, donde las semillas enterradas experimentan ciclos de rehidratación/deshidratación (García *et al.*, 2012).

Las causas del deterioro y posterior muerte de las semillas aún no se comprenden completamente, dado que el envejecimiento es un rasgo biológico complejo y multifactorial que involucra una red de procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos (Zhou *et al.*, 2020). Los mecanismos relacionados con el envejecimiento de las semillas se han asociado con la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) durante el almacenamiento (Kurek *et al.*, 2019). En concentraciones elevadas, las ERO son moléculas altamente reactivas y potencialmente tóxicas, capaces de inducir daño oxidante en los lípidos (peroxidación lipídica), proteínas y ácidos nucleicos. Este proceso resulta en un daño irreversible a nivel celular y, en última instancia, en la muerte del embrión. Este fenómeno se ha documentado indirectamente mediante la medición del daño inducido por ERO en semillas de *Arabidopsis thaliana* (Rajjou *et al.*, 2008) y en diversas especies cultivadas, como avena (*Avena sativa*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), maíz (*Zea mays*), pepino (*Cucumis*

*sativus*), rábano (*Raphanus sativus*) y trigo (*Triticum* sp.) (Xin *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2015; Suresh *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2019; Stegner *et al.*, 2022).

Los cambios en las reacciones de oxidación-reducción (redox) celular, que pueden evaluarse mediante la relación  $E_{GSSG/2GSH}$ , también se han relacionado con el envejecimiento de las semillas (Kranner *et al.*, 2006). El malondialdehído (MDA) es un subproducto generado por la peroxidación lipídica y se utiliza comúnmente como marcador de estrés oxidante, ya que puede evaluarse fácilmente mediante su unión al ácido tiobarbitúrico (TBA), formando el aducto MDA-(TBA)<sub>2</sub>, que tiene un color rojizo y absorbancia máxima a 532 nm (Jadoon & Malik, 2017). No obstante, otros compuestos presentes en las plantas, como los azúcares, pueden reaccionar con el TBA, lo que podría conducir a interpretaciones erróneas (Morales & Munné-Bosch, 2019). El MDA altera la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares, lo que provoca cambios en su estructura y función, así como una mayor fuga de solutos (Riewe *et al.*, 2017). Además, los radicales libres derivados de la oxidación de lípidos también pueden dañar otras biomoléculas y organelos celulares, como las mitocondrias (Roach *et al.*, 2018).

Para contrarrestar el estrés oxidante, las semillas cuentan con antioxidantes enzimáticos, como la superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1), la catalasa (CAT; EC 1.11.1.6), las peroxidasas (POD; EC 1.11.1.7), y antioxidantes no enzimáticos, como el glutatión, el ascorbato, los compuestos fenólicos, los tocoferoles, los tocotrienoles y los tococromanoles (Ratajczak *et al.*, 2015).

La persistencia de las semillas y los mecanismos de deterioro durante el almacenamiento *ex situ* e *in situ* no se conocen bien en *Escontria chiotilla* (F.A.C. Weber ex K. Schum.), *Stenocereus pruinosus* (Otto ex Pfeiff.) Buxbaum y en semillas de cactáceas en general (Guzmán-Hernández, 2018). *Escontria chiotilla* y *S. pruinosus* son cactus columnares endémicos de México (García-Cruz *et al.*, 2013). Ambas especies son ecológicamente importantes debido a que presentan interacción con animales polinizadores y dispersores. Asimismo, producen frutos de interés económico, nutricional y cultural (Arellano & Casas, 2003; Sandate-Flores *et al.*, 2020). Por lo tanto, este trabajo proporciona nuevos conocimientos sobre los cambios fisiológicos y bioquímicos asociados con el deterioro de las semillas de estas especies, almacenadas en condiciones *ex situ* e *in situ* durante diferentes períodos de tiempo.

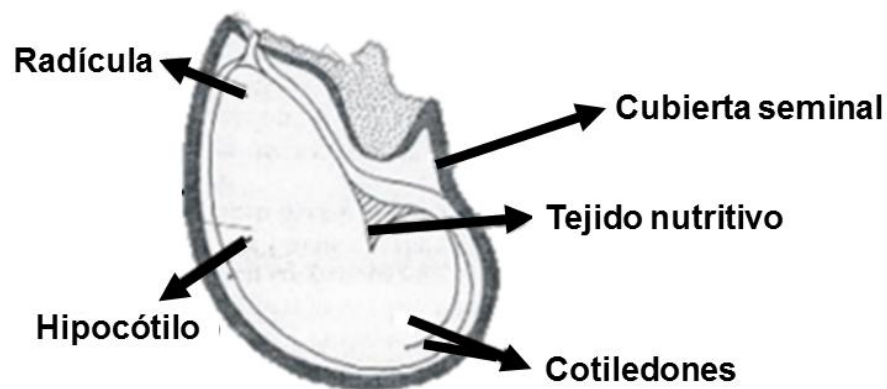
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Semilla

Desde el punto de vista ecológico, una semilla es la estructura reproductiva y de dispersión de las plantas espermatofitas (Fenner y Thompson, 2005). La semilla se origina a partir de un óvulo fecundado, que experimenta una serie de transformaciones hasta alcanzar su madurez (Baskin & Baskin, 2014).

Una semilla típica consta de tres partes: I) una cubierta seminal (compuesta por testa y tegmen), que es producto del desarrollo de los tegumentos internos y externos del rudimento seminal; II) un tejido nutritivo; y III) un embrión (compuesto por radícula, hipocótilo y uno o dos cotiledones) (Fig. 1) (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Cada una de las estructuras de las semillas cumple una función específica. El embrión se desarrollará en una nueva planta. La cubierta seminal protege al esporofito joven (embrión) de patógenos, daño mecánico y desecación, y también puede facilitar una dispersión más eficiente. El tejido nutritivo proporciona una reserva alimenticia (carbohidratos, lípidos y proteínas) al embrión mientras se desarrolla y alcanza su independencia nutricional, lo cual ocurre cuando la radícula penetra en el sustrato (Linkies *et al.*, 2010; Márquez *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Esquema de una semilla típica.

### 2.1.1. Diferencias entre las semillas de gimnospermas y de angiospermas

Las semillas de las espermatofitas se dividen en dos grupos: I) semillas de gimnospermas, cuyo tejido nutritivo proviene principalmente del gametofito femenino, y II) semillas de angiospermas, en las que el tejido nutritivo corresponde al endospermo. Estas diferencias se deben a las variaciones en el desarrollo de las semillas de ambos grupos (Floyd y Friedman, 2000).

En el caso de las gimnospermas, el gametófito femenino está formado por numerosas células, y algunas de ellas, las cercanas al micrópilo, se diferencian para formar gametangios femeninos o arquegonios. En las gimnospermas, la primera etapa del embrión es polinucleada y, posteriormente, se vuelve multicelular. El embrión está rodeado por el tejido haploide del gametófito femenino, que funciona como tejido nutritivo. El tegumento se endurece y se transforma en la testa de la semilla (Friedman y Williams, 2004; Linkies *et al.*, 2010).

En las angiospermas, el gametófito femenino está formado comúnmente por siete células y ocho núcleos; este es conocido como saco embrionario. Las siete células que componen el gametófito tienen una disposición particular: tres de ellas se ubican en el extremo más alejado del micrópilo y reciben el nombre de células antípodas. Una cuarta célula, la de mayor tamaño y binucleada (con dos núcleos polares), se localiza en el centro del saco embrionario y recibe el nombre de célula central. Las tres células restantes se ubican hacia el micrópilo. La ovocélula, también conocida como célula huevo o gameto femenino, es la central, y las dos células que la flanquean son las células sinérgidas (no se forman arquegonios) (Linkies *et al.*, 2010).

En las angiospermas, el polen es recibido en el estigma (a diferencia de las gimnospermas, donde se recibe en el micrópilo). En el estigma, el polen germina y el tubo polínico se alarga hasta alcanzar el micrópilo del óvulo, donde libera dos núcleos gaméticos que llevarán a cabo la doble fecundación. El primer núcleo espermático ( $n$ ) se une a la ovocélula ( $n$ ) para formar el cigoto ( $2n$ ), mientras que el segundo se une a los dos núcleos de la célula central para formar el endospermo ( $3n$ ). Los tegumentos que rodean a la nucela son generalmente dos, lo que lleva a considerar que las angiospermas tienen óvulos bitégmicos, aunque existen excepciones en las que son unitégmicos, lo que se interpreta como una reducción. Estos tegumentos se transforman en la testa de la semilla. Las semillas están rodeadas por

el fruto, el cual resulta de la maduración y transformación del ovario. En contraste, se dice que las semillas de las gimnospermas son desnudas, ya que carecen de una protección adicional como el fruto (Linkies *et al.*, 2010; Márquez *et al.*, 2016).

### **2.1.2. Importancia de las semillas**

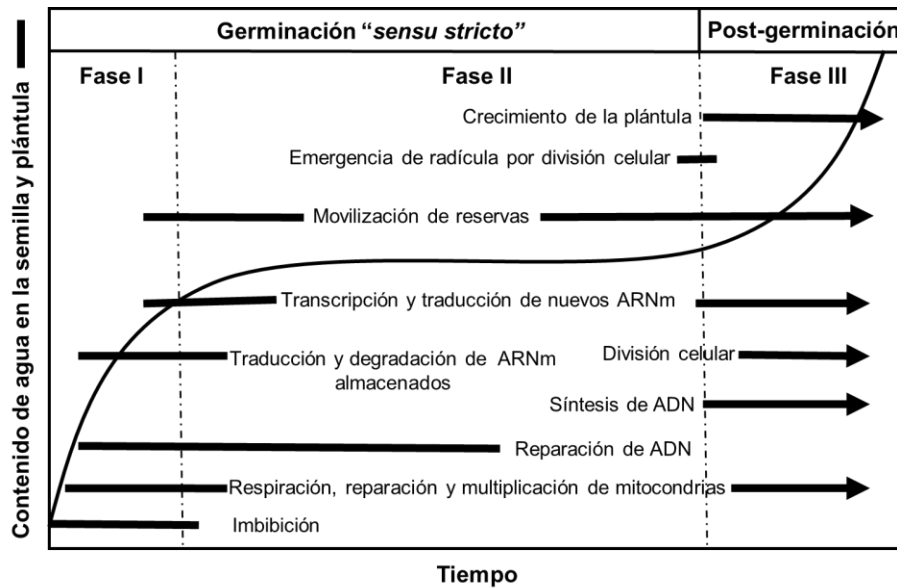
La semilla es una estructura que se origina de la reproducción sexual de las plantas, por lo que contiene la información genética recombinada de sus progenitores (Fenner & Thompson, 2005). Las plantas utilizan las semillas para garantizar su sobrevivencia frente a condiciones ambientales adversas o eventos catastróficos, y son esenciales para la propagación y colonización de nuevos ecosistemas. Además, las semillas son consumidas por diversos animales, como insectos, aves y mamíferos, incluido el ser humano (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

### **2.2. Germinación**

La germinación comienza cuando la semilla absorbe agua (imbibición), lo que desencadena una serie de cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos (Fig. 2). Este proceso concluye una vez que la radícula ha emergido completamente de la testa (Nonogaki *et al.*, 2010). Para que una semilla pueda germinar, es necesario que no presente latencia y que cuente con las condiciones adecuadas de agua, temperatura, luz y O<sub>2</sub> (Leck, 2012). La fase I de imbibición se caracteriza por la rápida absorción de agua por parte de la semilla y la reactivación de su metabolismo. Posteriormente cuando los componentes celulares están completamente hidratados, se alcanza un nivel estable en la absorción de agua (fase II). Finalmente, en la fase III, la imbibición por parte de la semilla aumenta de nuevo; este evento coincide con el término de la germinación "*sensu stricto*" y el inicio de procesos post-germinativos que están involucrados en el crecimiento y desarrollo de la planta (Nonogaki *et al.*, 2010).

### **2.3. Latencia**

En las semillas, la latencia previene la germinación inmediata después de la dispersión. Este estado asegura que la germinación ocurra en un momento adecuado para el crecimiento y la sobrevivencia de la plántula. Además, al no germinar todas las semillas al mismo tiempo, se ha sugerido que se reduciría la competencia por recursos entre ellas (Rojas-Aréchiga & Vázquez-Yanes, 2000; Baskin & Baskin, 2004).



**Figura 2.** Procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que ocurren durante las fases de imbibición de las semillas (tomado y modificado de Nonogaki *et al.*, 2010).

### 2.3.1. Tipos de latencia

Se identifican cinco tipos de latencia en las semillas: I) física, impuesta por una testa dura e impermeable, la cual evita la entrada de agua y de gases necesarios para la germinación; para superar este impedimento, es necesario romper o debilitar la testa mediante escarificación química, mecánica o física. II) fisiológica, regulada por condiciones internas del organismo, como la producción de ácido abscísico (ABA), fitohormona que debe ser degradada antes de que pueda ocurrir la germinación; el cambio en los niveles y/o producción de hormonas vegetales puede ser regulado por los factores ambientales. III) morfológica o innata, causada por la inmadurez del embrión en el momento de la dispersión; para superar esta latencia, basta con un tiempo de postmaduración para que la semilla pueda germinar. IV) morfofisiológica, cuando las semillas presentan simultáneamente latencia morfológica y fisiológica. V) la combinación de latencia física y fisiológica (Baskin & Baskin, 2004).

### 2.4. Viabilidad

La viabilidad es la capacidad de un conjunto de semillas no latentes de germinar (Roberts, 2012). Existen varios métodos para determinar la viabilidad, entre los cuales se destacan

la prueba de germinación y la prueba de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (CTT) (ISTA, 2020).

La prueba de CTT se basa en la actividad de las deshidrogenasas. Estas enzimas participan en las reacciones de respiración que ocurren en las mitocondrias. Los hidrógenos liberados por las deshidrogenasas reducen la sal de tetrazolio, generando un color rojo, conocido como formazán, que indica los tejidos vivos de la semilla (França-Neto & Krzyzanowski, 2019).

## **2.5. Vigor**

El vigor es un conjunto de características fisiológicas que determinan el desarrollo favorable de un lote de semillas (McDonald, 1993). Existen diversas técnicas para evaluar el vigor, como el análisis del porcentaje y velocidad de germinación, así como la medición de la conductividad eléctrica de las semillas, que estima indirectamente el estado de integridad de la membrana celular. Además, una vez que las semillas han germinado se puede evaluar la sobrevivencia y el desarrollo normal de las plántulas (Marcos-Filho, 2015).

## **2.6. Longevidad**

La longevidad es el período de tiempo durante el cual vive una semilla, ya sea dentro de su entorno natural (*in situ*) o fuera de él (*ex situ*) (Vázquez-Yanes *et al.*, 1993).

### **2.6.1. Longevidad ecológica**

La longevidad ecológica es el tiempo durante el cual las semillas persisten viables en un ambiente natural. Este período varía dependiendo de la especie e incluso del individuo (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

Long *et al.* (2015) señalan que factores como la historia de vida de la planta madre, los agentes dispersores y el estrés abiótico y biótico que enfrenta la semilla en el suelo determinan su persistencia en condiciones *in situ*.

### **2.6.2 Longevidad potencial**

El periodo durante el cual las semillas permanecen vivas en ambientes controlados de temperatura y humedad se denomina longevidad potencial. Las semillas almacenadas *ex*

*situ* están protegidas de cambios climáticos y depredadores, por lo que tienen una vida más larga que aquellas que se almacenan de forma natural en el suelo de un ecosistema (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

## **2.7. Banco de semillas en el suelo**

Un banco de semillas en el suelo se define como un almacén natural de semillas viables en el estrato superior del suelo de un hábitat específico. Dichos bancos son relevantes en la dinámica poblacional de las especies vegetales, ya que son responsables de la regeneración natural de los ecosistemas (Thompson & Grime, 1979; Roberts, 1981). Además, son esenciales para restaurar regiones que han experimentado perturbaciones, ya sea provocadas por el ser humano (como la remoción de la cobertura vegetal) o naturales (e.g., incendios y huracanes) (Middleton, 2003; Nascimento & Meiado, 2017).

Según Bakker *et al.* (1996), es imprescindible estudiar la composición del banco de semillas en el suelo antes de llevar a cabo cualquier programa de restauración en un sitio de interés. Esto requiere evaluar características del banco, como la diversidad y la densidad de semillas. De esta manera, se puede inferir la composición florística con la que se recuperará el sitio, lo cual ayuda a mitigar el riesgo de que especies invasoras alteren la composición vegetal original al desplazar a las especies nativas. Este enfoque busca lograr la conservación integral del ecosistema (Sánchez-Salas *et al.*, 2015).

### **2.7.1. Clasificación de los bancos de semillas en el suelo**

De acuerdo con su longevidad ecológica, las semillas son capaces de formar bancos de tipo transitorio o persistente (Thompson & Grime, 1979; Walck *et al.*, 2005). En un banco transitorio, las semillas germinan o mueren en menos de un año. Por su parte, las semillas que forman bancos persistentes sobreviven durante un año o más. Los bancos de tipo persistente se dividen en dos categorías: I) a corto plazo, las semillas se mantienen vivas durante un periodo de uno a cinco años; y II) a largo plazo, en los que las semillas sobreviven por tiempos prolongados (> 5 años) (Thompson, 2000).



## **2.8. Dinámica del banco de semillas en el suelo**

### **2.8.1. Entrada**

Los bancos que se forman naturalmente en el suelo de un ecosistema experimentan un flujo constante, ya que reciben una entrada de semillas que se distribuyen de manera heterogénea, tanto temporal como espacialmente (Montiel & Montaña, 2003). Estas semillas provienen principalmente de plantas cercanas, aunque también pueden ser transportadas por viento, agua y animales desde plantas distantes. Esta diversidad en las fuentes de dispersión conlleva a variaciones significativas en la densidad de semillas entre los diferentes microhábitats (Cano-Salgado *et al.*, 2012).

### **2.8.2. Persistencia**

La capacidad de las plantas para formar un banco de semillas en el suelo está determinada por la longevidad ecológica, la cual es independiente de la cantidad y distribución de las semillas (Alvarez-Espino *et al.*, 2014). Como se ha señalado anteriormente, los factores bióticos y las características inherentes tanto a las especies como a los individuos determinan la vida máxima de una semilla en el suelo (Roberts, 1973; Leck, 2012). Además, las perturbaciones en la superficie del suelo causadas por factores abióticos pueden provocar la pérdida de semillas en el banco (Baskin & Baskin, 2014). Por ejemplo, en ambientes áridos y semiáridos, las fuertes precipitaciones pueden desencadenar la erosión del suelo, lo que ocasiona una disminución en el número de semillas debido al arrastre (Sotomayor & Gutiérrez, 2015).

Cabe destacar que las semillas requieren de características específicas que favorecen la formación de semillas en el suelo (Bowers, 2000). Entre estas características se incluye la dependencia de la luz para la germinación; un tamaño entre 1 y 10 mm, y la presencia de latencia (Rojas-Aréchiga & Batis, 2001).

La latencia es un componente clave que garantiza la sobrevivencia de las semillas en el banco de semillas (Thompson, 2000). No obstante, este estado de reposo tiene una función limitada en la persistencia de las semillas; ya que solo regula el momento en que se puede iniciar o inhibir la germinación, en función de las señales internas o ambientales (Thompson, 2000). Por lo tanto, la mayoría de las especies sobreviven en el suelo como semillas no latentes (Fenner & Thompson, 2005).

Existen diferentes métodos para evaluar la persistencia *in situ* de las semillas, entre los cuales se incluyen: I) determinar la edad mediante el uso de Carbono 14 ( $^{14}\text{C}$ ); II) enterrar semillas (bancos semi naturales), seguidas de su exhumación y pruebas de viabilidad; III) comparar los cambios estacionales entre la dispersión de semillas y los factores que determinan la composición del banco; y IV) estudiar como la composición y la viabilidad de las semillas cambian a medida que evoluciona una comunidad vegetal en un área específica (Saatkamp *et al.*, 2009).

### **2.8.3. Salida**

La salida de semillas del banco puede ser provocada por diversos factores. Es importante destacar que solo una pequeña proporción de las semillas que germinan logran establecerse y convertirse en plantas adultas (Leck, 2012). Además, es posible que la germinación ocurra a una profundidad considerable, lo que puede resultar en la muerte de la semilla debido a la escasez de reservas para su emergencia, un fenómeno conocido como germinación letal (Thompson, 2000).

Las semillas de tamaño grande (> 10 mm) que se almacenan en el estrato superior del suelo tienen más probabilidades de ser consumidas, lo que conduce a una mayor tasa de mortalidad debido a animales como ratones, ardillas, aves, entre otros. En contraste, las semillas de tamaño pequeño tienden a enterrarse con mayor facilidad y enfrentan menores riesgos de depredación, aunque también pueden ser consumidas por otros animales que habitan en el suelo, como gusanos e insectos (Thompson, 2000; Leck, 2012). Además, los microorganismos presentes en el suelo pueden contribuir la pérdida de semillas, por ejemplo, algunas especies de bacterias y hongos pueden liberar toxinas y enzimas como celulasas, proteasas y nucleasas, que dañan irreversiblemente la estructura de las semillas, provocando su muerte (Chee-Sanford *et al.*, 2006). La testa, por otro lado, protege al embrión contra organismos patógenos, ya que contiene compuestos antifúngicos y antimicrobianos, como fenoles, flavonoides, fitoalexinas y taninos (Baskin & Baskin, 2014; Zhou *et al.*, 2020). No obstante, el factor principal de mortalidad de las semillas es la edad (Munné-Bosch *et al.*, 2011).

### **2.9. Clasificación de las semillas**

Las semillas responden de diversas maneras a las condiciones de almacenamiento (Hong & Ellis, 1996). En función a su comportamiento durante el almacenamiento y su tolerancia

a la desecación, las semillas se clasifican en ortodoxas, recalcitrantes e intermedias (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

### **2.9.1. Semillas ortodoxas**

Las semillas ortodoxas tienen la capacidad de mantener un alto vigor y viabilidad incluso después de ser desecadas a bajos contenidos de humedad, entre el 5 y el 10 % (0.03-0.07 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> de peso seco (PS)). Además, su longevidad aumenta conforme se reduce la temperatura de almacenamiento (hasta -10° C) (Roberts, 1973; Ellis & Roberts, 1981; Kurek *et al.*, 2019).

Este tipo de semillas adquieren tolerancia a la desecación durante su proceso de desarrollo y maduración en la planta madre (Berjak *et al.*, 2007). A nivel molecular, se ha observado que esta tolerancia se debe a la reducción del metabolismo y al fortalecimiento de un sistema antioxidante extenso (Berjak & Pammenter, 2013; Ratajczak *et al.*, 2019). Durante la última etapa de maduración, justo antes del desprendimiento de la planta madre, la semilla alcanza su máxima capacidad de germinación y tolerancia a la desecación, y su potencial de almacenamiento también es óptimo (Hong & Ellis, 1992). Por lo tanto, se recomienda cosechar las semillas durante el período de dispersión natural, ya que la viabilidad de las semillas empieza a disminuir a partir de ese momento (Way, 2003).

Hong *et al.* (1998) informan que, dentro del grupo de plantas con semilla, el 88 % de las especies presentan semillas ortodoxas, las cuales predominan en las especies que habitan en ambientes áridos, como desiertos y zonas mediterráneas (Roberts & King, 1980).

### **2.9.2. Semillas recalcitrantes**

Las semillas recalcitrantes solo pueden desecarse dentro de un rango de humedad que va del 15 al 30 % (0.2–0.3 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> PS), pero si se deshidratan por debajo de esos niveles, su viabilidad disminuye rápidamente (Roberts, 1973; Kurek *et al.*, 2019).

Este tipo de semillas no se deshidratan en la planta madre y, una vez dispersadas, germinarán si las condiciones ambientales son favorables; de lo contrario, morirán. Las semillas recalcitrantes, a diferencia de las ortodoxas, se diseminan en un estado húmedo y metabólicamente activo y pierden rápidamente su viabilidad en condiciones de baja humedad. Debido a sus características fisiológicas y bioquímicas, las semillas recalcitrantes

no se pueden conservar durante períodos prolongados (Leprince *et al.*, 1993). Por lo tanto, las semillas recalcitrantes se encuentran comúnmente en especies de hábitats cálidos y húmedos, donde las fluctuaciones ambientales son mínimas (Roberts & King 1980).

### **2.9.3. Semillas intermedias**

Las semillas intermedias pueden deshidratarse hasta alcanzar contenidos de agua similares a los de las semillas ortodoxas (Ellis *et al.*, 1990). No obstante, el almacenamiento a temperaturas bajas (< 0 °C) afecta negativamente su viabilidad, provocando una rápida disminución de esta (Hong & Ellis, 1996). Las semillas intermedias se encuentran en ambientes tanto secos como húmedos (Hong *et al.*, 1998).

## **2.10. Familia Cactaceae**

Las cactáceas se originaron en el continente americano aproximadamente hace 80 millones de años (Anderson, 2001). Actualmente, esta familia agrupa alrededor de 1,800 especies (Campos-Díaz *et al.*, 2020), que se distribuyen en toda América (Bravo-Hollis & Scheinvar, 1999). No obstante, México concentra la mayor riqueza, con 68 géneros y 669 especies, de las cuales 518 son endémicas (Guzmán *et al.*, 2007).

En México, las cactáceas se encuentran en varias regiones, incluyendo los ecosistemas áridos y semiáridos del país, las selvas bajas caducifolias y la zona de depresión del Balsas (Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1978). No obstante, es en los ambientes secos y calurosos donde se encuentra el mayor número de especies; por ejemplo, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, se considera una región significativa para el desarrollo y la diversificación de plantas desérticas. Este sitio alberga una gran diversidad de cactáceas, con 86 especies, pertenecientes a 28 géneros, de las cuales 25 % son endémicas (Miguel-Talonia *et al.*, 2014).

### **2.10.1. Importancia de la familia Cactaceae en México**

Las cactáceas han tenido una gran importancia para los pueblos indígenas desde tiempos prehispánicos (Jiménez-Sierra, 2011). Estas plantas han sido aprovechadas por sus diversos usos, que incluyen la alimentación, la medicina, prácticas religiosas, ornamentación, como cercas vivas y en la obtención de colorantes (Sánchez-Mejorada,

1982; Pimienta-Barrios, 1994; Basurtos *et al.*, 2006; Flores & Macías, 2008; Pimienta-Barrios *et al.*, 2008, Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2012).

Además, las cactáceas brindan diversos servicios ecosistémicos, como el control de la erosión del suelo, y proporcionan refugio, hábitat y alimento (frutos, néctar, polen) a pequeños mamíferos, como roedores y murciélagos, así como a aves, reptiles e insectos (Arizmendi & de los Monteros, 1996; Valiente-Banuet, 2002; Muñoz-Romo & Casart-Quintero, 2005; Ortega-Baes & Godínez-Alvarez, 2006; Maya *et al.*, 2011; Martínez-Peralta & Mandujano, 2012; Lara-Reséndiz *et al.*, 2013).

### **2.10.2. Problemas de conservación en la familia Cactaceae en México**

Un elevado número de especies de cactáceas enfrentan problemas de conservación debido a las actividades humanas. Los cambios de uso del suelo, el pastoreo, el saqueo de ejemplares de su hábitat natural y su venta como plantas ornamentales a compradores nacionales y extranjeros son algunos de los factores que contribuyen a su declive (Jiménez-Sierra, 2011). Además, las características biológicas de los cactus los convierten en un grupo extremadamente vulnerable (Álvarez *et al.*, 2004). Entre estas características se incluyen los bajos índices de sobrevivencia de semillas y plántulas, los lentos índices de crecimiento y reclutamiento individual, las limitadas zonas de distribución y las condiciones edáficas particulares requeridas para su desarrollo. Por ello, resulta difícil que sus poblaciones autóctonas se recuperen (Hernández & Godínez, 1994; Valverde & Zavala-Hurtado, 2006).

A nivel nacional e internacional, la familia Cactaceae está catalogada como amenazada. De las 669 especies de cactáceas que hábitat en México, 269 se encuentran listadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010), 65 figuran en el Libro Rojo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, 2021), y 41 están incluidas en el Apéndice I (especies en peligro) de la Convención sobre el Comercio de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2021) (especies que no están en riesgo de extinción, pero que podrían llegar a estarlo si no se regula su comercio). Según la NOM-059-SEMARNAT-2010, en la Tabla 1 se enlistan los 269 taxa (especies y subespecies) de cactáceas mexicanas clasificadas como vulnerables. Estos taxones se agrupan en 44 de los 68 géneros (64 %) que se distribuyen en el país.

**Tabla 1.** Especies y subespecies de cactáceas que se distribuyen en México y que, de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010, presentan problemas de conservación (DOF, 2010). Clasificadas en las categorías de amenazadas (A), Sujetas a protección especial (Pr), y en peligro de extinción (P).

<b>Género</b>	<b>Especies y subespecies en México</b>	<b>En riesgo</b>	<b>Categoría de riesgo</b>	<b>Distribución de las especies y subespecies en riesgo</b>
<i>Acanthocereus</i>	6	4	Pr (4)	Endémica (4)
<i>Acharagma</i>	4	2	Pr (2)	Endémica (2)
<i>Aporocactus</i>	2	1	P	Endémica
<i>Ariocarpus</i>	12	7	A (1); Pr (3); P (3)	Endémica (7)
<i>Astrophytum</i>	4	4	A (3); P (1)	Endémica (4)
<i>Aztekium</i>	2	2	A (1); Pr (1)	Endémica (1), No endémica (1)
<i>Backebergia</i>	1	1	Pr	Endémica
<i>Carnegiea</i>	1	1	A	No endémica
<i>Cephalocereus</i>	5	2	A (1); Pr (1)	Endémica (2)
<i>Cochemiea</i>	6	4	Pr (4)	Endémica (4)
<i>Coryphantha</i>	65	18	A (7); Pr (9), P (2)	Endémica (16), No endémica (2)
<i>Cumarinia</i>	1	1	Pr	Endémica
<i>Cylindropuntia</i>	47	3	A (1); Pr (2)	Endémica (3)
<i>Digitostigma</i>	1	1	P	Endémica
<i>Disocactus</i>	6	2	A (1); Pr (1)	Endémica (2)
<i>Echinocactus</i>	7	3	A (1); Pr (1), P (1)	Endémica (3)
<i>Echinocereus</i>	110	18	A (5); Pr (10), P (3)	Endémica (16), No endémica (2)
<i>Echinomastus</i>	14	7	A (4); Pr (2), P (1)	Endémica (3), No endémica (4)
<i>Epithelantha</i>	7	2	A (1); Pr (1)	No endémica (2)
<i>Escobaria</i>	18	3	A (1); Pr (2)	Endémica (3)
<i>Ferocactus</i>	29	10	A (4); Pr (5); P (1)	Endémica (7), No endémica (3)

**Tabla 1.** Continuación.

<b>Género</b>	<b>Especies y subespecies en México</b>	<b>En riesgo</b>	<b>Categoría de riesgo</b>	<b>Distribución de las especies y subespecies en riesgo</b>
<i>Geohintonia</i>	1	1	Pr	Endémica
<i>Glandulicactus</i>	4	2	A (2)	Endémica (2)
<i>Leuchtenbergia</i>	1	1	A	Endémica
<i>Lophocereus</i>	2	1	Pr	No endémica
<i>Lophophora</i>	4	2	Pr (1), P (1)	Endémica (2)
<i>Mammillaria</i>	223	109	A (24); Pr (72), P (13)	Endémica (109)
<i>Melocactus</i>	3	2	A (1); P (1)	Endémica (1), No endémica (1)
<i>Morangaya</i>	1	1	Pr	Endémica
<i>Obregonia</i>	1	1	A	Endémica
<i>Opuntia</i>	93	3	Pr (3)	Endémica (2), No endémica (1)
<i>Ortegocactus</i>	1	1	A	Endémica
<i>Pelecyphora</i>	2	2	A (1); Pr (1)	Endémica (2)
<i>Peniocereus</i>	21	4	Pr (4)	Endémica (3), No endémica (1)
<i>Pilosocereus</i>	8	1	Pr	Endémica
<i>Pseudomitrocereus</i>	1	1	Pr	Endémica
<i>Pterocereus</i>	1	1	P	Endémica
<i>Rapicactus</i>	3	3	A (1); Pr (2)	Endémica
<i>Selenicereus</i>	14	3	A (2); Pr (1)	Endémica (3)
<i>Stenocactus</i>	18	2	Pr (2)	Endémica (2)
<i>Stenocereus</i>	24	3	A (1); Pr (2)	Endémica (3)
<i>Strombocactus</i>	3	1	A	Endémica
<i>Thelocactus</i>	18	9	A (6); Pr (3)	Endémica (9)
<i>Turbinicarpus</i>	28	19	A (5); Pr (7), P (7)	Endémica (18), No endémica (1)

### 2.10.3. Estrategias de conservación en la familia Cactaceae en México

En México, diversos sectores, incluidos los ámbitos académico, privado y gubernamental, han colaborado desde la década de 1940 en la protección y conservación de las cactáceas, tanto dentro de su hábitat natural como fuera de él (Aguirre & Montaña, 1997; Arias *et al.*, 2005; Bárcenas, 2006).

Algunas de las estrategias de conservación propuestas para las cactáceas mexicanas incluyen la conservación de semillas, la propagación de plantas en viveros e *in vitro* para su posterior reintroducción en sus hábitats naturales, la promoción del comercio legal, la creación de zonas de exclusión y la implementación de campañas de educación ambiental. Estas campañas tienen como objetivo sensibilizar a los habitantes sobre la importancia de los cactus en los ecosistemas y fomentar su uso sustentable (de la Rosa *et al.*, 2012). No obstante, para la gran parte de las especies amenazadas, estas medidas no se han implementado o no se han realizado de forma correcta, principalmente debido a los problemas burocráticos y de corrupción que existen en el país (Bárcenas, 2006).

El saqueo y la destrucción del hábitat de las cactáceas siguen siendo problemas persistentes que no se han logrado contener, a pesar de las disposiciones legales que buscan proteger y aprovechar de manera sostenible las plantas silvestres nativas (Arias *et al.*, 2005; Rodríguez-Arévalo *et al.*, 2017).

Es fundamental llevar a cabo acciones que detengan o al menos reduzcan el deterioro de las poblaciones de cactáceas mexicanas, ya que, de lo contrario, muchas especies podrían extinguirse en un corto período tiempo. Ante este posible escenario, es crucial contar con semillas almacenadas en bancos de germoplasma, que permitan resguardar el material genético y el desarrollo de nuevos individuos. Estas plantas podrían ser aprovechadas tanto con fines ecológicos como económicos (Li & Pritchard, 2009). No obstante, las semillas de numerosas especies de cactus aún no se encuentran almacenadas en bancos artificiales, y la información sobre la ecofisiología de las semillas es limitada (Castillo-Campohermoso *et al.*, 2010; Lindow-López *et al.*, 2018).

Assis *et al.* (2011) señalan que tanto los bancos de semillas artificiales como los naturales han demostrado ser efectivos para mantener y regenerar las poblaciones vegetales. El estudio de estos bancos es crucial para desarrollar estrategias de conservación efectivas.



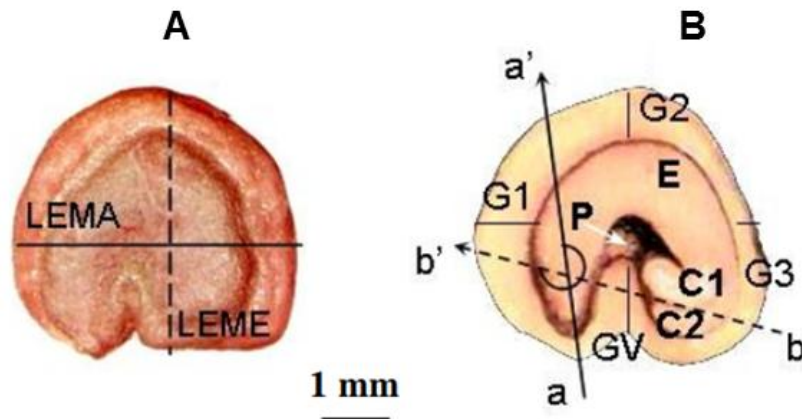
No obstante, en el caso específico de las cactáceas mexicanas, los estudios sobre bancos de semillas han sido escasos en los últimos años. Además, aún no se comprenden completamente los mecanismos involucrados en el envejecimiento de las semillas almacenadas, ya sea de forma artificial o natural (Roach *et al.*, 2018).

### **2.11. Semillas de cactáceas**

Las cactáceas son plantas dicotiledóneas y sus semillas presentan una amplia variedad de características morfológicas. En general, son pequeñas en tamaño, con dimensiones medidas en milímetros. La cubierta seminal puede variar en color, incluyendo tonos castaños, anaranjado, cafés y negros. Además, pueden tener formas comprimidas o globulosas, circulares, reniformes, elípticas, ovadas y angulosas (Fig. 3) (Barrios *et al.*, 2020).

Un rasgo distintivo en las semillas de las cactáceas, aunque no exclusivo de la familia, es una pequeña zona llamada región hilum-micropilar, que se debe a la presencia de óvulos campilotropos (Barthlott & Hunt 1993). El hilo, que es el punto de unión entre la semilla y el fruto, puede estar ubicado basal o lateralmente, y variar en tamaño. La cubierta seminal puede tener diferentes texturas, como ósea, lisa, reticulada o rugosa. El perispermo puede ser abundante, central o localizado hacia un lado de la semilla, y puede tener una textura farinácea y un color blanquecino, con gránulos de almidón. El endospermo no está presente en gran parte de los casos, pero puede ser persistente como una capa delgada. En cuanto al embrión, puede presentar diferentes formas, como recto, curvo, circular, o periférico, con el hipocótilo bien desarrollado. Está provisto de cotiledones, que pueden ser carnosos o foliáceos, y a veces el ápice del embrión tiene forma de gancho (Barrios *et al.*, 2020). La radícula, que es la primera parte del embrión que emerge durante la germinación, es gruesa e inferior (Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1978).

Rojas-Aréchiga & Vázquez-Yanes (2000) reportan que el número de semillas que puede contener cada fruto es variable entre especies y dentro de individuos de la misma especie. Algunas cactáceas, como *Epithelantha micromeris* y *Pereskia aculeata*, pueden producir solo unas pocas semillas por fruto, mientras que otras, como *Pilosocereus chrysacanthus*, pueden producir más de 1000 semillas por fruto (Barrios *et al.*, 2020).



**Figura 3.** Esquema de una semilla típica de cactáceas. A. Dimensiones medidas en la semilla intacta; B. Semilla limada en plano mediano. LEMA = Longitud del eje mayor; LEME = Longitud del eje menor; G1, G2 y G3 = Puntos de medición para el cálculo del grosor de la cubierta funicular dorsal (GD); GV = Grosor de la cubierta funicular ventral; E = Embrión; P = Perispermo; C1 y C2 = Cotiledones; a-a' = Eje hipocótilo radicular; b-b' = Eje de los cotiledones (Tomado y modificado de Guerrero-Muñoz *et al.*, 2006).

### 2.12. Germinación de las semillas de cactáceas

En semillas de cactus, diversas investigaciones han reportado que la humedad, temperatura y luz son elementos clave que regulan el proceso de germinación (Rojas-Aréchiga *et al.*, 1997; Rojas-Aréchiga *et al.*, 1998; Benítez-Rodríguez *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2006). Estos trabajos indican que las semillas germinan de manera óptima a temperaturas entre 25 y 30 °C. Asimismo, se ha descubierto que son fotoblásticas positivas, es decir, que necesitan luz para germinar, respuesta que se desencadena por los fotorreceptores en la semilla, principalmente por los fitocromos (Flores *et al.*, 2006; Baskin & Baskin, 2014).

### 2.13. Latencia en las semillas de cactáceas

En semillas de cactus, la latencia es un fenómeno que ha sido investigado desde inicios del siglo XX (Alcorn & Krutz, 1959; McDonough, 1964). Actualmente, se sabe que estas pueden presentar diferentes tipos de latencia. Por ejemplo, se ha documentado latencia física en especies como *Cereus jamacaru* (Meiado *et al.*, 2010), latencia morfológica en *Stenocereus*

*stellatus* (Álvarez-Espino *et al.*, 2014), y fisiológica en *Ferocatus peninsulae* (Rojas-Aréchiga & García-Morales, 2022).

#### **2.14. Almacenamiento de las semillas de cactáceas en condiciones *ex situ***

Diversos autores han reportado el tiempo durante el cual las semillas de cactus son capaces de persistir bajo diferentes condiciones y tiempos de almacenamiento *ex situ*. En el contexto de las cactáceas mexicanas, este tema también ha sido investigado. No obstante, estas especies representan menos del 2 % del total de especies distribuidas en el país (Tabla 2).

Estos estudios sugieren que las semillas de cactáceas son ortodoxas, lo que significa que pueden persistir viables durante varios años cuando se desecan (Rojas-Aréchiga & Vázquez-Yanes, 2000). No obstante, cabe destacar que, dada la amplia variedad de formas, tamaños y estructuras que presentan las semillas, estas pueden responder de manera diferente a los efectos del tiempo y las condiciones de almacenamiento cuando se conservan en bancos de semillas artificiales (Assis *et al.*, 2011). Además, hasta el momento no se han realizado evaluaciones exhaustivas de los mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos asociados con el envejecimiento y la muerte de las semillas durante el almacenamiento. La falta de información es un obstáculo para determinar las condiciones óptimas de almacenamiento y, por ende, para proponer programas exitosos de conservación *ex situ* a largo plazo.

**Tabla 2.** Viabilidad de las semillas de diferentes especies de cactáceas almacenadas *ex situ* durante diferentes períodos de tiempo.

Especies	Almacenamiento		Viabilidad	Referencia
	Condiciones	Tiempo (años)		
<i>Carnegiea gigantea</i> **	25 ± 3 °C en seco	10	51 %	Alcorn & Martin (1974)
<i>Oreocereus erectocylindrica</i>	Entre 15 - 30 °C	3	80 %	Zimmer & Schultz (1975)
<i>Eulychnia castanea</i>			70 %	
<i>Neoporteria subgibbosa</i>		4		
<i>Ferocactus sp*</i>			50 %	
<i>Echinocereus sp*</i>				Fearn (1977)
<i>Coryphantha odorata</i> **		7	100 %	
<i>Ferocactus herrerae*</i>	No reportado	10	80 %	
<i>Ferocactus emoryi*</i>		10	90 %	del Castillo (1986) Trejo & Garza (1993) Bowers (2000) Rojas-Aréchiga <i>et al.</i> (2001) de la Barrera & Nobel (2003)
<i>Brasilicactus sp</i>		3	0 %	
<i>Ferocactus histrix</i> **		2	90 %	
<i>Mammillaria heyderi*</i>		3	65 %	
<i>Ferocactus wislizeni</i>		2	50 %	
<i>Stenocereus stellatus*</i>		3	80 %	
<i>Stenocereus queretaroensis*</i>	25 °C oscuridad	3	60 %	
<i>Turbincarpus knuthianus*</i>			70 %	
<i>Turbincarpus lophophoroides</i> **			10 %	
<i>Turbincarpus pseudopectinatus</i> **	No reportado	2		
<i>Turbincarpus swoboda</i> **			60 %	
<i>Turbincarpus valdezianus</i> **			90 %	

\*Especies que habitan en México. \*\*Especies vulnerables según la NOM-059-SEMARNAT-2010.

**Tabla 2.** Continuación.

Especies	Almacenamiento		Viabilidad	Referencia
	Condiciones	Tiempo (años)		
<i>Mammillaria mystax</i> *	Entre 4-6 °C	3	55 %	Navarro <i>et al.</i> (2010)
<i>Echinocactus platyacanthus</i> **	No reportado	6	61 %	del Carmen-Navarro <i>et al.</i> (2013)
<i>Ferocactus townsendianus</i> **	25 °C	10	45 %	Guillen <i>et al.</i> (2014)
<i>Cereus albicaulis</i>			50 %	
<i>Cereus fernambucensis</i> spp. <i>Fernambucensis</i>			30 %	
<i>Cereus jamacaru</i> spp. <i>jamacaru</i>			50 %	
<i>Pilosocereus chrysostele</i>	7 ± 2 °C	2	10 %	Nascimento <i>et al.</i> (2015)
<i>Pilosocereus gounellei</i> spp. <i>gounellei</i>			25 %	
<i>Pilosocereus pachycladus</i> spp. <i>pachycladus</i>			85 %	
<i>Pilosocereus pachycladus</i> spp. <i>pernambucoensis</i>			85 %	
<i>Pilosocereus Tuberculatus</i>			85 %	
<i>Escontria chiotilla</i> *	25 ± 5 °C, en seco y oscuridad	8	85 %	Guzmán-Hernández (2018)
<i>Stenocereus pruinosus</i> *			60 %	
<i>Cereus fernambucensis</i> spp. <i>Fernambucensis</i>			60 %	
<i>Pilosocereus catiingicola</i> spp. <i>salvadorensis</i>			70 %	
<i>Pilosocereus gounellei</i> spp. <i>gounellei</i>		1	40 %	dos Santos <i>et al.</i> (2018)
<i>Melocactus violaceus</i> spp. <i>margaritaceus</i>	-5°C		80 %	
<i>Melocactus sergipensis</i>			58 %	
<i>Melocactus zehntneri</i>			80 %	
<i>Lophophora williamsii</i>	20 ± 2 °C	9	12.5 %	Mandujano <i>et al.</i> (2020)

\*Especies que habitan en México. \*\*Especies vulnerables según la NOM-059-SEMARNAT-2010.

**Tabla 2.** Continuación.

Especies	Almacenamiento		Viabilidad	Referencia
	Condiciones	Tiempo (años)		
<i>Acanthocalycium spiniflorum</i>			0 %	
<i>Cleistocactus baumannii</i>			0 %	
<i>Echinopsis aurea</i>			0 %	
<i>Echinopsis. leucantha</i>			38 %	
<i>Gymnocalycium capillense</i>			0 %	
<i>Gymnocalycium castellanosii</i>			0 %	
<i>Gymnocalycium mostii</i>	20 °C	7	0 %	Gurvich <i>et al.</i> (2021)
<i>Gymnocalycium schickendantzii</i>			1 %	
<i>Gymnocalycium stellatum</i>			0 %	
<i>Harrisia pomanensis</i>			1 %	
<i>Parodia submammulosa</i>			0 %	
<i>Stetsonia coryne</i>			0 %	
<i>Trichocereus candicans</i>			0 %	

**\*Especies que habitan en México. \*\*Especies vulnerables según la NOM-059-SEMARNAT-2010.**

### **2.15. Bancos de semillas de cactáceas en el suelo**

La persistencia de semillas de cactáceas en el suelo ha sido poco estudiada. En las especies mexicanas, estos trabajos representan menos del 1 % del total de especies que se distribuyen en el país (Tabla 3). Esta situación contrasta con la importancia ecológica de estas plantas en ambientes áridos y semiáridos, donde suelen ser dominantes y presentan un elevado número de endemismos (Bravo-Hollis & Scheinvar, 1999). Entender la dinámica poblacional de las cactáceas en hábitats naturales se ve significativamente obstaculizada por la falta de conocimientos en este tema.

Aun con la escasa información disponible, en las últimas décadas se ha revelado la capacidad de las semillas de cactus para formar bancos a corto y largo plazo (Tabla 3). No obstante, a pesar de los avances en esta área, sigue siendo necesario obtener más información para comprender mejor los patrones de reclutamiento y la composición de las comunidades en los hábitats desérticos. Por lo tanto, se requieren más investigaciones que contribuyan a entender la dinámica espacial y temporal de los bancos de semillas de la familia Cactaceae. Además, es fundamental profundizar en los factores, tanto ecológicos como fisiológicos, bioquímicos y moleculares, que influyen en la sobrevivencia de las semillas enterradas *in situ*.

**Tabla 3.** Trabajos que han documentado la formación de diferentes tipos de bancos de semillas en el suelo en diversas especies de cactáceas

Especie	Tipo de banco que forman las semillas	Referencia
<i>Trichocereus pasacana</i>		de Viana (1999)
<i>Ferocactus wislizenii</i> *	Persistente a corto plazo	Bowers (2000)
<i>Opuntia rastrera</i> *		Montiel & Montaña (2003)
<i>Mammillaria grahami</i> *	Persistente a largo plazo	Bowers (2005)
<i>Polaskia chende</i> *		Ordoñez (2008)
<i>Arthrocereus glaziovii</i>		
<i>Arthrocereus melanurus</i>	Persistente a corto plazo	Cheib & García (2012)
<i>Harrisia fragrans</i>		Goodman <i>et al.</i> (2012)
<i>Stenocereus stellatus</i> *		Álvarez-Espino <i>et al.</i> (2014)
<i>Discocactus bahiensis</i>		Nascimento & Meiado (2017)
<i>Polaskia chende</i> *	Persistente a largo plazo	Ordoñez-Salanueva <i>et al.</i> (2017)
<i>Escontria chiotilla</i> *		Guzmán-Hernández (2018)
<i>Stenocereus pruinosus</i> *		
<i>Echinopsis atacamensis</i>		
<i>Echinopsis terschecki</i>	Persistente a corto plazo	
<i>Echinopsis thionantha</i>		Lindow-López <i>et al.</i> , 2018
<i>Gymnocalycium saglionis</i>		
<i>Gymnocalycium schickendantzii</i>		
<i>Gymnocalycium spegazzinii</i>		

\*Especies que habitan en México. \*\*Especie vulnerables según la NOM-059-SEMARNAT-2010.



## **2.16. Especies reactivas de oxígeno (ERO)**

Las ERO son radicales libres, iones y moléculas que presentan uno o más electrones desapareados, y que derivan de la reducción parcial del  $O_2$ . Este grupo incluye al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), al radical superóxido ( $O_2^\bullet$ ), al radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ) y al oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) (Diaz-Vivancos *et al.*, 2013).

En las plantas, las ERO se generan de manera natural en distintos organelos, el sistema de membranas, así como en el citosol, a partir de diversas reacciones metabólicas que incluyen la fotosíntesis y la respiración (Singh *et al.*, 2016).

En condiciones normales de homeostasis redox celular, las ERO desempeñan una función fundamental como moléculas señalizadoras en diferentes procesos fisiológicos, como el desarrollo embrionario, la germinación, la muerte celular programada (PCD) y el crecimiento radicular (Wrzaczek *et al.*, 2013). No obstante, factores de estrés ambiental como el ataque de organismos patógenos, la falta de agua, suelos salinos, temperaturas extremas, exposición a elementos potencialmente tóxicos y radiación UV-B pueden aumentar la producción de ERO. Estos factores interrumpen el equilibrio celular y aceleran el envejecimiento celular (Sharma & Dubey, 2007). En concentraciones altas, las ERO se convierten en compuestos tóxicos para la célula debido a su elevada reactividad con otras moléculas, ya que pueden oxidar a macromoléculas como lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos (Kapoor *et al.*, 2015). Por esta razón, las plantas cuentan con mecanismos de defensa antioxidante que mantienen el balance entre la generación y la eliminación de ERO (Baxter *et al.*, 2014).

## **2.17. Mecanismos antioxidantes**

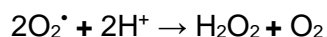
Las plantas presentan mecanismos antioxidantes que regulan los efectos dañinos de las ERO, previniendo o retardando la oxidación de diversas moléculas. Estos mecanismos pueden clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos (Sharma *et al.*, 2012).

## **2.18. Antioxidantes enzimáticos**

SOD, CAT y POD, así como las enzimas que participan en el ciclo de ascorbato-glutatión (AsA-GSH), están presentes en todas las células vegetales y han demostrado ser cruciales para la defensa frente al estrés oxidante (Singh *et al.*, 2016).

### 2.18.1. Superóxido dismutasa (SOD)

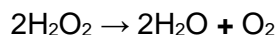
Las SOD son una familia de enzimas antioxidantes que pertenece al grupo de las metaloenzimas y cuya función consiste en catalizar la dismutación del  $O_2^\bullet$  a una molécula de menor toxicidad ( $H_2O_2$ ), como se observa en la siguiente ecuación (Bowler *et al.*, 1994):



Se han descrito tres isoenzimas SOD en plantas: I) Cu/Zn-SOD; II) Mn-SOD; y III) Fe-SOD. Estas enzimas tienen la misma actividad catalítica, pero diferentes estructuras químicas y ubicaciones dentro de la célula. Mientras que la Mn-SOD se limita a las mitocondrias y la Fe-SOD a los cloroplastos, la enzima Cu/Zn-SOD se encuentra en los peroxisomas, las mitocondrias y el citosol (Sharma *et al.*, 2012).

### 2.18.2. Catalasa (CAT)

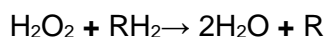
La CAT cataliza la reducción de moléculas de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , como se observa en la siguiente ecuación (Cárdenas-Rodríguez & Pedraza-Chaverri, 2006):



En las plantas se ha reportado la presencia de CAT en las mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas y citosol (Kibinza *et al.*, 2011).

### 2.18.3. Peroxidasas (POD)

Las POD son un grupo de enzimas que catalizan la transformación de diferentes compuestos químicos utilizando  $H_2O_2$  como oxidante (Cárdenas-Rodríguez & Pedraza-Chaverri, 2006):



En plantas se ha reportado la presencia de las enzimas ascorbato peroxidasa (APx) y glutatión peroxidasa (GPx), las cuales son esenciales para eliminar el exceso de  $H_2O_2$  en la célula (de Gara *et al.*, 2010). La APx y la GPx están ampliamente distribuidas en los cloroplastos, mitocondrias, citosol y en la membrana celular (Potters *et al.*, 2002).

#### **2.18.4. Enzimas del ciclo ascorbato-glutación (AsA-GSH)**

El ciclo AsA-GSH desempeña una función crucial en la regulación del estrés oxidante, siendo considerado la vía principal para neutralizar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado de la dismutación del  $\text{O}_2^\bullet$ . Este ciclo implica diferentes reacciones redox, que incluyen la oxidación de GSH y AsA mediante  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La APx convierte el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  mediante la oxidación de AsA a monodehidroascorbato (MDHA). Este último puede ser regenerado a través de la acción de la monodehidroascorbato reductasa, utilizando nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como agente reductor. La MDHA se convierte de manera espontánea en dehidroascorbato (DHA) mediante la oxidación de GSH a glutación oxidado (GSSG). Posteriormente, la glutación reductasa es capaz de transformar al GSSG nuevamente en GSH, utilizando NADPH como agente reductor. De esta manera, los estados oxidados de AsA y GSH son reducidos a sus formas iniciales, cerrando el ciclo y evitando la producción excesiva de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la célula (Peralta-Pérez & Volke-Sepúlveda, 2012).

En las plantas, el ciclo AsA-GSH está presente en al menos cuatro compartimentos celulares diferentes: cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y citosol (Pang & Wang, 2010).

#### **2.19 Antioxidantes no enzimáticos**

AsA, GSH, betalaínas, carotenoides, tocoferoles, los tocotrienoles, los tococromanoles y compuestos fenólicos son antioxidantes no enzimáticos que participan en la defensa del organismo y funcionan, en algunos casos, como cofactores enzimáticos. Además, influyen en el desarrollo de las plantas al regular procesos como la mitosis, el alargamiento celular, la senescencia y la PCD (Sharma *et al.*, 2012).

##### **2.19.1. Ascorbato (AsA)**

El AsA es un antioxidante importante en la protección del organismo contra el estrés oxidante, ya que puede ceder electrones en diferentes reacciones químicas. El AsA es sintetizado a través de la vía Smirnoff–Wheeler y mediante intermediarios de ácido urónico, como el ácido D-galacturónico (Smirnoff & Wheeler, 2000).

### **2.19.2. Glutación (GSH)**

El GSH está constituido por tres aminoácidos (glutamato-glicina-cisteína), que, al igual que el AsA, desempeña una función crucial en la protección contra el estrés oxidante inducido por ERO (Seal *et al.*, 2010). En las plantas, el GSH, es el antioxidante más abundante y se ha detectado prácticamente en todas las estructuras celulares, incluyendo las vacuolas. El GSH es sintetizado en el citosol y en los cloroplastos mediante isoformas específicas de la  $\gamma$ -glutamil-cisteinil sintetasa y la glutación sintetasa. El balance entre GSH y GSSG es fundamental para mantener la homeostasis celular (Noctor *et al.*, 2012).

### **2.19.3. Betalaínas**

Las betalaínas son pigmentos hidrosolubles de origen natural con nitrógeno en su estructura, las cuales sintetizan a partir del aminoácido tirosina (Strack *et al.*, 2003). Están presentes en todas las células de las plantas del orden Caryophyllales. Dentro de esta categoría taxonómica, las familias Cactaceae y Amaranthaceae destacan por su contenido de betalaínas (Stintzing *et al.*, 2005; Fernández-López *et al.*, 2012). Las betalaínas son consideradas potentes antioxidantes y también tienen propiedades antitumorales (Ravichandran *et al.*, 2013).

### **2.19.4. Carotenoides**

Los tetraterpenos conocidos como carotenoides están formados por varias moléculas de isopreno unidas en ambos extremos por un anillo de ciclohexano insaturado. Se distinguen dos tipos de carotenoides: las xantofilas y los carotenos. Las xantofilas tienen  $O_2$  en sus anillos terminales, mientras que los carotenos no lo presentan (Olatunde *et al.*, 2020). Estos pigmentos pertenecen al grupo de los antioxidantes lipofílicos y pueden desintoxicar varias formas de ERO. En las plantas, los carotenoides eliminan al  $O_2^*$  para inhibir el daño oxidativo. Además, el ABA, que regula la latencia y la respuesta al estrés, es sintetizado a partir de los carotenos (Nisar *et al.*, 2015).

### **2.19.5. Tocoferoles, tocotrienoles y tococromanoles**

Los tocoferoles están compuestos por un anillo cromano y una cadena hidrófoba formada por isoprenoides. La cantidad y ubicación de los grupos metilo ( $-CH_3$ ) en el anillo cromano varían entre los grupos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) de tocoferoles (Lushchak & Semchuk, 2012). Los

tocoferoles son antioxidantes lipofílicos y, junto con los tocotrienoles y tococromanoles, pertenecen a la familia de la vitamina E. Estos compuestos son producidos únicamente por productores fotosintéticos, utilizando ácido homogentísico y fitil-difosfato como precursores, y están implicados en la eliminación de ERO (Munné-Bosch, 2005).

#### **2.19.6. Compuestos fenólicos**

Según Kumar *et al.* (2020), los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios hidrosolubles identificados por la presencia de uno o más grupos hidroxilo ácidos (-OH) unidos a un anillo aromático (grupo fenol). Compuestos fenólicos, como los flavonoides, taninos, ésteres de hidroxycinamato y lignina, poseen propiedades antioxidantes y son abundantes en los tejidos de las plantas (Olszowy-Arora, 2019). Los polifenoles tienen la capacidad de unirse a los iones de metales de transición y neutralizar directamente a las ERO. Además, pueden prevenir la peroxidación de los lípidos al capturar los radicales alcoxilo (Arora *et al.*, 2000).

#### **2.20. Estrés oxidante**

Un desbalance entre la generación de ERO y los mecanismos de defensa antioxidante se conoce como estrés oxidativo. Esto puede ser causado por una disminución de las defensas antioxidantes, un aumento de la generación de ERO o una combinación de ambos (Bartosz, 1997). En las plantas, se han reportado diferentes indicadores para determinar el estrés oxidante, como la relación entre GSH/GSSG y/o entre AsA/DHA (Demidchik, 2015).

#### **2.21. Efecto de las especies reactivas de oxígeno en las biomoléculas**

En condiciones de estrés oxidante, las ERO pueden causar daño a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que resulta en modificaciones de las membranas e inhibición enzimática, conduciendo a un mal funcionamiento celular e incluso a la muerte (Singh *et al.*, 2016).

##### **2.21.1. Daño en los lípidos**

Las ERO pueden inducir peroxidación lipídica, un proceso en el cual agentes oxidantes afectan los lípidos de membrana. Este fenómeno altera la estructura de las membranas, afectando su integridad y la compartimentación celular. Además, los radicales derivados de

la oxidación de lípidos pueden dañar a otras macromoléculas, lo que aumenta el estrés oxidante en la célula (Kołodziej *et al.*, 2018).

Cuando un grupo OH<sup>•</sup> oxida una cadena lipídica insaturada, produce un radical alquilo y un lípido hidroperoxidado, que es el primer paso en la peroxidación lipídica. El radical alquilo reacciona con otra molécula, quitándole un electrón y regenerando la especie inicial, lo que provoca que la reacción se propague. Un solo OH<sup>•</sup> puede provocar la peroxidación de varios ácidos grasos poliinsaturados, ya que las reacciones involucradas en este proceso son parte de una reacción en cadena (Kołodziej *et al.*, 2018). Un subproducto de la peroxidación de lípidos es el MDA, el cual se ha utilizado ampliamente como marcador de estrés oxidante (Jadoon & Malik, 2017).

### **2.21.2. Daño en las proteínas**

Las ERO pueden causar modificación directa e indirecta en las proteínas. La modificación directa consiste en regular la actividad de una proteína mediante procesos como la nitrosilación, carbonilación, y la formación de enlaces disulfuro. Por otro lado, la modificación indirecta ocurre por la conjugación de productos de descomposición que derivan de la peroxidación lipídica (Lounifi *et al.*, 2013). En ambos casos, como consecuencia de la producción excesiva de ERO, se puede dar lugar a modificaciones en los aminoácidos, fragmentación de la cadena peptídica, agregación de productos de reacción y mayor susceptibilidad de las proteínas a la proteólisis (Demidchik, 2015). Las proteínas carboniladas, son un biomarcador ampliamente utilizado para determinar los daños por estrés oxidante en proteínas (Møller & Kristensen, 2004).

### **2.21.3. Daño en el ADN**

Las ERO pueden causar daños oxidantes en el ADN nuclear, mitocondrial y cloroplástico, lo que resulta en la oxidación de la desoxirribosa, la modificación y eliminación de nucleótidos, así como, en la ruptura de las cadenas de ácidos nucleicos. Cualquier daño en el ADN puede provocar cambios en la codificación de las proteínas e incluso puede resultar en la inactivación completa de estas (Sharma *et al.*, 2012).

Mientras que el daño a los azúcares se produce principalmente por la pérdida de un hidrógeno de la desoxirribosa, el daño oxidante en las bases nitrogenadas del ADN suele implicar la adición de un OH<sup>•</sup> a los dobles enlaces (Roldán-Arjona & Ariza, 2009). El OH<sup>•</sup>

reacciona con las purinas y pirimidinas, así como con el esqueleto de desoxirribosa, generando productos como 8-oxo-7, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), hidroximetil urea, urea, timina glicol, timina y adenina. Entre estos productos, el 8-OHdG se utiliza como biomarcador para determinar el nivel de daño a ADN inducido por el estrés oxidante (Valavanidis *et al.*, 2009).

## **2.22. Especies reactivas de oxígeno en las semillas**

La producción y acumulación de ERO en la semilla depende de su estado metabólico y fisiológico (Kumar *et al.*, 2015). En semillas deshidratadas, el metabolismo es reducido, y en estas condiciones, las ERO se originan a partir de reacciones no enzimáticas (como las reacciones de Amadori y Maillard) y mecanismos asociados a la peroxidación lipídica (Sun & Leopold, 1995). Por otro lado, en semillas hidratadas, todos los compartimientos metabólicamente activos pueden convertirse en fuentes de ERO, como, por ejemplo, los glioxisomas (por el catabolismo de los lípidos), los peroxisomas (por el catabolismo de las purinas), las mitocondrias (a través de procesos involucrados en la respiración) y las membranas plasmáticas (por la actividad de NADPH oxidasa) (Bailly, 2004). No obstante, la principal fuente de ERO durante la imbibición de semillas se atribuye a la actividad mitocondrial (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008).

## **2.23. Efecto dual de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología de las semillas**

Durante mucho tiempo se consideró que la acumulación de ERO era perjudicial para la viabilidad de las semillas debido al estrés oxidante impuesto durante la desecación o el envejecimiento (Bailly, 2004). No obstante, investigaciones recientes indican que, en bajas concentraciones, las ERO también cumplen funciones cruciales en la transducción de señales celulares, participando en diversos procesos como la germinación, la ruptura de la latencia, la PCD y la protección contra los patógenos, entre otros (Kumar *et al.*, 2015; Bailly, 2019).

## **2.24. Especies reactivas de oxígeno como moléculas de señalización**

Como se mencionó previamente, un exceso de ERO puede causar daños a las biomoléculas del embrión, afectando su viabilidad, así como su crecimiento y desarrollo (Kranner & Colville, 2011). Por ello, las semillas cuentan con mecanismos antioxidantes celulares que mantienen el equilibrio redox, evitando la acumulación de cantidades tóxicas

de ERO, al tiempo que permite una señalización mediada por estas moléculas (Bailly *et al.*, 2008).

#### **2.24.1. Debilitamiento del endospermo**

El endospermo es un tejido que suministra nutrientes al embrión durante las primeras fases del desarrollo (Márquez *et al.*, 2016). No obstante, en algunas especies, como *Arabidopsis* y tabaco, la germinación se ve obstaculizada por este tejido. Por ello, reguladores del crecimiento como el ABA y las giberelinas (GA) controlan la actividad de enzimas hidrolíticas que, a su vez regulan el debilitamiento del endospermo, permitiendo así la germinación de la semilla (Barba-Espín *et al.*, 2012). Este fenómeno ha sido documentado en semillas de lechuga y otras especies cultivadas, en las cuales se observó que el debilitamiento del endospermo está directamente vinculado a la producción de ERO en respuesta a las señales ambientales externas (Zhang *et al.*, 2014).

#### **2.24.2. Ruptura de la latencia**

La latencia fisiológica de las semillas es una condición regulada principalmente por el ABA y las GA, y la ruptura de este estado ocurre cuando se altera el equilibrio entre ambas hormonas. En semillas de *Arabidopsis*, la adición exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuye los niveles de ABA e incrementa los de GA, lo que desencadena la ruptura de la latencia (Liu *et al.*, 2010). Esto sugiere que una relación alta/baja de ABA/GA mantiene la condición de latencia, mientras que una relación baja/alta de ABA/GA conduce a la ruptura de este estado (Bailly *et al.*, 2008).

#### **2.24.3. Protección contra patógenos**

Las ERO desempeñan funciones clave de señalización en respuesta al estrés, tanto abiótico como biótico (Gomes & García, 2013). Las ERO pueden afectar directamente a los patógenos o actuar indirectamente, provocando reacciones de hipersensibilidad que conducen a la PCD (Bailly, 2004). Además, durante una infección, el O<sub>2</sub><sup>•</sup> producido por la acción de la NADPH oxidasa se convierte en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante dismutación espontánea o por actividad de la SOD. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por este proceso induce la muerte de las células locales infectadas, lo que limita la propagación de patógenos. Asimismo, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desempeña una función crucial en la resistencia a infecciones, ya que provoca la peroxidación de la membrana celular del patógeno (Quan *et al.*, 2008).



## 2.25. Factores que intervienen en el envejecimiento de las semillas

El envejecimiento de las semillas está determinado por su estado fisiológico, la composición genética y las condiciones de almacenamiento, ya sean naturales o artificiales (Singh & Bassi, 2016; Zhou *et al.*, 2020).

Diversas variables, como la temperatura, la humedad relativa y la concentración de O<sub>2</sub>, influyen en la rapidez con que las semillas se deterioran durante el almacenamiento (Roberts, 1973; Roach *et al.*, 2018). La baja humedad y las bajas temperatura ralentizan el proceso de descomposición, prolongando así la vida útil de las semillas (Walters *et al.*, 2005). En contraste, condiciones de alta humedad y temperatura aceleran el envejecimiento (Châtelain *et al.*, 2013; Baladi & Balouchi, 2016). Por lo tanto, la temperatura y la humedad pueden manipularse para simular el deterioro de las semillas en condiciones naturales, mediante el uso de métodos de envejecimiento artificial (Zhou *et al.*, 2020). El deterioro controlado implica exponer las semillas a temperaturas cercanas a los 30 °C y humedades relativas constantes, lo que asegura que el contenido de agua de las semillas no varíe significativamente durante el tratamiento, y a menudo se utiliza como indicador de envejecimiento en los bancos de semillas. En cambio, el envejecimiento acelerado consiste en someter a las semillas secas a alta humedad relativa (cerca del 100 %) y temperaturas superiores a 45 °C, lo que provoca cambios drásticos en el porcentaje de humedad durante el experimento. Este método se emplea para reducir rápidamente (días o semanas) la viabilidad de un lote de semillas (Roach *et al.*, 2018).

Aunque se ha investigado ampliamente, la interacción de factores como la temperatura, los niveles de O<sub>2</sub> y la humedad en el deterioro de las semillas aún no se comprende completamente (Buijs *et al.*, 2020). Por ejemplo, en semillas de girasol almacenadas con bajo contenido de agua, se observó que altas concentraciones de O<sub>2</sub> tiene un efecto negativo sobre la viabilidad de las semillas y el crecimiento de las plantas. En contraste, las semillas de cebada no presentan efectos negativos bajo estas condiciones, aunque sí se observan daños durante el desarrollo posterior (Morscher *et al.*, 2015).

Otros factores que influyen en la longevidad de las semillas incluyen: I) la composición genética; II) la estructura física y química; III) la producción y eliminación de ERO; IV) los mecanismos antioxidantes y de reparación; V) los niveles de fitohormonas; y VI) el

contenido de sustancias de reservas (Hong & Ellis, 1996; Mullin & Xu, 2001; Liu *et al.*, 2016; Chandra *et al.*, 2017; Liu y Hou, 2018).

## **2.26. Cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares asociados al envejecimiento de las semillas**

El deterioro de las semillas es un fenómeno biológico complejo y multifactorial que involucra diferentes procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares interrelacionados (Ebene *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2020).

### **2.26.1. Cambios fisiológicos**

Los cambios fisiológicos relacionados con el envejecimiento de semillas incluyen el aumento de ERO y/o la disminución de los sistemas antioxidantes (estrés oxidante), el desequilibrio en las enzimas y hormonas reguladoras del crecimiento, la disminución de la actividad metabólica, la pérdida del estado vítreo citoplasmático y la PCD (Ventura *et al.*, 2012). Estos procesos fisiológicos están fuertemente influenciados por el contenido de agua de la semilla y las condiciones de almacenamiento (Diaz-Vivancos *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha demostrado que el citoplasma de las semillas secas entra en un estado vítreo, el cual está condicionado por la temperatura, la humedad y la cantidad de varios azúcares presentes en la semilla, como sacarosa, rafinosa, estaquiosa y verbascosa (Williams y Leopold, 1989). En este estado, el citoplasma se vuelve tan viscoso que se detienen el movimiento de difusión y muchas reacciones de deterioro (Williams y Leopold, 1989). No obstante, cualquier cambio fisiológico que afecte el estado vítreo de la semilla conducirá a su envejecimiento (Osborne, 2000).

### **2.26.2. Cambios bioquímicos**

La reducción de la síntesis de proteínas, la inactivación de proteínas, la alteración de la actividad enzimática, la hidrólisis de proteínas y las modificaciones postraduccionales son algunas de las alteraciones bioquímicas asociadas al envejecimiento de las semillas (Rajjou *et al.*, 2012). En semillas envejecidas, la incapacidad para sintetizar nuevas proteínas puede estar relacionada con varios factores, como la disminución de la capacidad para sintetizar nuevos ARNm (Bray & Dasgupta, 1976). No obstante, la síntesis de proteínas también puede verse comprometida a nivel de la traducción, debido a la actividad reducida de los ribosomas, lo cual resulta de modificaciones estructurales graves. Estas

modificaciones se han observado en semillas no viables (Roberts & Osborne, 1973; Zhao *et al.*, 2020). Otro factor asociado al envejecimiento en organismos vegetales es la expresión reducida o las mutaciones en los factores de transcripción necesarios para producir ribosomas (Farley-Barnes *et al.*, 2019).

Wettlaufer & Leopold (1991) informan que, en semillas, las proteínas también pueden experimentar modificaciones estructurales a través de la glicación no enzimática, mediada por las reacciones de Amadori y Maillard. Se considera que las reacciones no enzimáticas son la causa más probable de la inactivación de proteínas durante el almacenamiento, ya que las semillas secas no presentan un metabolismo enzimático activo (Sun & Leopold, 1995; Fu *et al.*, 2015). La inactivación de proteínas en semillas almacenadas puede ocurrir debido a la ganancia o pérdida de ciertos grupos funcionales, la oxidación de grupos sulfhidrilo o la conversión de aminoácidos dentro de la estructura de la proteína (Galletti *et al.*, 1995). Estos cambios reducen la capacidad metabólica de las semillas y la facultad del organismo para reparar el daño celular producido durante el almacenamiento (Chhabra & Singh, 2019).

El almacenamiento de semillas también puede alterar la actividad de las proteínas, lo que a su vez puede afectar los procesos metabólicos (Fu *et al.*, 2015; Chhabra & Singh, 2019). Las alteraciones en la actividad de las proteínas podrían surgir de cambios conformacionales, como el plegamiento o despliegue parcial, la disociación en monómeros o subunidades, y la condensación en polímeros, lo cual afecta el proceso de germinación. Para que la geminación se complete, se requieren varias enzimas hidrolíticas, como la lipasa, fosfolipasa, proteasa, DNasa, fosfatasa y amilasa (Basavarajappa *et al.*, 1991). Asimismo, los efectos deletéreos de las ERO, que estimulan el envejecimiento de las semillas y reducen su viabilidad, pueden ser contrarrestados por el sistema antioxidante enzimático y no enzimático de las semillas.

Además del daño oxidante inducido por las ERO, las proteínas pueden sufrir otras modificaciones estructurales e incluso perder su funcionalidad debido al estrés y envejecimiento celular. En este contexto, la enzima L-isoaspartil metiltransferasa ha demostrado ser esencial para la reparación de proteínas (Wei *et al.*, 2015). Otro cambio bioquímico asociado con el deterioro de las semillas, como se mencionó anteriormente, es la peroxidación lipídica (Oenel *et al.*, 2017).

### 2.26.3. Cambios moleculares

El daño al ADN en semillas almacenadas puede ocurrir debido al estrés oxidante, lo que da lugar a la oxidación de la desoxirribosa, la modificación y eliminación de nucleótidos, así como la ruptura de las cadenas de ácidos nucleicos. Para asegurar la germinación de las semillas, estos daños deben ser reparados mediante diversas enzimas, como la ADN ligasa (Sharma *et al.*, 2012).

Los cambios epigenéticos pueden alterar la expresión génica en semillas almacenadas, principalmente través de la metilación del ADN, así como mediante modificaciones de histonas, variantes de histonas y remodelación de cromatina (Ahmad *et al.*, 2010).

Michalak *et al.* (2013) investigaron la correlación entre la metilación del ADN y la desecación en semillas de *Pyrus communis*, observando que, después de un año de almacenamiento, el ADN de las semillas presentó un aumento en los niveles de metilación. Los autores sugieren que el envejecimiento de las semillas podría estar asociado con un incremento en la metilación del ADN.

### 3. ANTECEDENTES DIRECTOS

Este proyecto de investigación es continuación de la tesis realizada en el programa de Maestría en Biología de la UAMI, titulada “Variabilidad genética y viabilidad de semillas de *Escontria chiotilla* y *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) conservadas *ex situ* y enterradas *in situ* en un matorral xerófilo en el Valle de Tehuacán” (Guzmán-Hernández, 2018).

Este estudio demostró que las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* mantienen su viabilidad (> 80 %) cuando son almacenadas *ex situ* (a  $25 \pm 3$  °C, con una humedad relativa del  $20 \pm 2$  % y en oscuridad) durante ocho años. En contraste, cuando las semillas son almacenadas *in situ* (enterradas en el suelo de un matorral xerófilo), la viabilidad disminuyó en más del 60 % entre los 12 y 15 meses de enterramiento. Se propone que esto se debió a las fluctuaciones de temperatura y humedad que experimentaron las semillas en el suelo durante el período del experimento.

Con base en estas evidencias, en la presente investigación se plantearon las siguientes preguntas de investigación:

#### 4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿La viabilidad y vigor de las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* enterradas *in situ* durante 12 y 24 meses serán menores en comparación con las semillas almacenadas *ex situ*?
2. ¿Las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* enterradas *in situ* presentan un mayor daño en biomoléculas, como lípidos y proteínas, en comparación con las semillas almacenadas *ex situ*?
3. ¿El estrés oxidante en las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*, enterradas *in situ* y almacenadas *ex situ*, aumenta en función del tiempo?
4. ¿Existen diferencias en la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y POD) entre las semillas almacenadas *ex situ* y las enterradas *in situ*?
5. ¿La pérdida de viabilidad y vigor de las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* enterradas *in situ* está relacionada con los períodos de sequía y lluvia?

## 5. HIPÓTESIS

1. La viabilidad y vigor de las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*, enterradas *in situ* durante 12 y 24 meses, serán menores en comparación con las semillas almacenadas *ex situ*.
2. Las semillas enterradas *in situ* durante 12 y 24 meses mostrarán un mayor daño en los lípidos y las proteínas, así como una disminución en el contenido de proteínas solubles, en comparación con las semillas almacenadas *ex situ*.
3. El estrés oxidante en las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*, enterradas *in situ* durante 12 y 24 meses, será mayor en comparación con las semillas almacenadas *ex situ*.
4. Se espera que la actividad de las enzimas antioxidantes, como SOD, CAT y POD, sea mayor en las semillas almacenadas *ex situ* que en las enterradas *in situ*, lo que implicaría un menor daño en lípidos y proteínas en las semillas almacenadas *ex situ*.
5. El periodo en el que se produce la pérdida de la viabilidad y vigor de las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* enterradas *in situ* está relacionado con el daño oxidante en respuesta a las condiciones ambientales.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo General

Estudiar la participación del daño por estrés oxidante y los mecanismos antioxidantes en la viabilidad y el vigor de semillas de dos especies de cactáceas, almacenadas *ex situ* y enterradas *in situ* durante diferentes períodos de tiempo.

### 6.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar la viabilidad y el vigor de las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*, almacenadas *ex situ* y enterradas *in situ* durante 0, 12 y 24 meses.
2. Determinar los niveles de peroxidación lipídica, así como el contenido de proteínas solubles y oxidadas en semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*, almacenadas *ex situ* y enterradas *in situ* durante 0, 12 y 24 meses.
3. Determinar la relación entre el GSH y el GSSG ( $E_{GSSG/2GSH}$ ) en semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*, almacenadas *ex situ* y enterradas *in situ* durante 0, 12 y 24 meses.
4. Determinar la actividad de las enzimas SOD, CAT y POD en semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*, almacenadas *ex situ* y enterradas *in situ* durante 0, 12 y 24 meses.
5. Evaluar la viabilidad y el vigor, el estrés oxidante, el daño a biomoléculas y la actividad de enzimas antioxidantes en semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* recién cosechadas y enterradas *in situ* durante 0, 6, 12, 14 y 16 meses, considerando los periodos de sequía y de lluvias.



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

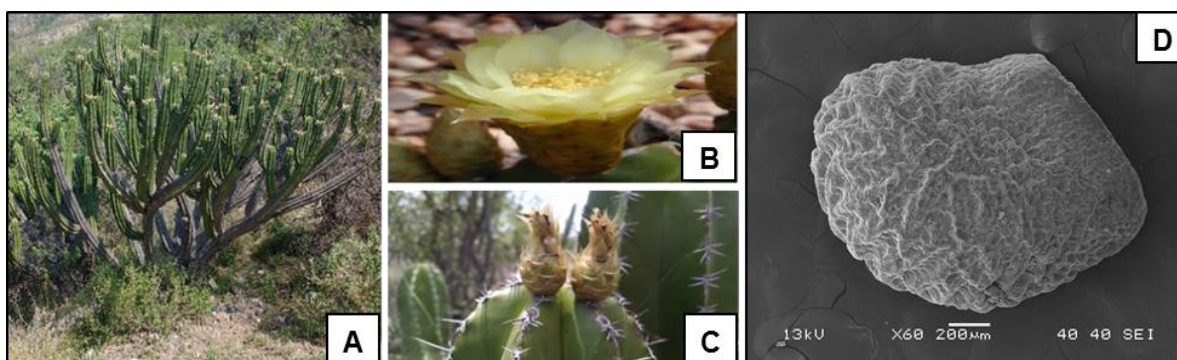
### 7.1. Especies de estudio

#### 7.1.1. *Escontria chiotilla*

*Escontria chiotilla*, especie conocida comúnmente como "jiotilla", es un cactus columnar silvestre endémico de México, se distribuye en las regiones de la Mixteca Oaxaqueña, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán y la Cuenca del Río Balsas (Arias *et al.*, 1997).

El árbol maduro generalmente alcanza una altura de entre 3 y 7 m, con un tronco grueso y corto, y ramas dicotómicas que poseen de 7 a 8 costillas. Las aréolas miden aproximadamente 1 cm de largo y presentan entre 10 a 15 espinas radiales, así como de 3 a 5 espinas centrales, siendo una de estas últimas más larga, alcanzando hasta 7 cm de longitud. Las flores, ubicadas en la terminación de las ramas, son infundibuliformes, miden alrededor de 3 cm de largo, son de color amarillo y presentan grandes escamas translúcidas. Los frutos son globosos y escamosos, de color café rojizo, alcanzando hasta 3.5 cm de diámetro, y contienen semillas negras y permeables, de 1 a 1.3 mm (Fig. 4) (Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1978).

Esta especie produce frutos de abril a mayo y de septiembre a noviembre. Sus frutos son apreciados tanto frescos como procesados, y se utilizan para elaborar mermeladas, conservas y nieve (Arias *et al.*, 2001).



**Figura 4.** *Escontria chiotilla*, conocida comúnmente como "Jiotilla". A. Planta madura. B. Flor abierta. C. Frutos maduros y D. Semilla observada en microscopia electrónica de barrido.

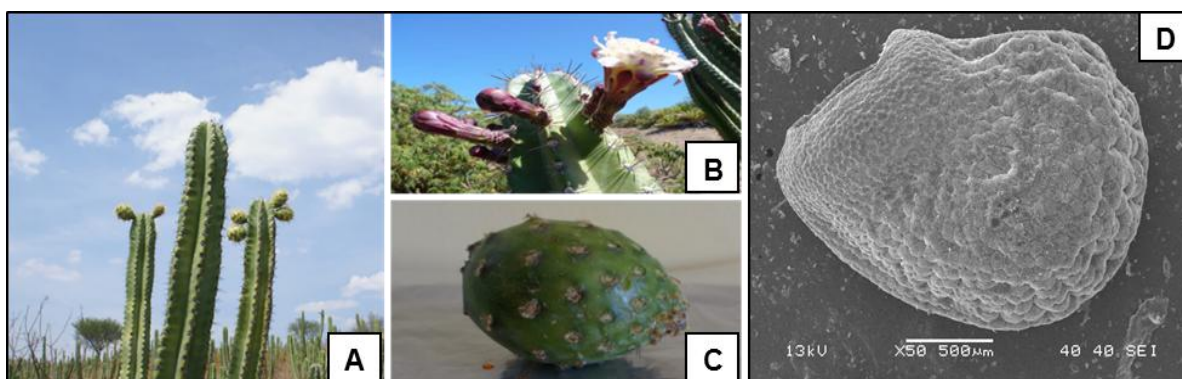
### 7.1.2. *Stenocereus pruinosus*

*Stenocereus pruinosus*, conocida comúnmente como "pitaya de mayo", es un cactus columnar endémico de México. Se encuentra en diversos estados del país, como, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, entre otros (Arias *et al.*, 2001).

Es una especie ampliamente cultivada, especialmente en la región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Parra *et al.*, 2012). Actualmente, se reconocen más de 30 variedades distintas, las cuales presentan diversos grados de domesticación, que ha ocurrido durante más de 8,000 años (Yáñez-López *et al.*, 2016).

El árbol maduro generalmente alcanza una altura de entre 4 y 5 m, con ramas que muestran una capa de cera blanca (pruina) y entre 5 y 6 costillas rectas. Sus espinas son de color gris con las puntas oscuras, con 5 a 7 espinas radiales y de 1 a 4 espinas centrales. Las flores son blanquecinas con tonos rosados, tienen forma infundibuliforme y alcanzan aproximadamente 9 cm de longitud. Los frutos tienen un diámetro promedio de 7 cm, son globosos y su color varía según la variedad, desde rojo púrpura hasta anaranjado verdoso. La pulpa es carnosa y jugosa, y contiene semillas negras y permeables que miden de 1.5 a 2 mm (Fig. 5) (Flores *et al.*, 2011).

El período de fructificación de esta especie generalmente inicia en mayo y finaliza en agosto. El consumo de los frutos se realiza en fresco o en productos procesados, como mermeladas, nieve, licores, yogurt y dulces (Arias *et al.*, 2001).

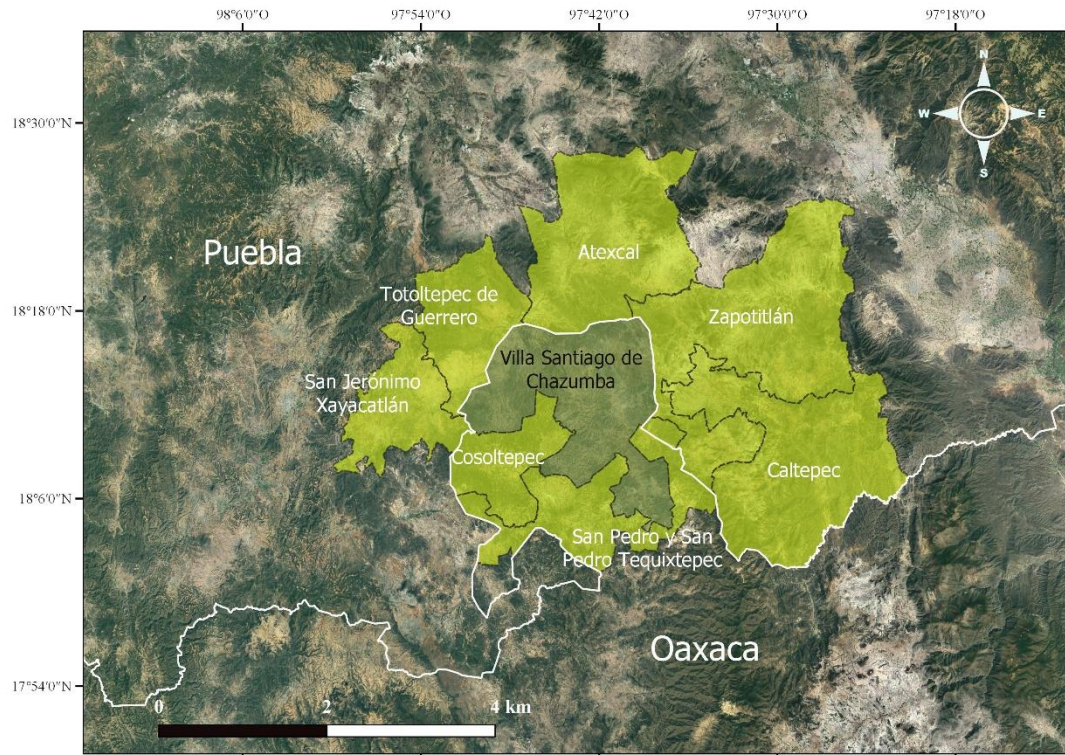


**Figura 5.** *Stenocereus pruinosus*, conocida comúnmente como “Pitaya de mayo”. A. Planta madura. B. Botones florales y flor abierta. C. Fruto maduro y D. Semilla observada en microscopía electrónica de barrido.

## 7.2. Sitio de estudio

### 7.2.1. Ubicación, extensión y límites

Santiago Chazumba es un municipio ubicado en el noroeste del estado de Oaxaca ( $18^{\circ}11'18.62''$  N,  $97^{\circ}40'43.99''$  O) y forma parte del distrito de Huajuapán de León. Se encuentra en la región conocida como Mixteca Baja, dentro del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, y tiene una extensión territorial de 346.93 km<sup>2</sup>. Limita al norte, este y oeste con el estado de Puebla, mientras que al sur hace frontera con el municipio de San Pedro y San Pedro Tequixtepec, Oaxaca (Fig. 6) (INEGI, 2008).



**Figura 6.** Mapa de la ubicación y límites del Municipio de Santiago Chazumba, Oaxaca.

### 7.2.2. Relieve

Santiago Chazumba se distingue por su ubicación entre cerros, con numerosas barrancas que experimentan escorrentías intermitentes, es decir, escurrimientos de agua durante la

temporada de lluvias. Además, posee extensas zonas montañosas con suelo de textura media y gruesa, y pequeñas áreas planas destinadas a la agricultura (INEGI, 2008).

### **7.2.3. Fisiografía**

Santiago Chazumba está situado entre el Eje Neovolcánico y la discontinuidad de la provincia fisiográfica de la Sierra Madre del Sur. Las geoformas distintivas de la región incluyen pendientes que van desde menos del 5 % hasta más del 50 %, así como colinas que alcanzan los 2,000 metros sobre el nivel del mar (INEGI, 2008).

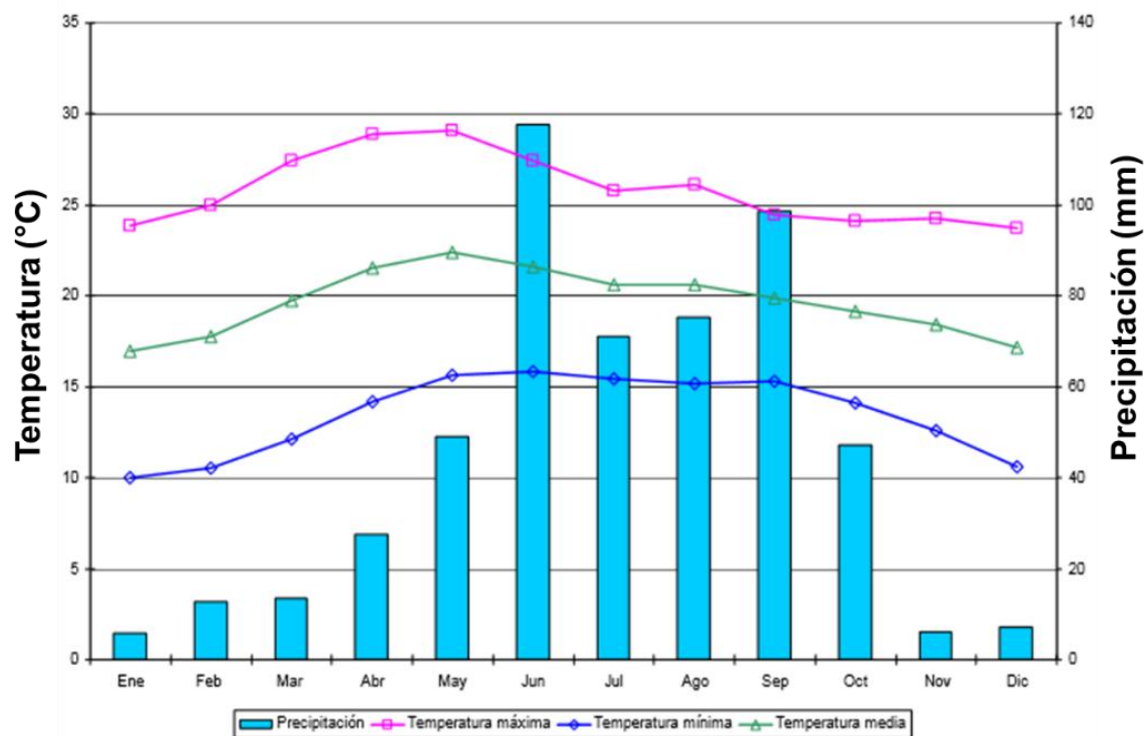
### **7.2.4. Suelo**

El suelo se compone de sedimentos que incluyen arena, toba y limo arenoso, lo que limita su capacidad de retención de agua. Predominan las zonas cubiertas por rocas, con un suelo generalmente poco profundo que rara vez supera más de 20 cm de espesor. Estos suelos se encuentran frecuentemente en áreas con ligeras pendientes y terrenos elevados. El drenaje es superficial, y el suelo es susceptible a la erosión debido las fuertes lluvias. Su color varía entre tonos rojizos y cafés, dependiendo de la cantidad de materia orgánica presente (INEGI, 2008).

### **7.2.5. Clima**

El clima es cálido semidesértico (BSw) (de acuerdo con la clasificación de Köppen y modificada por García, 2004) con una temperatura promedio anual de 19.7 °C. Mayo es el período más caluroso, con temperaturas que oscilan entre los 14.3 °C y los 32.8 °C, mientras que enero es el mes más frío, con temperaturas entre 6.5 °C y 14.2 °C.

La precipitación promedio anual es de 530 mm. La mayor intensidad de lluvias se registra principalmente en agosto (entre 131 y 203 mm) y septiembre (entre 122-218 mm). La temporada seca comienza entre octubre-noviembre y finaliza entre marzo-abril (Fig. 7) (Serrano *et al.*, 2005).

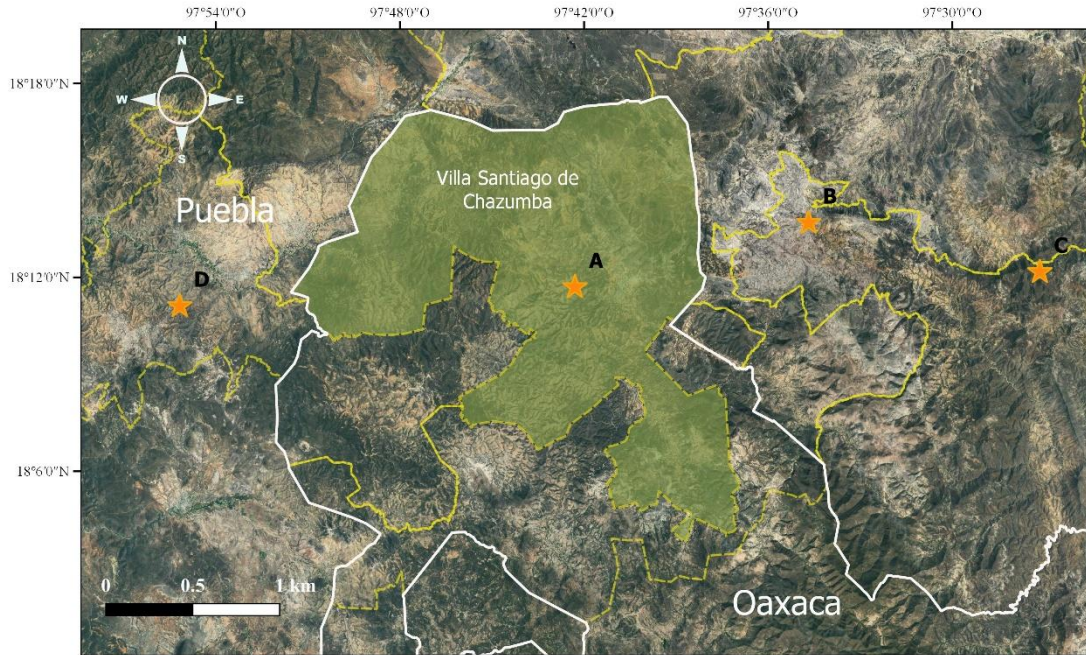


**Figura 7.** Temperatura y precipitación promedio mensual (período de 1961-2003) en el municipio de Santiago Chazumba, Oaxaca (tomado de Serrano *et al.*, 2005).

Los datos climáticos de la región para los años de estudio (2016, 2017, 2018 y 2019) se obtuvieron de las estaciones climáticas Acatepec (18°13'36.97" N, 97°34'44.03" O), Caltepec (18°12'14.18" N, 97°27'12.62" O) y Tonahuixtla (18°11'13.51" N, 97°55'16.36" O) (Fig. 8) (<https://smn.conagua.gob.mx/es/>).

Durante el período de estudio, no se presentaron anomalías climáticas (Anexo 1).





**Figura 8.** Estaciones climáticas consultadas durante el período de estudio (2016-2019). A. sitio de estudio en la localidad de Trinidad Huaxtepec, Mpio. Santiago Chazumba, Oaxaca. B. Estación climática de Acatepec, Puebla. C. Estación climática de Caltepec, Puebla. D. Estación climática de Tonahuixtla, Puebla.

### 7.3. Muestreo de frutos y extracción de las semillas

Se muestrearon 150 frutos de *E. chiotilla* y 60 frutos de *S. pruinosus* en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (18°12'41" N, 97°23'58" O), en mayo de 2016, 2017 y 2018. Se retiraron el pericarpio y el tejido accesorio (ovario ífero), y luego se extrajeron las semillas, que se lavaron con agua. Un fruto de *E. chiotilla* contenía entre 400 y 900 semillas, mientras que un fruto de *S. pruinosus* tenía entre 600 y 2,000 semillas. Para cada año de cosecha, se estimó la viabilidad de las semillas recién extraídas y, en todos los casos, la germinación fue  $\geq 90\%$ . Después de la extracción, las semillas se secaron en papel secante a  $25 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h, hasta alcanzar una humedad de 7-9 %. El contenido de humedad se evaluó gravimétricamente antes y después del secado, a  $103\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 17 h (ISTA, 2020).

### 7.4. Almacenamiento *ex situ* de las semillas

Para su conservación *ex situ*, las semillas se almacenaron en frascos de vidrio herméticos a  $25 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con una humedad relativa del  $20 \pm 2\%$  y en oscuridad.

## **7.5. Enterramiento *in situ* de las semillas**

Las semillas se enterraron en el suelo de un matorral xerófilo situado en el poblado de Trinidad Huaxtepec (18°16'24" N, 97°70'93" O), localidad que forma parte del municipio de Santiago Chazumba, Oaxaca (Fig. 8A).

En este sitio se realizaron dos experimentos, los cuales se describen a continuación:

### **7.5.1. Experimento 1: Comparación entre el almacenamiento *ex situ* y el enterramiento *in situ***

En este experimento se determinaron los cambios fisiológicos y bioquímicos de las semillas enterradas *in situ* durante 12 y 24 meses, y los resultados se compararon con los de semillas recién cosechadas (2018) y semillas almacenadas *ex situ* durante los mismos periodos. Para ello, en mayo de 2016 y 2017 se colocaron 1,000 semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* en cinco sobres hechos con malla de polietileno (6 × 4 cm), que se enterraron a una profundidad de 5-10 cm, rango en el que se pueden encontrar las semillas de cactus en el suelo (Holland & Molina-Freaner, 2013). En mayo de 2018, se exhumaron las semillas enterradas y se determinó su viabilidad, vigor, contenido de GSH y GSSG, estado redox ( $E_{GSSG/2GSH}$ ), contenido de MDA, proteínas solubles y oxidadas, así como la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y POD). Estas variables fueron evaluadas simultáneamente en semillas almacenadas *ex situ* y en semillas recién cosechadas.

### **7.5.2. Experimento 2: Efecto de los factores ambientales (sequías y lluvias) en el deterioro de las semillas enterradas *in situ***

En el experimento 1 no se pudo determinar si el tiempo de almacenamiento, las condiciones (*ex situ* o *in situ*), el año de cosecha de las semillas o la combinación de estos factores, fueron responsables de las diferencias encontradas entre las semillas enterradas *in situ* durante 12 y 24 meses con respecto a semillas recién cosechadas en 2018. Por esta razón, se realizó un segundo experimento en semillas cosechadas en el mismo año y enterradas *in situ* durante intervalos cortos de tiempo, en el que se evaluaron las variables determinados en el experimento 1. Además, se investigaron los periodos de secas-lluvias durante el enterramiento (registrados en estaciones climáticas cercanas al sitio de estudio), como indicadores para evaluar los ciclos de rehidratación/deshidratación a los que estuvieron expuestas las semillas enterradas (Anexo I).

De ambas especies estudiadas, se utilizaron las semillas extraídas de frutos cosechados en 2018, las cuales fueron enterradas de acuerdo con lo descrito en el experimento 1 y exhumadas a los 6, 12, 14 y 16 meses después del enterramiento. En cada exhumación, se recuperaron cinco sobres (5,000 semillas en total) de cada especie para realizar los análisis fisiológicos y bioquímicos.

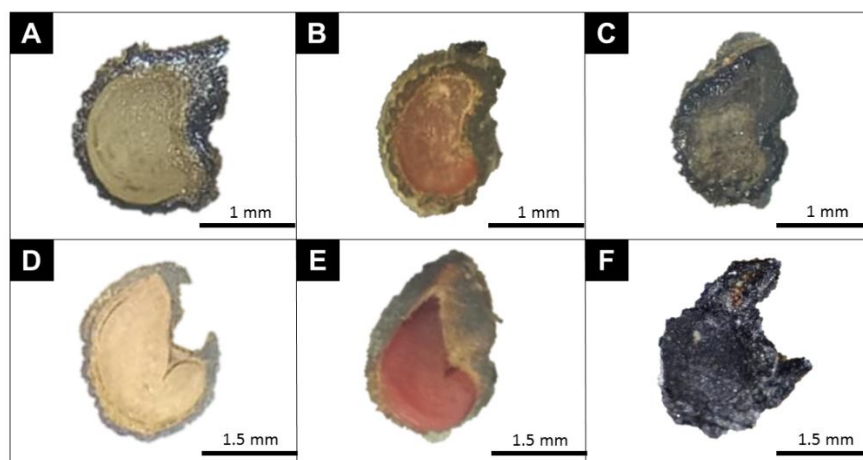
## 7.6. Pruebas de viabilidad

La viabilidad de las semillas se evaluó mediante dos métodos: I) la prueba de germinación y II) la reacción de tetrazolio, de acuerdo con la ISTA (2020).

Se sembraron tres réplicas de 50 semillas en cajas de Petri que contenían agar bacteriológico al 1 % (p/v), las cuales fueron incubadas en una germinadora (*Precision® Dual Program Illuminated Incubator*) a  $25 \pm 3$  °C y fotoperiodo con 12 h de luz ( $15.25 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). La germinación se determinó con base en la emergencia de la radícula durante los 21 días posteriores a la siembra. La germinación total se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Germinacion total (\%)} = \frac{\text{número de semillas germinadas}}{\text{número de semillas sembradas}} \times 100$$

Tres réplicas de 10 semillas se limaron (con lija de agua) longitudinalmente hasta que el embrión quedó expuesto, y se sumergieron en una solución de rojo de tetrazolio al 1 % (p/v) a 40 °C durante 1 h. Se consideraron viables las semillas en las que el embrión estuvo completamente teñido de color rojizo (ISTA, 2020) (Fig. 9).



**Figura 9.** Prueba de CTT en las semillas de *E. chiotilla* (A-C) y *S. pruinosus* (D-F). A y D, semillas sin tinción; B y E, semillas viables; C y F, semillas no viables.



## 7.7. Análisis de vigor

El vigor se determinó calculando el tiempo que tardan las semillas en alcanzar el 50 % de la germinación total ( $T_{50}$ ) y mediante la determinación de la fuga de solutos en semillas embebidas. Además, se evaluaron la sobrevivencia y el crecimiento de las plántulas provenientes de las semillas germinadas.

El  $T_{50}$  se determinó con base en la ecuación reportada por Farooq *et al.* (2005):

$$T_{50} = t_i + \frac{(N + 1)/2n_i}{(n_j - n_i)}(t_j - t_i)$$

Donde, N es el número de semillas germinadas,  $n_i$  y  $n_j$  son el número de semillas acumuladas por el conteo contiguo a los tiempos  $t_i$  y  $t_j$  cuando  $n_i < (N+1)/2 < n_j$ .

La fuga de solutos se determinó midiendo la conductividad eléctrica (CE), de acuerdo con la metodología de Silva *et al.* (2020). Para cada muestra, se colocaron 100 mg de semillas enteras en 20 mL de H<sub>2</sub>O desionizada durante 24 h a 25 °C. La CE fue medida con un conductímetro CON 700 (OAKTON®) y los resultados se expresaron como  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  PS.

Las plántulas originadas de las semillas germinadas se mantuvieron en las placas de agar durante 6 meses, y durante este tiempo se monitoreó su sobrevivencia (plántulas que se desarrollaron normalmente). Posteriormente, se evaluaron la acumulación de biomasa seca, longitud y ancho de la plántula, así como la longitud de la raíz.

## 7.8. Determinación de la oxidación de los lípidos

La peroxidación lipídica se determinó mediante la evaluación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico utilizando el kit comercial, *Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit* (ABCAM®), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se congelaron 200 mg de semillas enteras con nitrógeno líquido y se homogeneizaron con 300  $\mu\text{L}$  de solución de lisis, 3  $\mu\text{L}$  de solución de hidroxitolueno butilado (BHT) y 303  $\mu\text{L}$  de HClO<sub>4</sub> 2 N. El homogeneizado se centrifugó a 13,000 *g* durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante o 200  $\mu\text{L}$  de los estándares de MDA proporcionados por el fabricante con 600  $\mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico (TBA). La mezcla se incubó a 95 °C durante 60 min y luego se enfrió en un baño de hielo durante 10 min. Inmediatamente, se midió la absorbancia a 532

nm en un lector de placas *ScanReady, Microplate photometer P-800* (Life Real®). La concentración de MDA se derivó de la interpolación en la curva de calibración utilizando 0 a 5 nmol de estándar de MDA.

### **7.9. Extracción y cuantificación de las proteínas solubles**

Las proteínas solubles se extrajeron de acuerdo con la metodología de Reyes de la Cruz *et al.* (2004). Se congelaron 200 mg de semillas enteras con nitrógeno líquido y se homogeneizaron con 2 mL de buffer de extracción (pH 7.5), que contenía ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES) 50 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 50 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 20 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 4 mM, ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) 20 mM, manitol 200 mM y polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 1 % (p/v). Se añadió una tableta de inhibidores de proteasas *COMPLETE* (Roche®) por cada 200 mL de buffer de extracción. El homogeneizado se centrifugó a 16,000 *g* a 4 °C durante 25 min, y el sobrenadante se recuperó y almacenó a -80 °C hasta su uso.

La concentración de proteínas solubles se determinó de acuerdo con la metodología de Bradford (1976), utilizando el reactivo *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó Albumina Sérica Bovina (BSA) como proteína de referencia (0-30 µg/mL). Inmediatamente, se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro DU-600 (Beckman ®).

### **7.10. Determinación del contenido de las proteínas oxidadas**

Las proteínas oxidadas se determinaron cuantificando los grupos carbonilo, de acuerdo con la metodología de Hernández-Arciga *et al.* (2020). Se mezclaron 20 µL de buffer fosfato 50 mM (pH 7.2) o 20 µL de muestra con 20 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, disuelta en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 M) y 10 µL de NaOH 6 M. Posteriormente, las muestras se agitaron durante 10 min. Inmediatamente, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas *ScanReady, Microplate photometer P-800* (Life Real®).

### **7.11. Contenido de glutatión reducido, glutatión oxidado y estado redox**

El contenido de GSH y GSSG se determinó utilizando el kit comercial *Quantification Kit for Oxidized and Reduced Glutathione* (Sigma-Aldrich ®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se congelaron 200 mg de semillas enteras con nitrógeno líquido y se homogeneizaron con 1.5 mL de una solución acuosa que contenía de ácido 5-sulfosalicílico

al 0.5 % (p/v). El homogeneizado se centrifugó a 8,000 g durante 10 min. Inmediatamente, se midió la absorbancia a 405 nm del sobrenadante en un lector de placas *ScanReady, Microplate photometer P-800* (Life Real®), y el GSH y el GSSG se determinaron utilizando curvas de calibración con soluciones estándar de GSH (0 a 50 µM) y de GSSG (0 a 25 µM). El  $E_{GSSG/2GSH}$  se calculó como describen Kranner *et al.* (2010) utilizando la ecuación de Nernst, que fue corregida con el contenido de humedad de las semillas analizadas.

$$E_{GSSG/2GSH} = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[GSH]^2}{[GSSG]}$$

Donde R es la constante de los gases; T, es la temperatura en °K; n, el número de electrones transferidos; F, la constante de Faraday;  $E^{\circ}$ , el potencial de reducción estándar de media celda de glutatión a pH 7 [ $E^{\circ}_{GSSG/2GSH} = -240$  mV].

### 7.12. Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes

La actividad de la SOD se determinó de acuerdo con la metodología de Parrilla-Taylor & Zenteno-Savín (2011). Se añadieron 25 µL de buffer de fosfato de potasio (0.1 M, pH 7.5) o extracto de proteína a 1.45 mL de buffer de solución de ensayo (pH 9.5), que contenía  $Na_2CO_3$  50 mM, xantina 0.1 mM, nitroazul de cloruro de tetrazolio (NBT) 25 µM, EDTA 0.1 mM, 25 µL de solución de xantina oxidasa (XO) (0.1 U de XO en 1 mL de sulfato de amonio 2 M). Se midió la absorbancia a 560 nm cada 30 s durante 3 min a 25 °C en un espectrofotómetro DU-600 (Beckman ®). Una unidad de actividad SOD se definió como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50 % de la tasa de reducción de NBT.

La actividad de la CAT se determinó de acuerdo con la metodología de Roshan *et al.* (2018). Se preparó una mezcla de ensayo con 600 µL de buffer de fosfato 100 mM (pH 7) y 200 µL de  $H_2O_2$  10 mM. La reacción se inició añadiendo 200 µL de extracto de proteína a la mezcla. La descomposición del  $H_2O_2$  se determinó midiendo la absorbancia a 240 nm cada minuto durante 3 min a 25 °C en un espectrofotómetro DU-600 (Beckman ®). Una unidad de actividad CAT se definió como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la descomposición de 1 µmol de  $H_2O_2$  por minuto.

La actividad de las POD se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Corona-Carrillo *et al.* (2014). Se preparó una mezcla de ensayo con 870 µL de buffer de fosfato 50 mM (pH 6.8), 10 µL de extracto de proteína y 10 µL de guayacol 1 mM. La reacción se inició

añadiendo 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3 % (v/v) a la mezcla. La absorbancia se midió a 475 nm cada minuto durante 3 min a 25 °C en un espectrofotómetro DU-600 (Beckman ®). Una unidad de actividad POD se definió como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la peroxidación de 1 mmol de guayacol por minuto.

### **7.13. Análisis estadísticos**

Todas las pruebas fisiológicas y bioquímicas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. La distribución normal de los datos se confirmó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA unidireccional, seguido de una prueba post-hoc de Tukey a  $p < 0.05$  como nivel de significancia. Además, se realizó un análisis de correlación de Pearson ( $p < 0.05$ ) entre de la viabilidad, el estado redox, la conductividad eléctrica, la peroxidación lipídica, proteínas solubles y oxidadas, así como la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y POD) en las semillas de ambas especies. Los análisis se realizaron con los paquetes estadísticos SPSS® (ver. 15.0) y NCSS® para Windows.

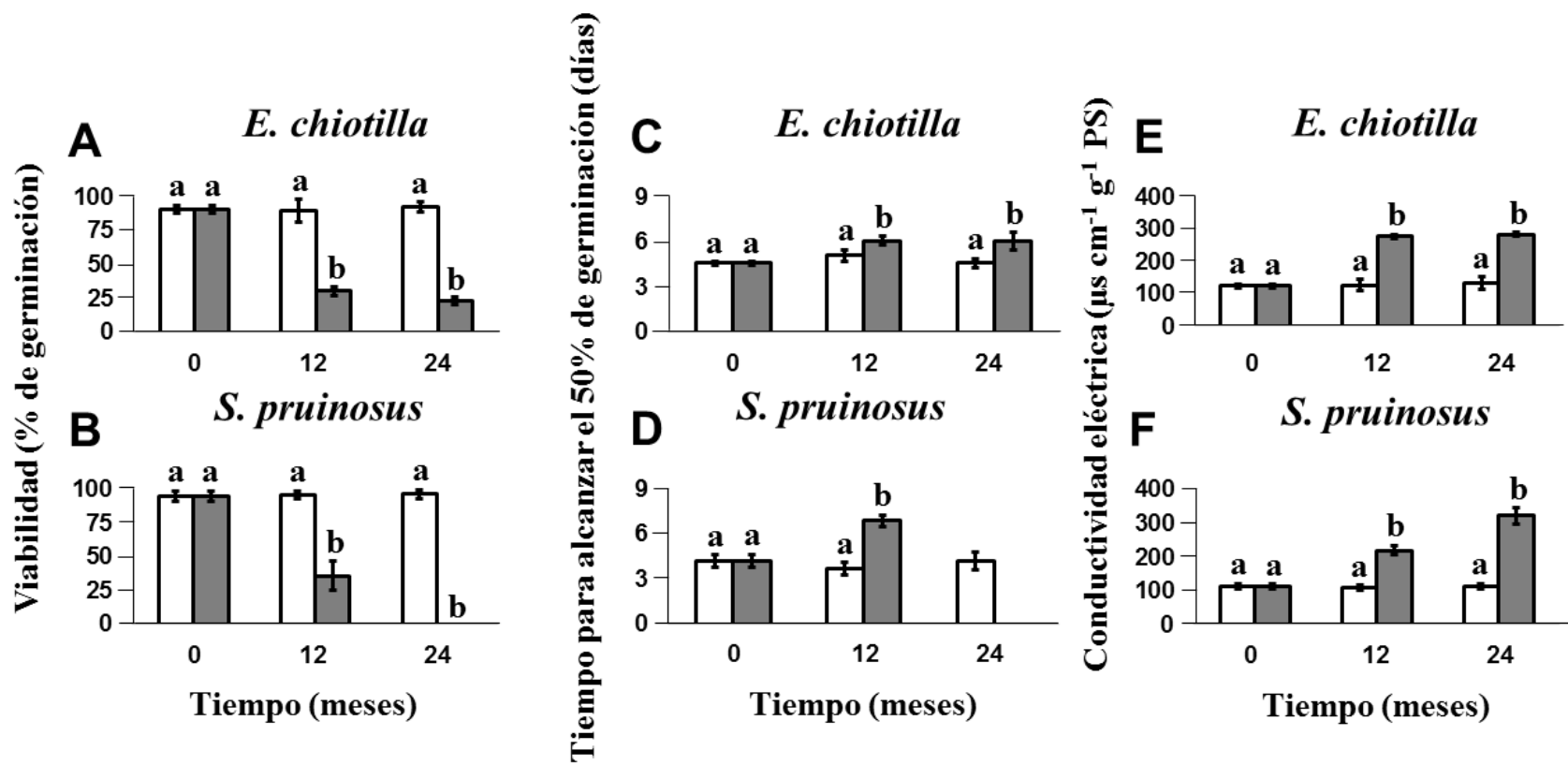
## 8. RESULTADOS

El contenido de humedad de las semillas secas recién cosechadas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* fue de  $8.6 \pm 0.5$  % y  $7.2 \pm 0.3$  %, respectivamente. Después del almacenamiento *ex situ* y el enterramiento *in situ*, el contenido de agua de las semillas no mostró diferencias significativas en comparación con las semillas recién cosechadas. No obstante, el contenido de humedad de las semillas enterradas de ambas especies aumentó a  $28.6 \pm 4.7$  % y  $28.1 \pm 3.7$  %, respectivamente, después de un día de lluvia, y luego disminuyó a 8-9 % y 7-8 %, respectivamente, 24 h después de la lluvia.

### 8.1. Experimento 1: Comparación entre el almacenamiento *ex situ* y el enterramiento *in situ*

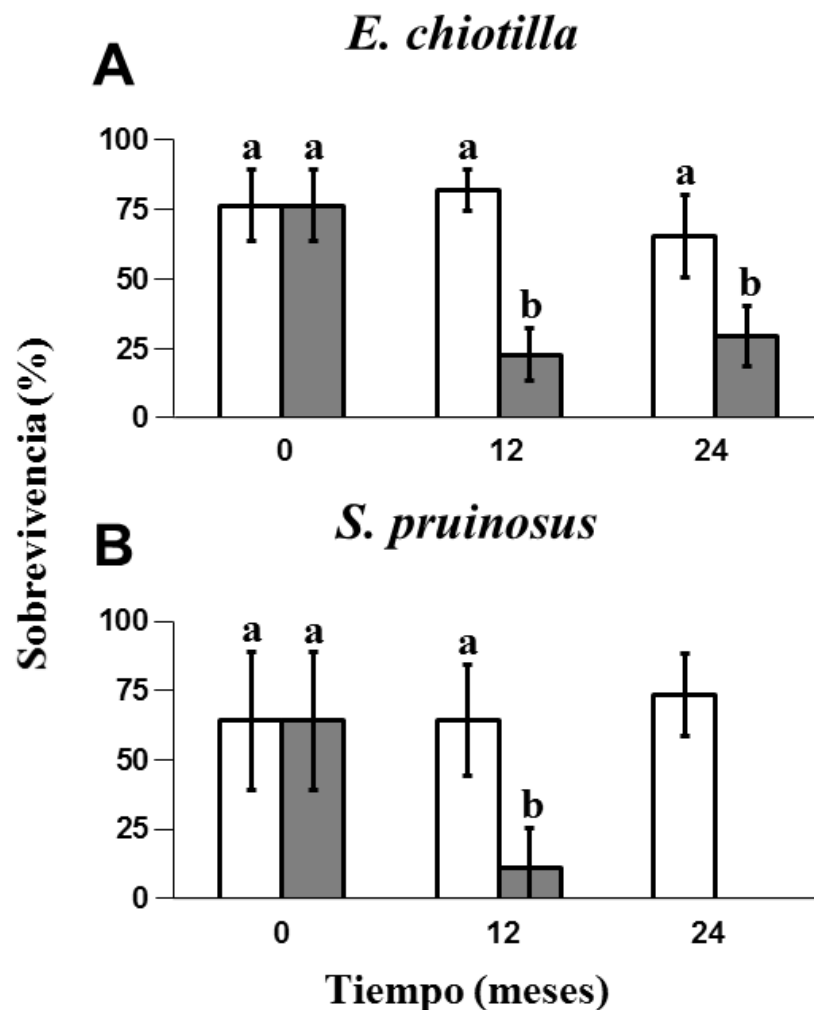
#### 8.1.1. Efecto del almacenamiento *ex situ* y el enterramiento *in situ* sobre la viabilidad y el vigor de las semillas

La viabilidad de las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* se mantuvo por encima del 90 % después de 24 meses de almacenamiento *ex situ* (Fig. 10A, B). No obstante, después de 12 meses de enterramiento, solo germinó el 35 % de las semillas de ambas especies. Con el tiempo la germinación se redujo: a los 24 meses de enterramiento, las semillas de *E. chiotilla* germinaron un  $23 \pm 2.8$  %, mientras que las de *S. pruinosus* estaban muertas (verificado mediante la prueba de CTT) (Fig.10, B). Además, después de 12 meses, los valores de  $T_{50}$  de ambas especies fueron respectivamente 1.2 y 1.6 días más altos en semillas enterradas *in situ* en comparación con los valores de  $T_{50}$  de semillas almacenadas *ex situ* (Fig. 10C, D). En el caso de *E. chiotilla*, los valores de  $T_{50}$  de las semillas de 24 meses también fueron significativamente mayores para las semillas enterradas. Por último, la fuga de soluto de las semillas de ambas especies enterradas *in situ* durante 12 y 24 meses fue más del doble que la de las semillas almacenadas *ex situ* (Fig.10E, F).

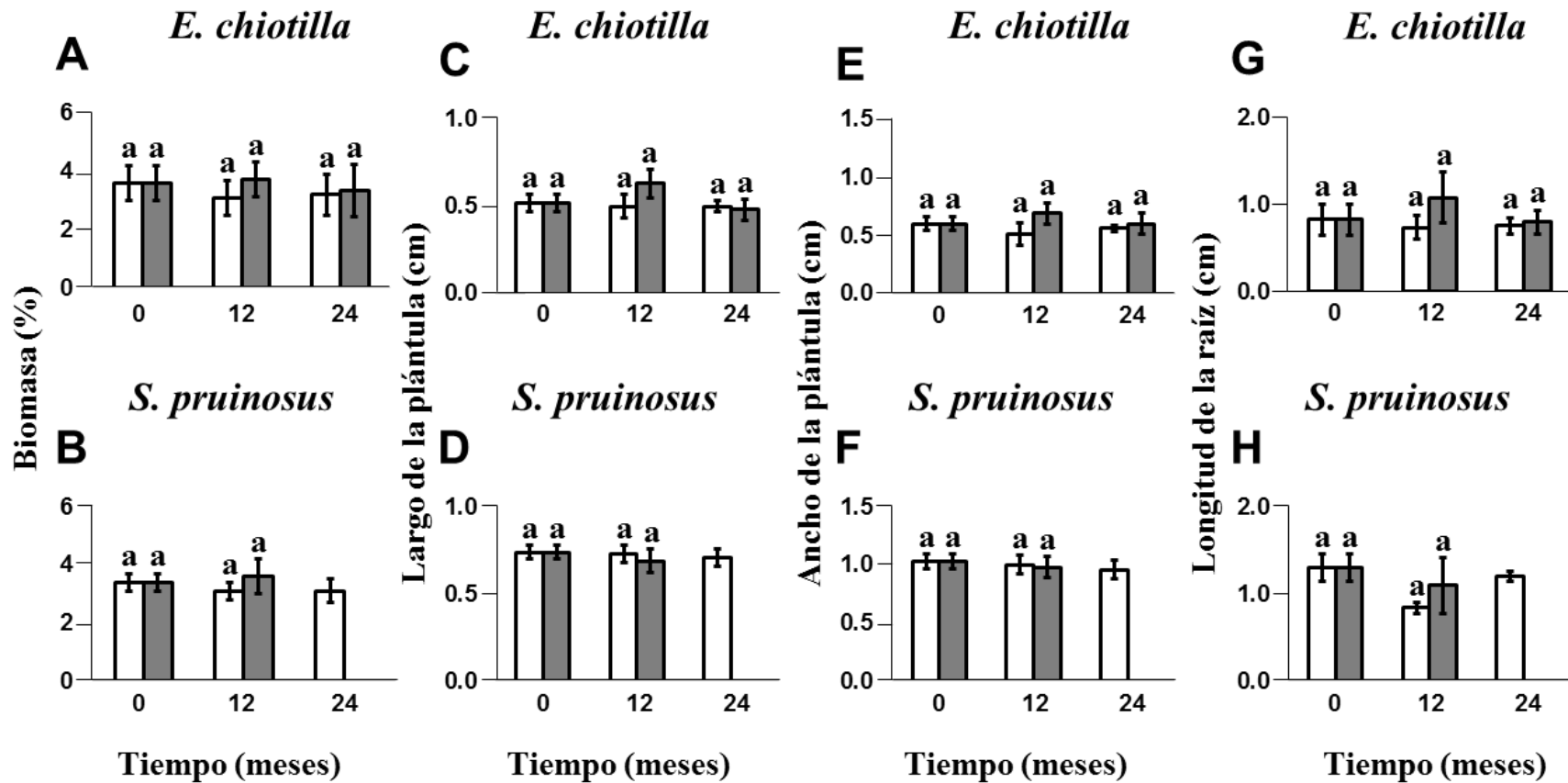


**Figura 10.** Efecto del almacenamiento *ex situ* (barras blancas) y el enterramiento *in situ* (barras grises) durante 0, 12 y 24 meses sobre la viabilidad (A, B), el T<sub>50</sub> (C, D) y la conductividad eléctrica (E, F) en las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*. La comparación de medias se realizó entre las semillas almacenadas en condiciones naturales y artificiales durante el mismo tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas.

La sobrevivencia de las plántulas provenientes de las semillas de *E. chiotilla* almacenadas *ex situ* durante 12 y 24 meses, fue mayor que la de las plántulas provenientes de las semillas enterradas *in situ* (Fig. 11). No obstante, las plántulas que sobrevivieron crecieron de manera similar, ya que no se observaron diferencias en las variables de crecimiento evaluadas (biomasa, largo y ancho de la plántula, y longitud de la raíz) (Fig. 12). Resultados similares se observaron en las plántulas de *S. pruinosus* originadas de las semillas almacenadas *ex situ* durante 12 meses (Fig. 11 y Fig. 12), tanto en sobrevivencia como en las variables de crecimiento.



**Figura 11.** Efecto del almacenamiento *ex situ* (barras blancas) y el enterramiento *in situ* (barras grises) durante 0, 12 y 24 meses en la sobrevivencia de las plántulas de *E. chiotilla* (A) y *S. pruinosus* (B). La comparación de medias se realizó entre las plántulas provenientes de las semillas almacenadas en condiciones naturales y artificiales durante el mismo tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas.



**Figura 12.** Efecto del almacenamiento *ex situ* (barras blancas) y el enterramiento *in situ* (barras grises) durante 0, 12 y 24 meses en el crecimiento de las plántulas de *E. chiotilla* (A, C, E y G) y *S. pruinosus* (B, D, F y H). La comparación de medias se realizó entre las plántulas provenientes de semillas almacenadas en condiciones naturales y artificiales durante el mismo tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas.



### 8.1.2. Efecto del almacenamiento *ex situ* y el enterramiento *in situ* sobre los marcadores de estrés oxidante

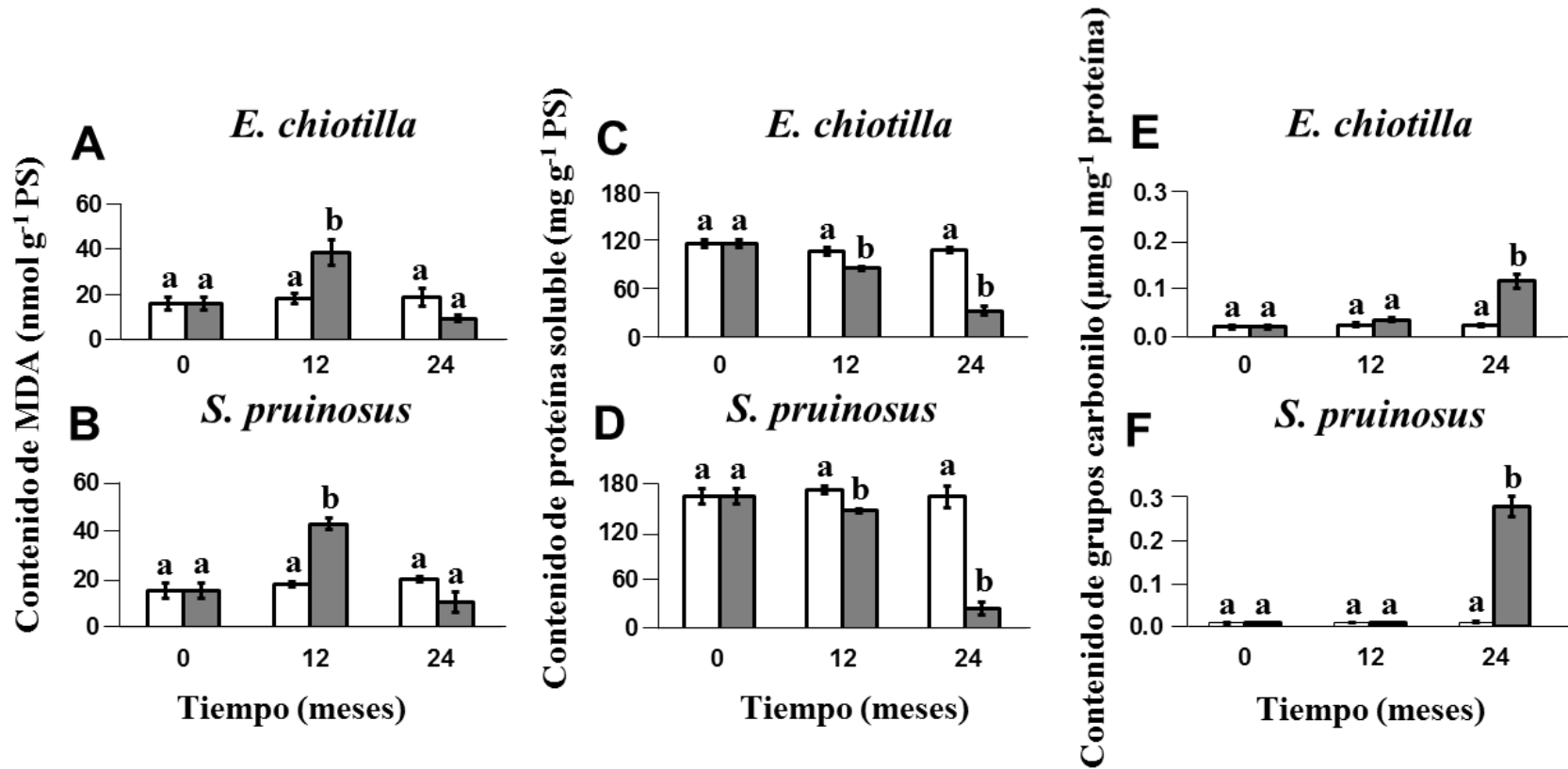
El contenido de MDA en las semillas recién cosechadas (2018) fue de aproximadamente  $16 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PS}$  para ambas especies. Las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* cosechadas en 2017 y enterradas *in situ* durante 12 meses exhibieron un contenido de MDA 2.4 veces mayor que el de las semillas almacenadas *ex situ*. Por el contrario, el contenido de MDA en las semillas cosechadas en 2016 y enterradas durante 24 meses fue bajo y no presentó diferencias significativas en comparación con el de las semillas almacenadas *ex situ* (Fig. 13A, B).

El contenido de proteínas solubles en las semillas recién cosechadas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* fue de  $118.8$  y  $164.8 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$ , respectivamente. En comparación con las semillas almacenadas *ex situ*, el contenido de proteínas solubles fue significativamente menor en las semillas enterradas *in situ* de ambas especies, particularmente después de 24 meses (Fig. 13C, D).

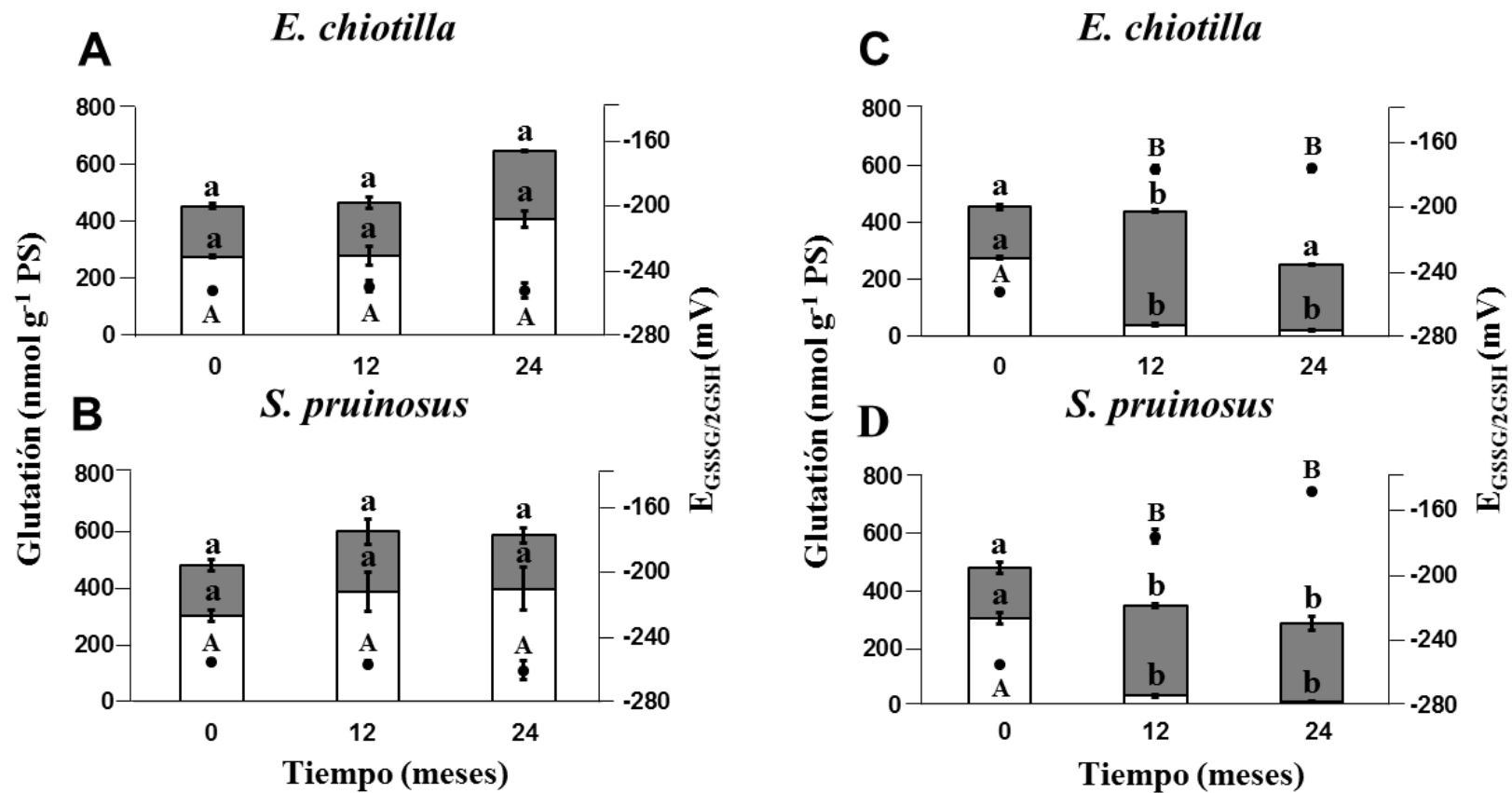
El contenido de grupos carbonilo en las proteínas de las semillas recién cosechadas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* fue de  $0.022$  y  $0.010 \mu\text{mol mg}^{-1}$  de proteína, respectivamente. Ambas especies mostraron contenidos similares en semillas cosechadas en 2017 y almacenadas *ex situ* o enterradas *in situ* durante 12 meses. No obstante, para las semillas cosechadas en 2016 y enterradas durante 24 meses, el contenido de grupos carbonilo en las proteínas de las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* fue 5.3 y 28.4 veces mayor, respectivamente, en comparación con las semillas almacenadas *ex situ* (Fig. 13E, F).

Los contenidos de GSH y GSSG en las semillas recién cosechadas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* fueron  $277.2$  y  $178.7 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PS}$ , y  $304.7$  y  $175.5 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PS}$ , respectivamente (Fig. 14). Las semillas de ambas especies almacenadas *ex situ* durante 12 y 24 meses mostraron contenidos significativamente mayores de GSH y menores de GSSG que las semillas enterradas *in situ*. Como resultado, los valores del  $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$  fueron significativamente menores en las semillas enterradas *in situ* en comparación con las semillas almacenadas *ex situ*, lo que indica que las semillas enterradas presentaron procesos oxidativos (Fig. 14).

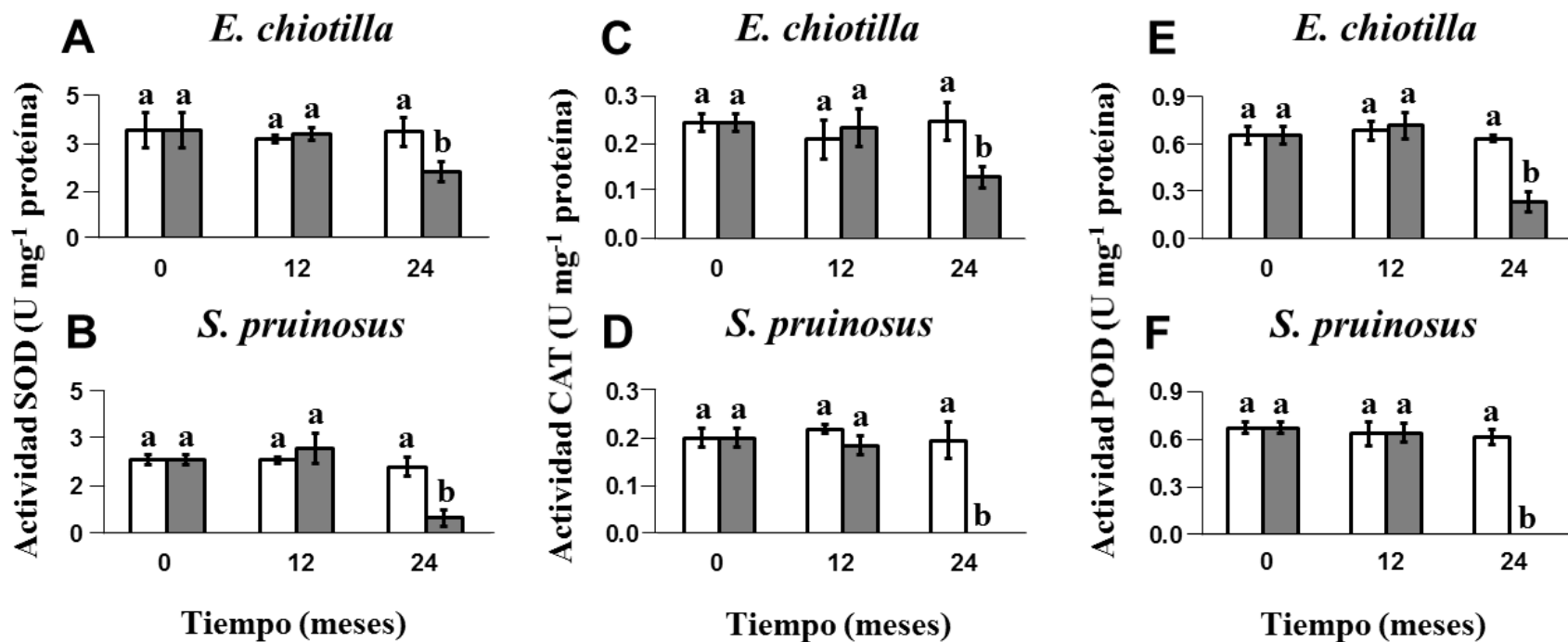
En ambas especies, la actividad de las enzimas antioxidantes mostró valores similares en las semillas recién cosechadas y en las semillas cosechadas en 2017, tanto almacenadas *ex situ* como enterradas *in situ* durante 12 meses. No obstante, en las semillas de *E. chiotilla* cosechadas en 2016 y enterradas durante 24 meses, la actividad de SOD, CAT y POD fue 1.6, 1.8 y 2.9 veces menor, respectivamente, en comparación con las semillas almacenadas *ex situ* (Fig. 15A, C, E). Asimismo, en las semillas de *S. pruinosis* enterradas *in situ* durante 24 meses, la actividad de SOD fue 4.2 veces menor, y la actividad de CAT y POD no fue detectable en comparación con las semillas almacenadas *ex situ* (Fig. 15B, D, F).



**Figura 13.** Efecto del almacenamiento *ex situ* (barras blancas) y el enterramiento *in situ* (barras grises) durante 0, 12 y 24 meses sobre el contenido de MDA (A y B), las proteínas solubles (C y D) y oxidasas (E y F) en las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosa*. La comparación de medias se realizó entre las semillas almacenadas en condiciones naturales y artificiales durante el mismo tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas.



**Figura 14.** Efecto del almacenamiento *ex situ* (A, B) y el enterramiento *in situ* (C, D) durante 0, 12 y 24 meses sobre el contenido de glutatión y el estado redox en las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosis*. GSH (barras blancas), GSSG (barras grises) y  $E_{GSSG/2GSH}$  (círculos negros, eje Y derecho). Las letras minúsculas indican la comparación de GSG y GSSH, mientras que las letras mayúsculas indican la comparación de  $E_{GSSG/2GSH}$  entre las semillas almacenadas en condiciones naturales y artificiales durante el mismo tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas.



**Figura 15.** Efecto del almacenamiento *ex situ* (barras blancas) y el enterramiento *in situ* (barras grises) durante 0, 12 y 24 meses sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD (A, B), CAT (C, D) y POD (E, F) en las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*. La comparación de medias se realizó entre las semillas almacenadas en condiciones naturales y artificiales durante el mismo tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas.

## 8.2. Experimento 2: Efecto de los factores ambientales (sequías y lluvias) en el deterioro de las semillas enterradas *in situ*

En las semillas de *E. chiotilla*, después de 12 meses de enterramiento, la viabilidad disminuyó al 83.5 %, con un descenso abrupto al 10 % después de 14 meses de enterramiento (Fig. 16A). En las semillas de *S. pruinosus* se observó un patrón similar, pero la disminución de la viabilidad ocurrió antes, entre 6 y 12 meses después del enterramiento (Fig. 16B). El  $T_{50}$  en los lotes de semillas vivas restantes aumentó progresivamente durante el enterramiento de ambas especies, lo que resultó en un aumento de 1.7 veces en el tiempo que tardan en obtener el 50 % de la germinación total después de 14 meses en las semillas de *E. chiotilla* y un aumento de 1.4 veces después de 12 meses de enterramiento en las semillas de *S. pruinosus* (Fig. 16C, D).

Las semillas presentaron síntomas de deterioro en los perfiles de CE durante el enterramiento, con un patrón similar al de pérdida de viabilidad. En las semillas de *E. chiotilla*, la CE aumentó 1.3 veces durante los primeros 12 meses de enterramiento y luego 1.7 veces entre los 12 y 14 meses (Fig. 16E). De manera similar, la CE en las semillas de *S. pruinosus* aumentó 1.7 veces entre los 6 y 12 meses de enterramiento, y 1.6 veces entre los 12 y 14 meses, momento en el cual todas las semillas ya estaban muertas (Fig. 16F).

El contenido de MDA en las semillas de *E. chiotilla* aumentó progresivamente 2.6 veces durante los primeros 12 meses de enterramiento, antes de la drástica pérdida de viabilidad. Después de 14 meses de enterramiento, el contenido de MDA disminuyó 4.4 veces, lo que resultó en un aumento significativo de semillas muertas (Fig. 17A). Un patrón similar se observó en las semillas de *S. pruinosus*, con un aumento de 2 veces en el contenido de MDA a los 6 meses en comparación con las semillas recién cosechadas, seguido de una disminución de 3.6 veces a los 12 meses de enterramiento (Fig. 17B).

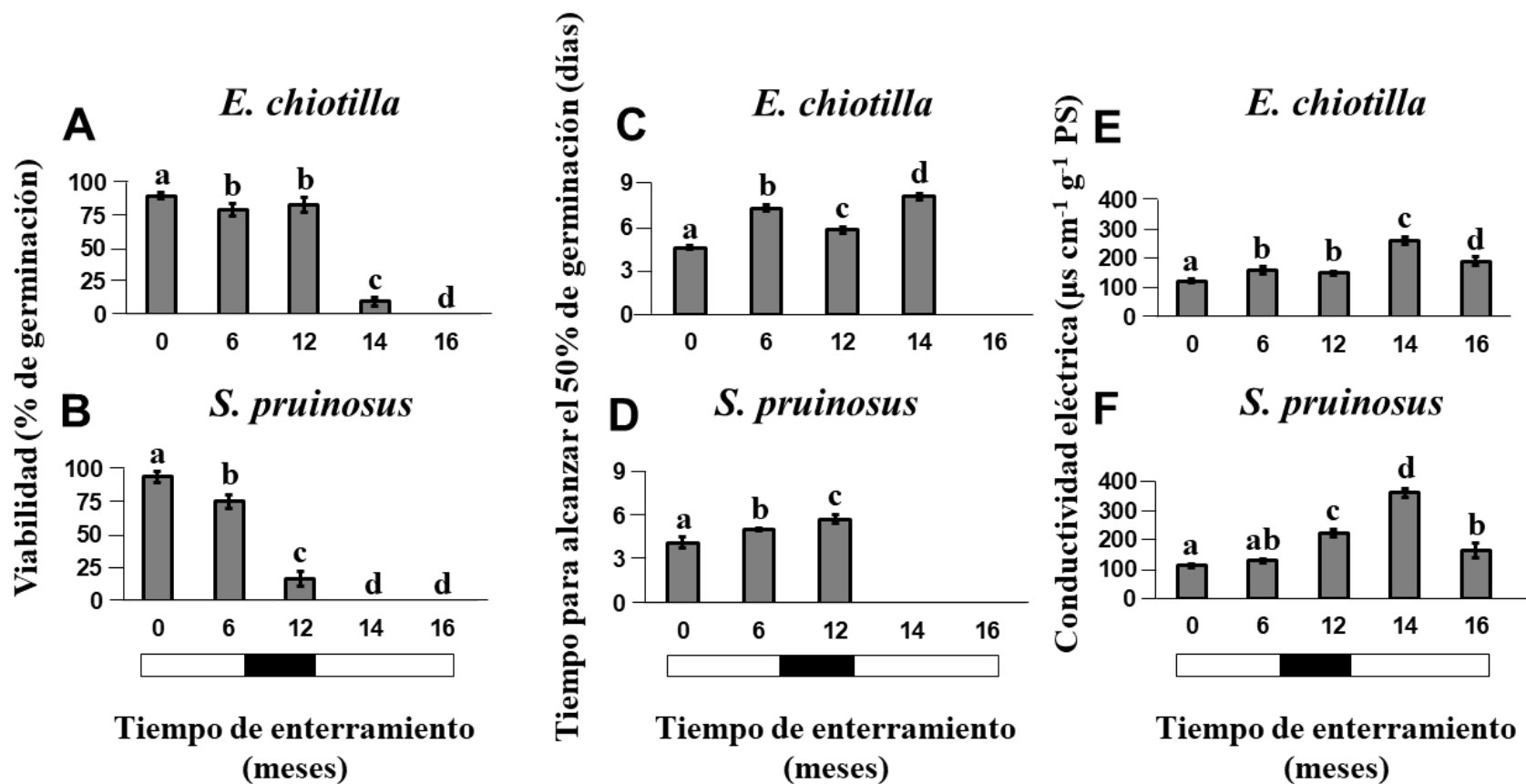
En las semillas de *E. chiotilla*, el contenido de proteínas solubles disminuyó ligeramente durante el periodo de enterramiento, mientras las semillas permanecieron vivas. No obstante, después de 14 meses de enterramiento, el contenido de proteínas se redujo 3 veces, momento en el que la mayoría de las semillas estaban muertas (Fig. 17C). Por otro lado, en las semillas de *S. pruinosus*, se observó una ligera disminución en el contenido de proteínas solubles durante los primeros 12 meses de enterramiento, lo que coincidió con una reducción de la viabilidad. Posteriormente, a los 14 meses de enterramiento el

contenido de proteínas solubles disminuyó 10.6 veces, momento en el que todas las semillas estaban muertas (Fig. 17D).

El contenido de grupos carbonilo en las proteínas de las semillas de ambas especies no cambió significativamente durante los primeros 12 meses de enterramiento. No obstante, se observó un aumento significativo en las proteínas oxidadas, de manera concomitante con la muerte de las semillas de ambas especies, a los 14 y 16 meses de enterramiento (Fig. 17E, F).

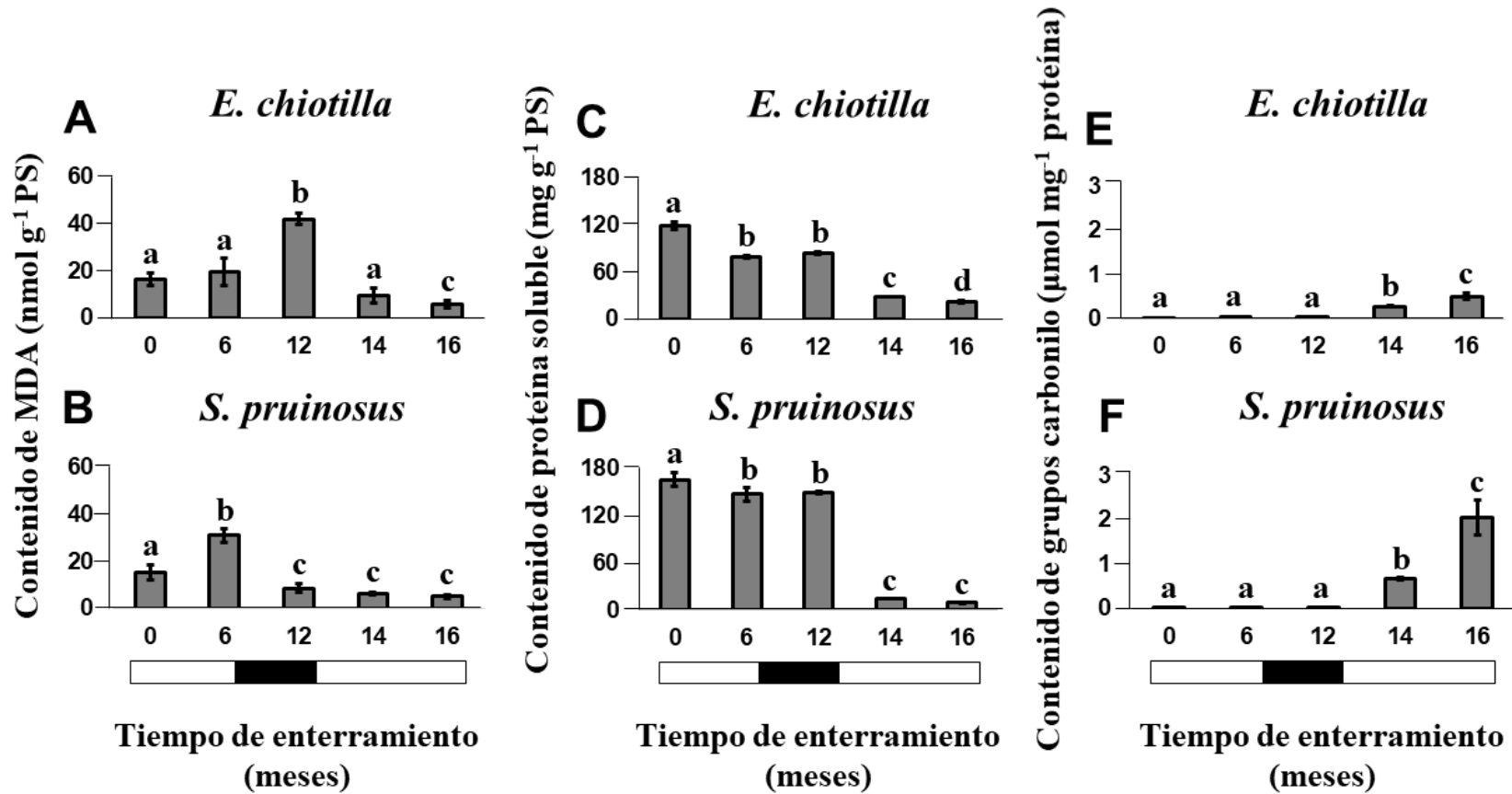
En las semillas de *E. chiotilla*, el contenido de GSH disminuyó principalmente entre los 12 y los 14 meses, coincidiendo con la pérdida de viabilidad, mientras que el contenido de GSSG no mostró cambios significativos durante ese período (Fig. 18). Este cambio en los niveles de GSH resultó en una alteración del  $E_{GSSG/2GSH}$ , que pasó a un estado más oxidante, de -236.2 a los 12 meses, a -176.8 mV a los 14 meses. El  $E_{GSSG/2GSH}$  continuó volviéndose más oxidante, alcanzando -154.6 mV después de 16 meses de enterramiento (Fig. 18A), momento en el cual las semillas ya estaban muertas. Un patrón similar fue observado en las semillas de *S. pruinosus* durante los 12 meses de enterramiento. En este período, los valores de  $E_{GSSG/2GSH}$  cambiaron de -255.4 a -175.6 mV y alcanzaron -150.1 mV a los 14 meses, cuando las semillas ya estaban muertas (Fig. 18B). En conjunto, estos resultados sugieren que la muerte de las semillas durante el enterramiento va acompañada de un cambio en el  $E_{GSSG/2GSH}$  a un estado más oxidante.

También se observó una drástica disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes durante la pérdida de viabilidad en las semillas de ambas especies enterradas *in situ*. Este fenómeno ocurrió entre los 12 y los 14 meses en *E. chiotilla* y entre los 6 y los 12 meses de enterramiento en semillas de *S. pruinosus*. Durante este período se perdió más del 50 % de la actividad de las enzimas antioxidantes (Fig. 19).

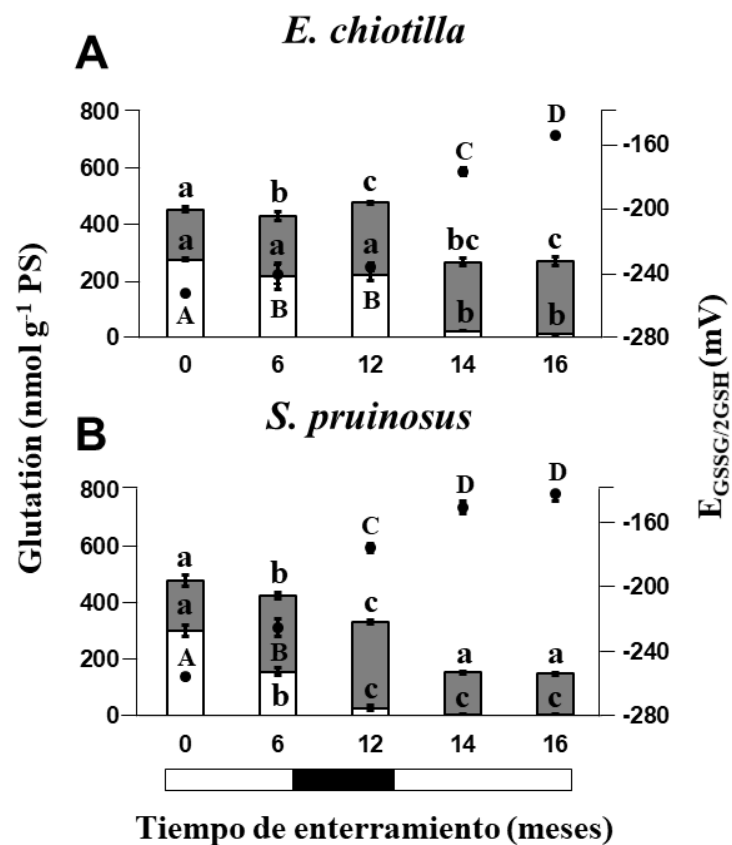


**Figura 16.** Viabilidad (A, B),  $T_{50}$  (C, D) y conductividad eléctrica (E, F) en las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosa* enterradas *in situ* durante 0, 6, 12, 14 y 16 meses. Las semillas enterradas *in situ* estuvieron expuestas a dos períodos de lluvia (barra blanca) y a un período de sequía (barra negra), como se indica debajo de los numerales que representan el tiempo de enterramiento. Letras diferentes indican diferencias significativas.

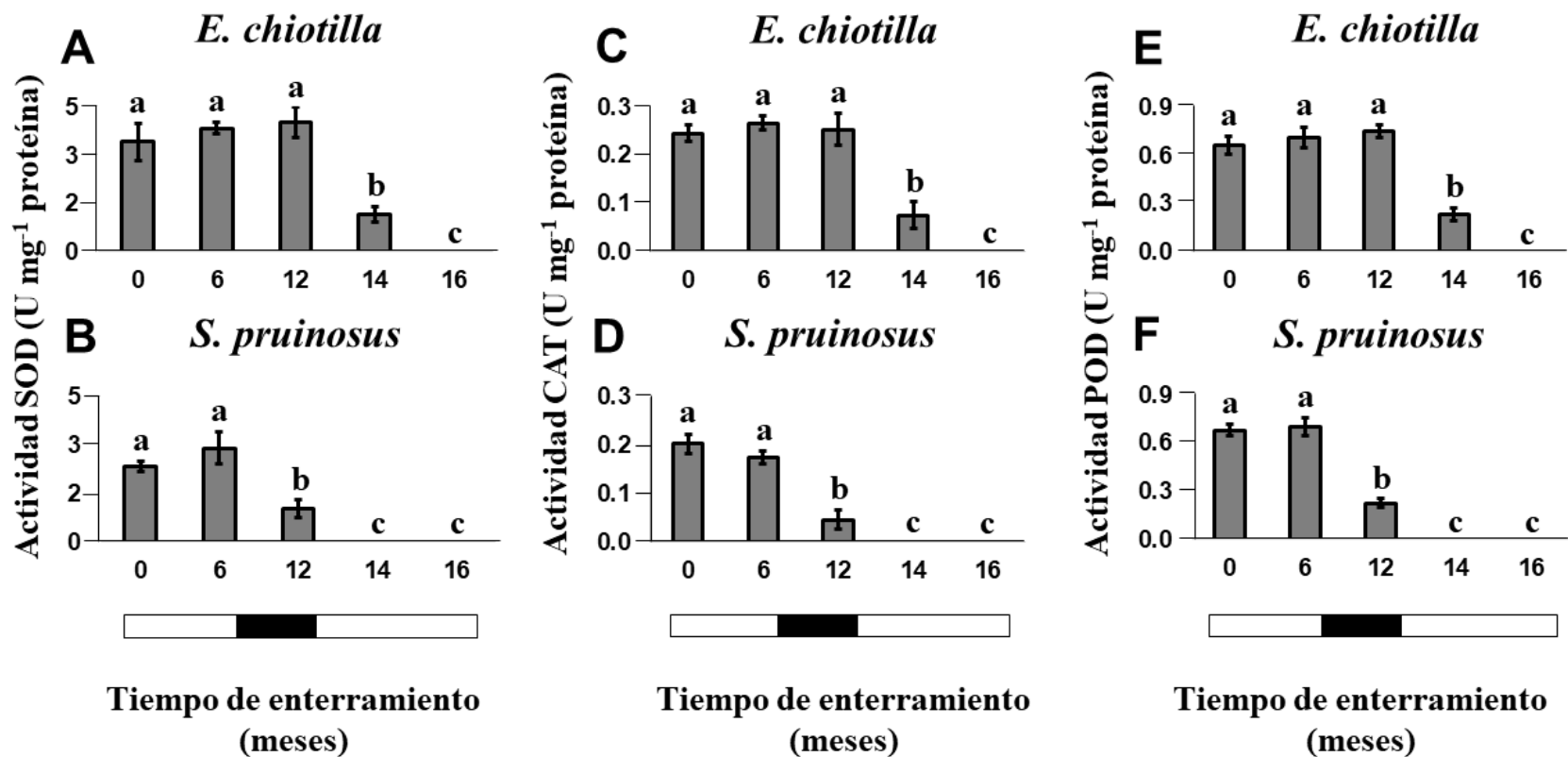




**Figura 17.** Contenido de MDA (A, B), proteínas solubles (C, D) y proteínas oxidadas (E, F) en las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosis* enterradas *in situ* durante 0, 6, 12, 14 y 16 meses. Las semillas enterradas *in situ* estuvieron expuestas a dos períodos de lluvia (barra blanca) y a un período de sequía (barra negra), como se indica debajo de los numerales que representan el tiempo de enterramiento. Letras diferentes indican diferencias significativas.



**Figura 18.** Contenido de glutatión y estado redox en las semillas de *E. chiotilla* (A) y *S. pruinosus* (B) enterradas *in situ* durante 0, 6, 12, 14 y 16 meses. GSH (barras blancas), GSSG (barras grises) y  $E_{GSSG/2GSH}$  (círculos negros, eje Y derecho). Las semillas enterradas *in situ* estuvieron expuestas a dos períodos de lluvia (barra blanca) y a un período de sequía (barra negra), como se indica debajo de los numerales que representan el tiempo de enterramiento. Letras minúsculas indican la comparación de GSH y GSSG, mientras que las letras mayúsculas indican la comparación de  $E_{GSSG/2GSH}$ . Letras diferentes indican diferencias significativas.



**Figura 19.** Actividad de las enzimas antioxidantes SOD (A, B), CAT (C, D) y POD (E, F) en las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* enterradas *in situ* durante 0, 6, 12, 14 y 16 meses. Las semillas enterradas *in situ* estuvieron expuestas a dos períodos de lluvia (barra blanca) y a un período de sequía (barra negra), como se indica debajo de los numerales que representan el tiempo de enterramiento. Letras diferentes indican diferencias significativas.

### 8.2.1. Análisis de correlación del experimento 2

La viabilidad de las semillas mostró una correlación negativa con el estado redox celular ( $E_{GSSG/2GSH}$ ), la fuga de solutos y el contenido de proteínas oxidadas, mientras que el contenido de proteínas solubles y la actividad de las enzimas antioxidantes mostraron una correlación positiva con la viabilidad. No se observó una correlación significativa entre el contenido de MDA y la viabilidad (Tablas 4 y 5). Resultados similares se obtuvieron en el análisis de correlación del experimento 1 (datos no mostrados).

**Tabla 4.** Correlación entre la viabilidad, el estado redox ( $E_{GSSG/2GSH}$ ), la conductividad eléctrica (CE), el contenido de MDA, las proteínas oxidadas (PO), las proteínas solubles (PrS) y la actividad antioxidante de las enzimas SOD, CAT, POD en las semillas de *E. chiotilla*. \*Correlación significativa a  $p < 0.05$ .

	Viabilidad	$E_{GSSG/2GSH}$	CE	MDA	PO	PrS	SOD	CAT	POD
<b>Viabilidad</b>	1								
<b><math>E_{GSSG/2GSH}</math></b>	-0.96*	1							
<b>CE</b>	-0.98*	0.57*	1						
<b>MDA</b>	-0.23	-0.49	0.25	1					
<b>PO</b>	-0.73*	0.97*	-0.74*	-0.34	1				
<b>PrS</b>	0.80*	-0.88*	-0.81*	0.36	-0.81*	1			
<b>SOD</b>	0.53*	-0.93*	-0.55*	0.58*	-0.77*	0.82*	1		
<b>CAT</b>	0.56*	-0.95*	-0.53*	0.49	-0.75*	0.77*	0.70*	1	
<b>POD</b>	0.39	-0.95*	-0.34	0.72*	-0.61*	0.71*	0.86*	0.86*	1

**Tabla 5.** Correlación entre la viabilidad, el estado redox ( $E_{GSSG/2GSH}$ ), la conductividad eléctrica (CE), el contenido de MDA, las proteínas oxidadas (PO), las proteínas solubles (PrS) y la actividad antioxidante de las enzimas SOD, CAT, POD en las semillas de *S. prunosus*. \*Correlación significativa a  $p < 0.05$ .

	Viabilidad	$E_{GSSG/2GSH}$	CE	MDA	PO	PrS	SOD	CAT	POD
<b>Viabilidad</b>	1								
<b><math>E_{GSSG/2GSH}</math></b>	-0.73*	1							
<b>CE</b>	-0.98*	0.53*	1						
<b>MDA</b>	0.10	-0.55*	-0.13	1					
<b>PO</b>	-0.77*	0.88*	0.83*	-0.64*	1				
<b>PrS</b>	0.84*	-0.98	-0.92*	0.51*	-0.91*	1			
<b>SOD</b>	0.81*	-0.79	-0.83*	0.55*	-0.94*	0.84*	1		
<b>CAT</b>	0.85*	-0.88	-0.83*	0.53*	-0.98*	0.93*	0.93*	1	
<b>POD</b>	0.72*	-0.78	-0.76*	0.58*	-0.88*	0.76*	0.92*	0.97*	1

## 9. DISCUSIÓN

En condiciones *in situ*, las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* forman un banco de semillas persistente a corto plazo (Fig. 10A, B y Fig. 16A, B). Resultados similares han sido reportados para otras cactáceas, como *Opuntia rastrera* (Montiel & Montaña, 2003), *Arthrocerus glaziovii*, *Arthrocerus melanurus* (Cheib & García, 2012), *Harrisia fragrans* (Goodman *et al.*, 2012), *Stenocereus stellatus* (Álvarez-Espino *et al.*, 2014), *Discocactus bahiensis* (Nascimento y Meiado, 2017), y *Echinopsis* y *Gymnocalycium* spp (Lindow-López *et al.*, 2018).

En el experimento 1 se observó que el envejecimiento de las semillas de ambas especies almacenadas *ex situ* fue más lento que en las semillas enterradas *in situ* (Fig. 10-15). Durante el almacenamiento *ex situ*, las semillas se mantuvieron en condiciones secas a  $25 \pm 3$  °C, con una humedad relativa de  $20 \pm 2$  %, lo que resultó en un bajo contenido de humedad, entre 7 y 9 %. Una posible explicación es que las semillas pudieron haber alcanzado un estado vítreo, lo que restringió la difusión molecular y ralentizó las reacciones bioquímicas relacionadas con el deterioro de las semillas (Walters *et al.*, 2005; Ballesteros & Walters, 2011). No obstante, sería necesario realizar un estudio biofísico del contenido de agua de las semillas a diferentes temperaturas para confirmar esta explicación.

Otras variables que pudieron haber influido fueron las lluvias y la temperatura. Las semillas del experimento 1, de ambas especies enterradas *in situ* durante 12 y 24 meses, respectivamente, estuvieron expuestas a uno o dos períodos de lluvia, con fluctuaciones de temperatura (hasta 33 °C), lo que provocó un aumento en el contenido de humedad, a diferencia de las semillas almacenadas *ex situ* (Anexo I).

Las semillas enterradas *in situ* experimentaron un aumento de hasta el 28 % en su contenido de humedad tras la lluvia. No obstante, después de 24 horas sin lluvias, se desecaron, alcanzando contenidos de humedad entre el 7 % y el 9 %. Estos ciclos de rehidratación/deshidratación a los que estuvieron expuestas las semillas enterradas podrían considerarse como un pretratamiento (priming) natural. Según Farooq *et al.* (2019), el priming en semillas ofrece diversos beneficios a nivel fisiológico y bioquímico. Por ejemplo, acelera y uniformiza el proceso de germinación debido a la activación enzimática, la acumulación de metabolitos y la reparación de moléculas. Además, el priming induce la tolerancia a estreses bióticos y abióticos mediante la acumulación de proteínas de defensa.

En el caso de las semillas de las especies estudiadas y almacenadas *in situ*, los ciclos de rehidratación/deshidratación pudieron haber permitido que las semillas atravesaran las fases I y II de imbibición. No obstante, al no contar con las condiciones adecuadas (humedad y luz) para avanzar hacia la fase III, podrían haber ocurrido procesos oxidativos que condujeron al deterioro de las semillas. Las altas temperaturas (de hasta 33 °C) y el aumento en el contenido de humedad (de hasta 28 %) que experimentaron las semillas en el suelo son similares a las condiciones de envejecimiento acelerado. En estas circunstancias, las semillas ya no se encuentran en estado vítreo, lo que podría haber contribuido al deterioro (Ballesteros & Walters, 2011; Zhou *et al.*, 2020).

Un factor limitante en el experimento 1 fue el uso de semillas cosechadas en diferentes años, en los que el ambiente materno fue distinto. Dado que, antes de la dispersión, la longevidad de las semillas puede verse afectada durante su formación y maduración en la planta madre (Long *et al.*, 2015; Leprince *et al.*, 2017). Además, en este experimento, las condiciones ambientales a las cuales estuvieron expuestas las semillas enterradas *in situ* fueron diferentes, dependiendo si el almacenamiento fue por 12 o 24 meses. Las semillas que permanecieron enterradas durante 24 meses experimentaron dos temporadas de lluvias, a diferencia de las semillas enterradas durante 12 meses. Por lo tanto, para aclarar si las diferencias en la pérdida de viabilidad observadas entre el almacenamiento *in situ* y *ex situ* en el experimento 1 estaban relacionadas con el desequilibrio redox como consecuencia del enterramiento *in situ*, se realizó el experimento 2.

En el experimento 2, se utilizaron semillas de la misma cosecha para evitar el impacto del ambiente materno en la longevidad y tener en cuenta el ciclo de rehidratación/deshidratación de las semillas. En este escenario, las semillas de *E. chiotilla* mantuvieron una alta viabilidad durante los primeros 12 meses de enterramiento, periodo durante el cual estuvieron expuestas a condiciones ambientales naturales de lluvias y sequías. Esto podría explicarse por la elevada actividad de las enzimas antioxidantes observada en las semillas a lo largo de este periodo. En las semillas de *S. pruinosus*, las condiciones del suelo húmedo durante los primeros seis meses fueron perjudiciales, ya que la viabilidad disminuyó aceleradamente durante la estación seca.

El deterioro más rápido de las semillas de *S. pruinosus* en comparación con las de *E. chiotilla* durante el enterramiento *in situ* podría estar relacionado con las características ecológicas y/o evolutivas de cada especie. Por ejemplo, *E. chiotilla* se reproduce

exclusivamente por semillas, mientras que, si bien *S. pruinosus* también se reproduce sexualmente, es una especie altamente cultivada que se propaga vegetativamente en la región semiárida del Valle de Tehuacán, México. Además, esta última ha experimentado un proceso de domesticación desde hace aproximadamente 8,000 años (Yáñez-López *et al.*, 2016). Aunque la domesticación ha favorecido la producción de frutos grandes con pocas espinas y pulpa de diferentes colores, la falta de variabilidad genética podría estar afectando las características fisiológicas y bioquímicas de las semillas, haciéndolas más susceptibles al deterioro durante el almacenamiento. Futuros estudios podrían explorar estas diferencias a nivel genético o fisiológico para comprender mejor los mecanismos de adaptación de cada especie.

En esta investigación no se observó una correlación entre el contenido de MDA y el deterioro de las semillas (Tablas 4 y 5). Los cambios en el contenido de MDA fueron fluctuantes durante la pérdida de viabilidad y no coincidieron con los patrones de desequilibrio en el estado redox celular (Fig. 17A, B y Fig. 18A, B). En el experimento 2, a los 14 meses de enterramiento en semillas de *E. chiotilla* y 12 meses en semillas de *S. pruinosus*, se registró una marcada disminución en la actividad de SOD, CAT y POD (Fig. 19). Si asumimos que dicha disminución conduciría a un estado celular más oxidante, como indica el aumento en los valores de  $E_{GSSH/2GSH}$ , se habría esperado un aumento significativo en el contenido de MDA, lo cual no fue el caso. Con base en estos datos, se sugiere que el MDA no es un buen marcador de daño oxidante durante el almacenamiento de las semillas de cactáceas estudiadas. De acuerdo con Morales & Munné-Bosch (2019), debe tenerse cuidado al interpretar los datos obtenidos utilizando el ensayo de TBA y el producto MDA como marcador de estrés oxidante, ya que la peroxidación lipídica no solo es provocada por ERO, sino también por la actividad de lipoxigenasas producidas por patógenos. Asimismo, compuestos como los carbohidratos pueden interactuar con el TBA, lo que podría generar interpretaciones erróneas. Resultados similares a los de este estudio, en los que no se encontró relación entre el estrés oxidante y el contenido de MDA, se han reportado en semillas envejecidas de *Vellozia alata* (Munné-Bosch *et al.*, 2011) y *Glycine max* (Priestley & Leopold, 1979; Priestley *et al.*, 1980). Además, aunque el contenido de proteínas oxidadas se correlacionó negativamente con la pérdida de viabilidad (Tabla 5), la oxidación de proteínas se observó principalmente en aquellos casos en los que la mayoría de las semillas no germinaron o estaban muertas (Fig. 17E, F). Por lo tanto, el contenido

de grupos carbonilo tampoco podría considerarse un marcador de estrés oxidante en las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*.

La reducción en los niveles de GSH en las semillas de las especies estudiadas resultó en un aumento en los valores de  $E_{GSSG/2GSH}$  durante el almacenamiento *in situ* (Fig. 18). Las semillas de *E. chiotilla* enterradas registraron valores de  $E_{GSSG/2GSH}$  de -176.8 mV a los 14 meses de enterramiento (Fig. 18A), mientras que en *S. pruinosus*, se registraron valores de  $E_{GSSG/2GSH}$  -175.6 mV a los 12 meses (Fig. 18B), lo cual coincide con los momentos en los que se observó una reducción en la viabilidad de cada una de estas especies (Fig. 16A, B). Posteriormente, cuando la mayoría de las semillas ya estaban muertas, se registraron valores más oxidantes de  $E_{GSSG/2GSH}$ , aproximadamente -150 mV. De acuerdo con Kranner *et al.* (2010), en semillas con pérdida de viabilidad se observan valores de  $E_{GSSG/2GSH}$  entre -180 y -160 mV, mientras que valores más oxidantes, alrededor de -160 mV, indican que las semillas han muerto. Resultados similares se han observado en semillas de *S. maritima*, que mostraron valores de  $E_{GSSG/2GSH}$  entre -180 y -160 mV cuando perdieron viabilidad (Seal *et al.*, 2010). En semillas de otras especies, como *Hordeum vulgare*, *Daucus carota*, *C. sativus*, *R. sativus* y *Lactuca sativa*, se ha informado que la pérdida de viabilidad ocurre en rangos de  $E_{GSSG/2GSH}$  entre -200 y -180 mV (Roach *et al.*, 2018; Stegner *et al.*, 2022).

En conjunto, los datos confirman que el desequilibrio en el estado redox celular acompaña a la pérdida de viabilidad en las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* enterradas *in situ*. Long *et al.*, 2011 sugirieron que los ciclos de rehidratación/deshidratación son clave para la sobrevivencia de las semillas en el suelo, a través de un mecanismo en el que podría estar implicada la recuperación del sistema antioxidante del glutatión. No obstante, los datos obtenidos en este trabajo no respaldan esta hipótesis para las semillas de las cactáceas estudiadas. En *E. chiotilla*, durante el enterramiento *in situ* por 12 meses, con un ciclo de lluvia/sequía, el contenido de GSH no se vio afectado. Por otro lado, en las semillas de *S. pruinosus*, las condiciones de humedad durante los primeros seis meses de enterramiento condujeron a una disminución marcada en los niveles de GSH, la cual se exacerbó durante la estación seca. Pero, para ambas especies, la actividad de las enzimas antioxidantes se mantuvo alta, lo que sugiere que la homeostasis del GSH se regula de manera diferente entre las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*. Se requieren estudios posteriores en los que se investigue la regulación del metabolismo del glutatión (síntesis y degradación) y las respuestas antioxidantes durante la exposición a los ciclos de rehidratación/deshidratación durante el enterramiento *in situ* a corto y largo plazo.



Estos hallazgos tienen importantes implicaciones ecológicas para la sobrevivencia y regeneración de poblaciones de estas especies en su hábitat natural. La capacidad de formar bancos de semillas persistentes a corto plazo podría proporcionar una ventaja adaptativa en ambientes áridos, permitiendo a las poblaciones sobrevivir a períodos de condiciones desfavorables. Sin embargo, en el contexto del cambio climático y la creciente aridez en muchas regiones, la sensibilidad de las semillas a los ciclos de rehidratación/deshidratación podría representar un desafío para la persistencia a largo plazo de estas especies. A medida que los ciclos de rehidratación/deshidratación se intensifiquen, las dinámicas de viabilidad y germinación de las semillas podrían verse alteradas, lo que afectaría la capacidad de regeneración natural de las poblaciones. Esto subraya la necesidad de considerar estrategias de conservación que integren tanto los factores ecológicos como los efectos del cambio climático en la preservación de especies vegetales clave en ecosistemas áridos.

## 10. CONCLUSIONES

En esta investigación se observó que las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* almacenadas *ex situ* mantuvieron una alta viabilidad y vigor durante hasta 24 meses, sin que se registraran cambios en los variables bioquímicas evaluadas. En contraste, en condiciones *in situ*, el deterioro de las semillas de ambas especies se aceleró, y la pérdida de viabilidad se relacionó con un cambio en  $E_{GSSG/2GSH}$  hacia un estado más oxidante y una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes. No obstante, no se encontró relación entre el deterioro de las semillas y los contenidos de MDA y proteínas oxidadas, lo que sugiere que estos compuestos no son buenos marcadores del estrés oxidante durante el almacenamiento de las semillas de las cactáceas estudiadas.

Los resultados obtenidos destacan la importancia del estado redox celular, especialmente del sistema de glutatión, en la longevidad de las semillas de las cactáceas estudiadas en este trabajo. No obstante, también ponen de manifiesto la complejidad de los mecanismos involucrados en la tolerancia al almacenamiento *in situ*, sugiriendo que, además del estrés oxidante, otros factores podrían estar influyendo en la viabilidad y el vigor de las semillas.

## 11. PERSPECTIVAS

Para la adecuada conservación (tanto *ex situ* como *in situ*) y manejo de los recursos naturales, es fundamental realizar estudios sobre bancos de semillas *in situ* y *ex situ* (naturales y artificiales). Son pocos los estudios existentes, y aún menos los que se han realizado en cactáceas, sobre el efecto de la temperatura, la humedad y el tiempo durante el almacenamiento *ex situ* en la viabilidad de las semillas. A este problema se añade la falta de conocimiento sobre los bancos de semillas de cactáceas en el suelo, los cuales son esenciales para comprender la dinámica de las comunidades vegetales, preservar de forma natural la variabilidad genética y sostener o restablecer las poblaciones y comunidades vegetales alteradas por causas antropocéntricas o naturales.

Por lo anterior, es necesario realizar un mayor número de estudios sobre los bancos de semillas de cactáceas a lo largo del tiempo, en los que, además de evaluar la viabilidad de las semillas, se investigue los mecanismos bioquímicos y fisiológicos relacionados con el deterioro y muerte de las semillas. Se sugiere estudiar antioxidantes no enzimáticos, como los tocoferoles, tocotrienoles y tococromanoles, que tienen la capacidad de neutralizar los radicales peroxilo derivados de la oxidación de lípidos de membrana, los cuales se ha reportado que están involucrados en el deterioro de las semillas. Este conocimiento permitiría comprender mejor el proceso de deterioro y contribuiría a mejorar la expectativa de vida de las semillas conservadas *ex situ* y de las poblaciones naturales que enfrentan retos derivados del cambio climático.

Finalmente, se reconocen las limitaciones de este estudio. Aunque se controlaron varios factores, como el año de cosecha y se consideraron las condiciones ambientales (períodos de sequía y lluvia) en el experimento 2, otros aspectos, como las variaciones microambientales (temperatura, humedad y pH del suelo) y la presencia de microorganismos en el sitio de enterramiento, podrían haber influido en los resultados. Además, el período de estudio de 24 meses, aunque informativo, podría no ser suficiente para comprender completamente la dinámica a largo plazo de los bancos de semillas de las especies de cactáceas. Futuros estudios podrían abordar estas limitaciones mediante experimentos de mayor duración y en múltiples sitios, lo que permitiría registrar una gama más amplia de condiciones ambientales y microambientales.

## 12. REFERENCIAS

- Aguirre MGA & Montaña C.** (1997). Germinación y supervivencia de cinco especies de cactáceas del Valle de Tehuacán: implicaciones para su conservación. *Acta Botanica Mexicana* **40**, 43-58.
- Ahmad A, Zhang Y & Cao XF.** (2010). Decoding the epigenetic language of plant development. *Molecular Plant* **3**, 719-728.
- Alcorn SM & Krutz.** (1959). Some factors affecting the germination of seed of the saguaro cactus (*Carnegiea gigantea*). *American Journal of Botany* **46**, 526-529.
- Alcorn SM & Martin SC.** (1974). *Cereus giganteus* Engelm, pp 313-314 En: Schopmeyer CS (Ed). *Seeds of Woody Plants in the United States*. Washington DC, USDA Forest Service.
- Álvarez R, Godínez-Álvarez H, Guzmán U & Dávila P.** (2004). Aspectos ecológicos de dos cactáceas mexicanas amenazadas: implicaciones para su conservación. *Botanical Sciences* **75**, 7-16.
- Álvarez-Espino R, Godínez-Álvarez H & De la Torre-Almaráz R.** (2014). Seed banking in the columnar cactus *Stenocereus stellatus*: distribution, density and longevity of seeds. *Seed Science Research* **24**, 315-320.
- Anderson EF.** (2001). *The cactus family*. Portland, Timber Press.
- Arellano E & Casas A.** (2003). Morphological variation and domestication of *Escontria chiotilla* (Cactaceae) under silvicultural management in the Tehuacán Valley, Central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* **50**, 439-453.
- Arias MS, Gama S & Guzmán LU.** (1997). *Cactaceae, Fascículo 14 de la flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. México, Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Arias S, Guzmán U, Mandujano MC, Soto M & Golubov J.** (2005). Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), La lista Roja (UICN) y CITES. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* **50**, 100-125.
- Arias TAA, Valverde VMT & Reyes SJ.** (2001). *Las Plantas de la Región de Zapotitlán Salinas, Puebla*. México, Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Arizmendi MDC & de los Monteros AE.** (1996). Avifauna de los bosques de cactáceas columnares del Valle de Tehuacán, Puebla. *Acta Zoológica Mexicana* **67**, 25-46.

- Arora A, Byrem TM, Nair MG & Strasburg GM.** (2000). Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **373**, 102-109.
- Assis JGA, Resende SV, Bellintani MC, Coelho PJA, Correia D, Marchi MNG, Cruz BM, Nahoum PIV, Menezes MOT & Meiado MV.** (2011). Conservação *ex situ*, 44-54 pp *in* Ribeiro-Silva S, Zappi DC, Taylor NP, Machado MC (Eds). *Plano de Ação Nacional para a Conservação das Cactáceas*. Brasília, Série Espécies Ameaçadas, no. 24. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.
- Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H & Corbineau F.** (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 806-814.
- Bailly C.** (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* **14**, 93-107.
- Bailly C.** (2019). The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. *Biochemical Journal* **476**, 3019-3032.
- Bakker JP, Poschlod P, Strykstra RJ, Bekker RM & Thompson K.** (1996). Seed banks and seed dispersal: important topics in restoration ecology. *Acta Botanica Neerlandica* **45**, 461-490.
- Baladi S & Balouchi H.** (2016). Evaluation of *Lallemantia royleana* seed longevity under varying conditions of temperature and moisture content. *Seed Science and Technology* **44**, 320-326.
- Ballesteros D & Walters C.** (2011). Detailed characterization of mechanical properties and molecular mobility within dry seed glasses: relevance to the physiology of dry biological systems. *The Plant Journal* **68**, 607-619.
- Barba-Espín G, Hernández JA & Diaz-Vivancos P.** (2012). Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea seed germination. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 193-195.
- Bárcenas RT.** (2006). Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación. *Biodiversitas* **68**, 11-15.
- Barthlott W & Hunt D.** (1993). *Cactaceae*. In: Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V. eds. The Families and Genera of Vascular Plants. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Bartosz G.** (1997). Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* **19**, 47-64.
- Basavarajappa BS, Shetty HS & Prakash HS.** (1991). Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. *Seed Science and Technology* **19**, 279-286.

- Baskin CC & Baskin JM.** (2014). *Seeds: ecology, Biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego, USA, Academic Press.
- Baskin JM & Baskin CC.** (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* **14**, 1-16.
- Basurtos SD, Lorenzana-Jiménez M & Guerrero GAM.** (2006). Utilidad del nopal para el control de la glucosa en la diabetes mellitus tipo 2. *Revista Facultad de Medicina* **49**, 157-162.
- Baxter A, Mittler R & Suzuki N.** (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1229-1240.
- Benítez-Rodríguez JL, Orozco-Segovia A & Rojas-Aréchiga M.** (2004). Light effect on seed germination of four *Mammillaria* species from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central Mexico. *The Southwestern Naturalist* **49**, 11-17.
- Berjak P & Pammenter N.** (2013). Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in Plant Science* **4**, 478.
- Berjak P, Farrant JM & Pammenter NW.** (2007). Seed desiccation-tolerance mechanisms, pp 151-192 in Jenks MA, Wood AJ (Eds). *Plan Plant Desiccation Tolerance*. Wallingford, CAB International Press.
- Bowers JE.** (2000). Does *Ferocactus wislizeni* (Cactaceae) have a between-year seed bank? *Journal of Arid Environments* **45**, 197-205.
- Bowers JE.** (2005). New evidence for persistent or transient seed banks in three Sonoran Desert cacti. *Southwestern Naturalist* **50**, 482-487.
- Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D & Asada K.** (1994). Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**, 199-218.
- Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- Bravo-Hollis H & Sánchez-Mejorada RH.** (1978). *Las Cactáceas de México volumen I*. México, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Bravo-Hollis H & Scheinvar L.** (1999). *El interesante mundo de las cactáceas*. México, Fondo de Cultura Económica.
- Bray CM & Dasgupta J.** (1976). Ribonucleic acid synthesis and loss of viability in pea seed. *Planta* **132**, 103-108.
- Buijs G, Willems LA, Kodde J, Groot SP & Bentsink L.** (2020). Evaluating the EPPO method for seed longevity analyses in *Arabidopsis*. *Plant Science* **301**, 110644.

- Campos-Díaz MJ, Burelo-Ramos CM & Arias S.** (2020). La familia Cactaceae en Tabasco, México. *Acta Botánica Mexicana* **127**, 1-18.
- Cano-Salgado A, Zavala-Hurtado JA, Orozco-Segovia A, Valverde-Valdés MT & Pérez-Rodríguez P.** (2012). Composition and abundance of the seed bank in a semiarid region in tropical Mexico: spatial and temporal patterns. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **83**, 437-446.
- Cárdenas-Rodríguez N & Pedraza-Chaverri J.** (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* **17**, 164-173.
- Castillo-Campohermoso AD, López-Espinosa A & Ocampo-Fletes I.** (2010). Conocimiento y uso de cactáceas por familias campesinas en Coxcatlán, Puebla. *Ra Ximhai* **6**, 347-353.
- Chandra S, Yadav RR, Poonia S, Pal Y, Rathod DR, Gupta A & Yadav RR.** (2017). Seed coat permeability studies in wild and cultivated species of soybean. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **6**, 2358-2363.
- Châtelain E, Sator P, Laugier E, Vu BL, Payet N, Rey P & Montrichard F.** (2013). Evidence for participation of the methionine sulfoxide reductase repair system in plant seed longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 3633-3638.
- Chee-Sanford JC, Williams MM, Davis AS & Sims GK.** (2006). Do microorganisms influence seed-bank dynamics? *Weed Science* **54**, 575-587.
- Cheib LA & García SQ.** (2012). Longevity and germination ecology of seeds of endemic Cactaceae species from high-altitude sites in south-eastern Brazil. *Seed Science Research* **22**, 45-53.
- Chhabra R & Singh T.** (2019). Seed Aging, Storage and Deterioration: An Irresistible Physiological Phenomenon. *Agricultural Reviews* **40**, 234-238.
- CITES.** (2021). Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (Apendices, I, II, III). <https://cites.org/sites/default/files/esp/app/2013/S-Appendices-2013-06-12.pdf>.
- Corona-Carrillo JI, Flores-Ponce M, Chávez-Najera G & Díaz-Pontones DM.** (2014). Peroxidase activity in scutella of maize in association with anatomical changes during germination and grain storage. *Springer Plus* **3**, 1-16.
- de Gara L, Locato V, Dipierro S & de Pinto MC.** (2010). Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respiratory Physiology and Neurobiology* **173**, 13-19.

- de la Barrera E & Nobel PS.** (2003). Physiological ecology of seed germination for the columnar cactus *Stenocereus queretaroensis*. *Journal of Arid Environments* **53**, 297-306.
- de la Rosa MDL, Domínguez-Rosales MS, Pérez-Reyes ME & Pérez-Molphe-Balch E.** (2012). Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbinicarpus*. *Interciencia* **37**, 114-120.
- de Viana ML.** (1999). Seed production and seed bank of *Trichocereus pasacana* (Cactaceae) in northwestern Argentina. *Tropical Ecology* **40**, 79-84.
- del Carmen-Navarro M, Tzompa R & González EM.** (2013). Propagación de *Echinocactus platyacanthus*: efectos del sustrato, viabilidad y escarificación de semillas. *Zonas Áridas* **15**, 31-47.
- del Castillo RF.** (1986). Semillas, germinación y establecimiento de *Ferocactus histrix*. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* **31**, 5-11.
- Demidchik V.** (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* **109**, 212-228.
- Díaz-Vivancos P, Barba-Espín G & Hernández JA.** (2013). Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. *Plant Cell Reports* **32**, 1491-1502.
- DOF.** (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio-Lista de Especies en Riesgo. [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle\\_popup.php?codigo=5173091](https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5173091).
- dos Santos AP, Hassemer G & Meiado MV.** (2018). Seed storage of Brazilian cacti species in different threat categories. *Plant Species Biology* **33**, 203-211.
- Ebone LA, Caverzan A & Chavarria G.** (2019). Physiologic alterations in orthodox seeds due to deterioration processes. *Plant Physiology and Biochemistry* **145**, 34-42.
- Ellis RH & Roberts EH.** (1981). The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Science and Technology* **9**, 373-409.
- Ellis RH, Hong TD & Roberts EH.** (1990). An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *Journal of Experimental Botany* **41**, 1167-1174.
- El-Maarouf-Bouteau H & Bailly C.** (2008). Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling and Behavior* **3**, 175-182.
- Farley-Barnes KI, Ogawa LM & Baserga SJ.** (2019) Ribosomopathies: old concepts, new controversies. *Trends in Genetic* **35**, 754-767.



- Farooq M, Basra SMA, Ahmad N & Hafeez K.** (2005). Thermal hardening: A new seed vigor enhancement tool in rice. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**, 187-193.
- Farooq, M., Usman M, Nadeem F, ur Rehman, H, Wahid A, Basra SM & Siddique KH.** (2019). Seed priming in field crops: potential benefits, adoption and challenges. *Crop and Pasture Science* **70**, 731-771.
- Fearn B.** (1977). An investigation into the effect of age on the germination potential of seeds of 600 species of cacti, together with a note on the viability of Lithops of seeds. *Excelsa* **7**, 103-108.
- Fenner M & Thompson K.** (2005). The ecology of seeds. UK, Cambridge University Press.
- Fernández-López JA, Giménez PJ, Angosto JM & Moreno JI.** (2012). A process of recovery of a natural yellow colourant from opuntia fruits. *Food Technology and Biotechnology* **50**, 246.
- Finch-Savage WE & Leubner-Metzger G.** (2006). Seed Dormancy and The control of Germination. *New Phytologist* **171**, 501-523.
- Flores GJA & Macías CGV.** (2008). Importancia de las cactáceas como recurso natural en el Noreste de México. *Ciencia UANL* **11**, 5-11.
- Flores J, Jurado E & Arredondo A.** (2006). Effect of ligh on germination of seeds of Cactaceae from the Chihuahuan Desert, Mexico. *Seed Science Reserch* **16**, 149-155.
- Flores J.** (2005). Comparative seed germination in species of *Turbinicarpus*: an endangered cacti genus. *Natural Areas Journal* **25**, 183-187.
- Flores Y, Reyna T, Cervantes M & Luna C.** (2011). Distribución geográfica y potencial de *Stenocereus pruinosus* y *Stenocereus stellatus*. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* **56**, 4-20.
- Floyd SK & Friedman WE.** (2000). Evolution of endosperm developmental patterns among basal flowering plants. *International Journal of Plant Sciences* **161**(S6), S57-S81.
- França-Neto JDB & Krzyzanowski FC.** (2019). Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. *Journal of Seed Science* **41**, 359-366.
- Friedman WE & Williams JH.** (2004). Developmental evolution of the sexual process in ancient flowering plant lineages. *The Plant Cell* **16**, S119-S132.
- Fu YB, Ahmed Z & Diederichsen A.** (2015). Towards a better monitoring of seed ageing under *ex situ* seed conservation. *Conservation Physiology* **3**, cov026.
- Galletti P, Ingrosso D, Manna C, Clemente G & Zappia V.** (1995). Protein damage and methylation-mediated repair in the erythrocytes. *Biochemical Journal* **306**, 313-325.

- García E.** (2004). *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen*. (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). México, Universidad Nacional Autónoma de México.
- García QS, Giorni VT, Müller M & Munné-Bosch S.** (2012). Common and distinct responses in phytohormone and vitamin E changes during seed burial and dormancy in *Xyris bialata* and *X. peregrina*. *Plant Biology* **14**, 347-353.
- García-Cruz L, Valle-Guadarrama S, Salinas-Moreno Y & Joaquín-Cruz E.** (2013). Physical, chemical, and antioxidant activity characterization of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruits. *Plant Foods for Human Nutrition* **68**, 403-410.
- Gerna D, Ballesteros D, Arc E, Stöggli W, Seal CE, Marami-Zonouz N & Roach T.** (2022). Does oxygen affect ageing mechanisms of *Pinus densiflora* seeds? A matter of cytoplasmic physical state. *Journal of Experimental Botany* **73**, 2631-2649.
- Gomes MP & Garcia QS.** (2013). Reactive oxygen species and seed germination. *Biologia* **68**, 351-357.
- Goodman J, Walters D, Bradley K, Maschinski J & Salazar A.** (2012). Seeds of endangered *Harrisia fragrans* from persistent soil seed Banks withstand orthodox storage conditions. *Haseltonia* **18**, 85-94.
- Guerrero-Muñoz P, Zavaleta-Mancera HA, Barrientos-Priego AF, Gallegos-Vázquez C, Núñez-Colín CA, Valadez-Moctezuma E & Cuevas-Sánchez JA.** (2006). Técnica para el estudio de la micromorfología interna de semillas duras en *Opuntia*. *Revista Fitotecnia Mexicana* **29**, 37-43.
- Guillen TA, Espinoza JL, Ortega PR, Ávila SN & Palacios EA.** (2014). Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla en la germinación y sobrevivencia de *Ferocactus townsendianus* Britt & Rose. *Interciencia* **39**, 732-735.
- Gurvich DE, Lorenzati MA, Sosa-Pivatto M, Bauk K & Barroso FL.** (2021). Effects of long-term seed storage on germination of 13 cactus species from central Argentina. *Journal of Arid Environments*, **185**, 104382.
- Guzmán U, Arias S & Dávila P.** (2007). *Catálogo de Cactáceas Mexicanas*. México, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).
- Guzmán-Hernández DA.** (2018). *Variabilidad genética y viabilidad de semillas de *Escontria chiotilla* y *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) conservadas ex situ y enterradas in situ en un matorral xerófilo en el Valle de Tehuacán*. Tesis (Maestría). México. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

- Hay FR & Probert RJ.** (2013). Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. *Conservation Physiology* **1**, cot030.
- Hay FR & Whitehouse KJ.** (2017). Rethinking the approach to viability monitoring in seed genebanks. *Conservation Physiology* **5**, cox009.
- Hernández HM & Godínez H.** (1994). Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* **26**, 33-52.
- Hernández-Arciga U, Hernández-Álvarez, D, López-Cervantes SP, López-Díazguerrero NE, Alarcón-Aguilar A, Luna-López A & Königsberg M.** (2020). Effect of long-term moderate-exercise combined with metformin-treatment on antioxidant enzymes activity and expression in the gastrocnemius of old female Wistar rats. *Biogerontology* **21**, 787-805.
- Holland JN & Molina-Freaner F.** (2013). Hierarchical effects of rainfall, nurse plants, granivory and seed banks on cactus recruitment. *Journal of Vegetation Science* **24**, 1053-1061.
- Hong TD & Ellis RH.** (1992). Optimum air-dry seed storage environments for *arabica coffee*. *Seed Science and Technology* **20**, 547-560.
- Hong TD & Ellis RH.** (1996). *A protocol to determine seed storage behavior*. Rome, Italy, International Plant Genetic Resources Institute.
- Hong TD, Ellis RH & Linington S.** (1998). *Compendium of information on seed storage behaviour*. Italy, The International Plant Genetic Resources Institute.
- INEGI.** (2008). *Prontuario de información geográfica municipal de Santiago Chazumba, Oaxaca*.  
[http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/20/20459.pdf](http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/20/20459.pdf).
- ISTA.** (2020). *International rules for seed testing*. International Seed Testing Association: Bassersdorf, Switzerland.
- IUCN.** (2021). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021.3.  
<http://www.iucnredlist.org>.
- Jadoon S & Malik A.** (2017). A review article on the formation, mechanism and biochemistry of MDA and MDA as a biomarker of oxidative stress. *International Journal of Advanced Research* **5**, 811-818.
- Jiménez-Sierra CL.** (2011). Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria* **12**.

- Jyoti & Malik CP.** (2013). Seed deterioration: A review. *International Journal of Life Science, Biotechnology and Pharmaceutical Research* **2**, 374–385.
- Kapoor D, Sharma R, Handa N, Kaur H, Rattan A, Yadav P & Bhardwaj R.** (2015). Redox homeostasis in plants under abiotic stress: role of electron carriers, energy metabolism mediators and proteinaceous thiols. *Frontiers in Environmental Science* **3**, 13.
- Kibinza S, Bazin J, Bailly C, Farrant JM, Corbineau F & El-Maarouf-Bouteau H.** (2011). Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Science* **181**, 309-315.
- Kołodziej U, Maciejczyk M & Zalewska A.** (2018). Oxidative stress–repair systems of oxidatively damaged biomolecules. *Progress in Health Sciences* **8**, 141-150.
- Kranner I & Colville LE.** (2011). Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environmental and Experimental Botany* **72**, 93-105.
- Kranner I, Birtić S, Anderson KM & Pritchard HW.** (2006). Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radical Biology and Medicine* **40**, 2155-2165.
- Kranner I, Minibayeva FV, Beckett RP & Seal CE.** (2010). What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol. New Phytologist* **188**, 655-673.
- Kumar S, Abedin MM, Singh AK & Das S.** (2020). Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture* **1**, 517-532.
- Kumar SP, Prasad S, Banerjee R & Thammineni C.** (2015). Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of Botany* **116**, 663-668.
- Kurek K, Plitta-Michalak B & Ratajczak E.** (2019). Reactive oxygen species as potential drivers of the seed aging process. *Plants* **8**, 174.
- Lara-Reséndiz RA, Arena-Moreno DM & Méndez-de la Cruz FR.** (2013). Termorregulación diurna y nocturna de la lagartija *Phyllodactylus bordai* (Gekkota: Phyllodactylidae) en una región semiárida del centro de México. *Revista Chilena de Historia Natural* **86**, 127-135.
- Leck MA.** (2012). *Ecology of soil seed banks*. Michigan, Academic Press.

- Lee JS, Velasco-Punzalan M, Pacleb M, Valdez R, Kretschmar T, McNally KL & Hay FR.** (2019). Variation in seed longevity among diverse Indica rice varieties. *Annals of Botany* **124**, 447-460.
- Leprince O, Hendry GAF & McKersie BD.** (1993). The mechanisms of desiccation tolerance in developing. *Seed Science Research* **3**, 231-246.
- Leprince O, Pellizzaro A, Berriri S & Buitink J.** (2017). Late seed maturation: drying without dying. *Journal of Experimental Botany* **68**, 827-841.
- Li DZ & Pritchard HW.** (2009). The science and economics of *ex situ* plant conservation. *Trends in plant science* **14**, 614-621.
- Lindow-López L, Galíndez G, Sühning S, Pastrana-Ignes V, Gorostiague P, Gutiérrez A & Ortega-Baes P.** (2018). Do cacti form soil seed banks? An evaluation using species from the Southern Central Andes. *Plant Biology* **20**, 1053-1058.
- Linkies A, Graeber K, Knight C & Leubner-Metzger G.** (2010). The evolution of seeds. *New Phytologist* **186**, 817-831.
- Liu X & Hou X.** (2018). Antagonistic regulation of ABA and GA in metabolism and signaling pathways. *Frontiers in Plant Science* **9**, 251.
- Liu X, Hu P, Huang M, Tang Y, Li Y, Li L & Hou X.** (2016). The NF-YC RGL2 module integrates GA and ABA signaling to regulate seed germination in Arabidopsis. *Nature Communications* **7**, 1-14.
- Liu Y, Ye N, Liu R, Chen M, & Zhang J.** (2010). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2979-2990.
- Long RL, Gorecki MJ, Renton M, Scott JK, Colville L, Goggin DE, Commander LE, Westcott DA, Cherry H and Finch-Savage WE.** (2015). The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise. *Biological Reviews* **90**, 31-59.
- Long RL, Kranner I, Panetta FD, Birtic S, Adkins SW & Steadman KJ.** (2011). Wet-dry cycling extends seed persistence by re-instating antioxidant capacity. *Plant and Soil* **388**, 511-519.
- Lounifi I, Arc E, Molassiotis A, Job D, Rajjou L & Tanou G.** (2013). Interplay between protein carbonylation and nitrosylation in plants. *Proteomics* **13**, 568-578.
- Lushchak VI & Semchuk NM.** (2012). Tocopherol biosynthesis: chemistry, regulation and effects of environmental factors. *Acta Physiologiae Plantarum* **34**, 1607-1628.

- Mandujano MC, Naranjo AG, Rojas-Aréchiga M & Golubov J.** (2020). Conservation status, germination, and establishment of the Divine Cactus, *Lophophora williamsii* (Lem. Ex Salm-Dyck) J. M Coult. at Cuatro Ciénegas, pp. 227-240 En: Mandujano MC, Pisanty I, Eguiarte LE (Eds). *Plant Diversity and Ecology in the Chihuahuan Desert*. Springer, Cham.
- Marcos-Filho J.** (2015). Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia agricola*, **72**, 363-374.
- Márquez GJ, Collazo OM, Martínez GM, Orozco SA & Vázquez SS.** (2016). *Biología de angiospermas*. México, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martínez-Peralta C & Mandujano MC.** (2012). Biología de la polinización y fenología reproductiva del género *Ariocarpus Scheidweiler* (Cactaceae). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, **57**, 114-127.
- Maya Y, Palacios-Cardiel C & Jiménez M.** (2011). El cardón *Pachycereus pringlei*, nuevo hospedero para *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **82**, 1041-1045.
- McDonald MB.** (1993). The history of seed vigor testing. *Journal of Seed Technology* **17**, 93-101.
- McDonough W.** (1964). Germination responses of *Carnegiea gigantea* and *Lemiarocereus thurberi*. *Ecology* **45**, 155-159.
- Meiado MV, de Albuquerque LSC, Rocha EA, Rojas-Aréchiga & Leal IR.** (2010). Seed germination responses of *Cereus jamacaru* DC. ssp. *jamacaru* (Cactaceae) to environmental factors. *Plant Species Biology* **25**, 120-128.
- Michalak M, Barciszewska MZ, Barciszewski J, Plitta BP & Chmielarz P.** (2013). Global changes in DNA methylation in seeds and seedlings of *Pyrus communis* after seed desiccation and storage. *PLoS ONE* **8**, e70693.
- Middleton BA.** (2003). Soil seed banks and the potential restoration of forested wetlands after farming. *Journal of Applied Ecology* **40**, 1025-1034.
- Miguel-Talonia C, Téllez-Valdés O & Murguía-Romero M.** (2014). Las cactáceas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México: estimación de la calidad del muestreo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **85**, 436-444.
- Møller IM & Kristensen BK.** (2004). Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochemical & Photobiological Sciences* **3**, 730-735.
- Montiel S & Montaña C.** (2003). Seed bank dynamics of the desert cactus *Opuntia rastrera* in two habitats from the Chihuahuan Desert. *Plant Ecology* **166**, 241-248.

- Morales M & Munné-Bosch S.** (2019). Malondialdehyde: Facts and artifacts. *Plant Physiology* **180**, 1246-1250.
- Morscher F, Kranner I, Arc E, Bailly C & Roach T.** (2015). Glutathione redox state, tocochromanols, fatty acids, antioxidant enzymes and protein carbonylation in sunflower seed embryos associated with after-ripening and ageing. *Annals of Botany* **116**, 669-678.
- Mullin WJ & Xu W.** (2001). Study of soybean seed coat components and their relationship to water absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5331-5335.
- Munné-Bosch S, Onate M, Oliveira PG & Garcia QS.** (2011). Changes in phytohormones and oxidative stress markers in buried seeds of *Vellozia alata*. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **206**, 704-711.
- Munné-Bosch S.** (2005). The role of  $\alpha$ -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* **162**, 743-748.
- Muñoz-Romo M, Sosa M & Casart-Quintero Y.** (2005). Digestibilidad del polen de cactáceas columnares en los murciélagos glosófagos *Glossophaga longirostris* y *Leptonycteris curasoae* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Revista de Biología Tropical* **53**, 277-280.
- Nascimento JP & Meiado MV.** (2017). *In situ* or *ex situ* seed conservation: which is more effective way to maintain seed longevity of an endangered cactus? *Plant Species Biology* **32**, 115-120.
- Nascimento JP, Vieira DCM & Meiado MV.** (2015). *Ex situ* seed conservation of Brazilian Cacti. *Revista Gaia Scientia* **9**, 111-116.
- Navarro CMC, Saldívar SS & Eliosa LHR.** (2010). Efecto de la escarificación y de la edad de semillas en la germinación de *Mammillaria mystax*. *Zonas Áridas* **14**, 196-205.
- Nisar N, Li L, Lu S, Khin NC, & Pogson BJ.** (2015). Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant* **8**, 68-82.
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han YI, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G & Foyer CH.** (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment* **35**, 454-484.
- Nonogaki H, Bassel WG & Bewley JD.** (2010). Germination, still a mystery. *Plant Science* **179**, 574-581.
- Oenel A, Fekete A, Krischke M, Faul SC, Gresser G, Havaux M & Berger S.** (2017). Enzymatic and non-enzymatic mechanisms contribute to lipid oxidation during seed aging. *Plant Cell Physiology* **58**, 925-933.

- Olatunde A, Tijjani H, Ishola AA, Egbuna C, Hassan S & Akram M.** (2020). Carotenoids as functional bioactive compounds. *Functional Foods and Nutraceuticals: Bioactive Components, Formulations and Innovations*, 415-444.
- Olszowy-Arora M.** (2019). What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiology and Biochemistry* **144**, 135-143.
- Ordoñez C.** (2008). *Características ecológicas y fisiológicas del banco de semillas de Polaskia chende*. Tesis (Licenciatura). México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
- Ordoñez-Salanueva CA, Orozco-Segovia A, Canales-Martínez M, Seal CE, Pritchard HW & Flores-Ortiz CM.** (2017). Ecological longevity of *Polaskia chende* (Cactaceae) seeds in the soil bank, seedling emergence and survival. *Plant Biology* **19**, 973-982.
- Ortega-Baes P & Godínez-Alvarez H.** (2006). Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. *Biodiversity and Conservation* **15**, 817-827.
- Osborne DJ.** (2000). Hazards of a germinating seed: available water and the maintenance of genomic integrity. *Israel Journal of Plant Sciences* **48**, 173-179.
- Pang CH & Wang BS.** (2010). Role of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in ascorbate–glutathione cycle and stress tolerance in plants. *Ascorbate-glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants* **2010**, 91-113.
- Parra F, Blancas JJ & Casas A.** (2012). Landscape management and domestication of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley: human guided selection and gene flow. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **8**, 32-38.
- Parrilla-Taylor DP & Zenteno-Savín T.** (2011). Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture* **318**, 379-383.
- Peralta-Pérez MDR & Volke-Sepúlveda TL.** (2012). La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **11**, 75-88.
- Pimienta-Barrios E, Méndez-Morán L, Ramírez-Hernández BC, García de Alba-García JE & Domínguez-Arias RM.** (2008). Efecto de la ingestión del fruto de xoconostle (*Opuntia joconostle* Web.) sobre la glucosa y lípidos séricos. *Agrociencia* **42**, 645-653.
- Pimienta-Barrios E.** (1994). Prickly pear (*Opuntia* spp.): a valuable fruit crop for the semi-arid lands of Mexico. *Journal of Arid Environments* **28**, 1-11.



- Potters G, de Gara L, Asard H & Horemans N.** (2002). Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 537-548.
- Priestley DA & Leopold AC.** (1979). Absence of lipidoxidation during accelerated aging of soybean seeds. *Plant Physiology* **63**, 726-729.
- Priestley DA, McBride MB & Leopold AC.** (1980). Tocopherol and organic free radical levels in soybean seeds during natural and accelerated aging. *Plant Physiology* **66**, 715-719.
- Quan LJ, Zhang B, Shi WW & Li HY.** (2008). Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 2-18.
- Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J & Bally J.** (2012). Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 507-533.
- Rajjou L, Lovigny Y, Groot SP, Belghazi M, Job C & Job D.** (2008). Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiology* **148**, 620-641.
- Ratajczak E, Dietz KJ & Kalemba EM.** (2019). The occurrence of peroxiredoxins and changes in redox state in *Acer platanoides* and *Acer pseudoplatanus* during seed development. *Journal of Plant Growth Regulation* **38**, 298-314.
- Ratajczak E, Małecka A, Bagniewska-Zadworna A & Kalemba EM.** (2015). The production, localization and spreading of reactive oxygen species contributes to the low vitality of long-term stored common beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology* **174**, 147-156.
- Ravichandran K, Saw NMMT, Mohdaly AA, Gabr AM, Kastell A, Riedel H, Cai Z, Knorr D & Smetanska I.** (2013). Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Research International* **50**, 670-675.
- Reed BM, Sarasan V, Kane M, Bunn E & Pence VC.** (2011). Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* **47**, 1-4.
- Reyes de la Cruz H, Aguilar R & Sánchez de Jiménez E.** (2004). Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70 (S6K). *Biochemistry* **43**, 533–539.
- Riewe D, Wiebach J & Altmann T.** (2017). Structure annotation and quantification of wheat seed oxidized lipids by high-resolution LC-MS/MS. *Plant Physiology* **175**, 600-618.

- Roach T, Nagel M, Börner A, Eberle C & Kranner I.** (2018). Changes in tocochromanols and glutathione reveal differences in the mechanisms of seed ageing under seedbank conditions and controlled deterioration in barley. *Environmental and Experimental Botany* **156**, 8-15.
- Roberts BE & Osborne DJ.** (1973). Protein synthesis and loss of viability in rye embryos. The liability of transferase enzymes during senescence. *Biochemical Journal* **135**, 405-410.
- Roberts EH & King MW.** (1980). The characteristics of recalcitrant seeds, pp 1-5 in Chin HF, Roberts EH (Eds). *Recalcitrant crop seeds*. Kuala Lumpur, Tropical Press.
- Roberts EH.** (1973). Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* **1**, 499-514.
- Roberts EH.** (2012). *Viability of seeds*. London, Roberts EH (ed), Springer Science & Business Media.
- Roberts HA.** (1981). Seed banks in soils. *Advances in Applied Biology* **6**, 1-55.
- Rodríguez-Arévalo I, Mattana E, García L, Liu U, Lira R, Dávila P & Ulian T.** (2017). Conserving seeds of useful wild plants in Mexico: main issues and recommendations. *Genetic Resources and Crop Evolution* **64**, 1141-1190.
- Rojas-Aréchiga M & Batis A.** (2001). Las semillas de cactáceas ¿forman bancos en el suelo? *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* **46**, 76-82.
- Rojas-Aréchiga M & García-Morales, E.** (2022). Dormancy and viability of *Ferocactus peninsulæ* (Cactaceae) seeds. *Plant Species Biology* **37**, 173-181.
- Rojas-Aréchiga M & Vázquez-Yanes C.** (2000). Cactus seed germination: a review *Journal of Arid Environments* **44**, 85-104.
- Rojas-Aréchiga M, Orozco-Segovia A & Vázquez-Yanes C.** (1997). Effect of light on the germination of seven species of cacti from the Zapotitlán Valley in Puebla Mexico. *Journal of Arid Environments* **36**, 571-578.
- Rojas-Aréchiga M, Vázquez-Yanes C & Orozco-Segovia A.** (1998). Seed response to temperature of two life forms of Mexican cacti species: an ecophysiological interpretation. *Plant Ecology* **135**, 207-214.
- Rojas-Aréchiga, M, Casas A & Vázquez-Yañes C.** (2001). Seed germination on wild and cultivated *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central Mexico. *Journal of Arid Environments* **49**, 279-287.
- Roldán-Arjona T & Ariza RR.** (2009). Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **681**, 169-179.

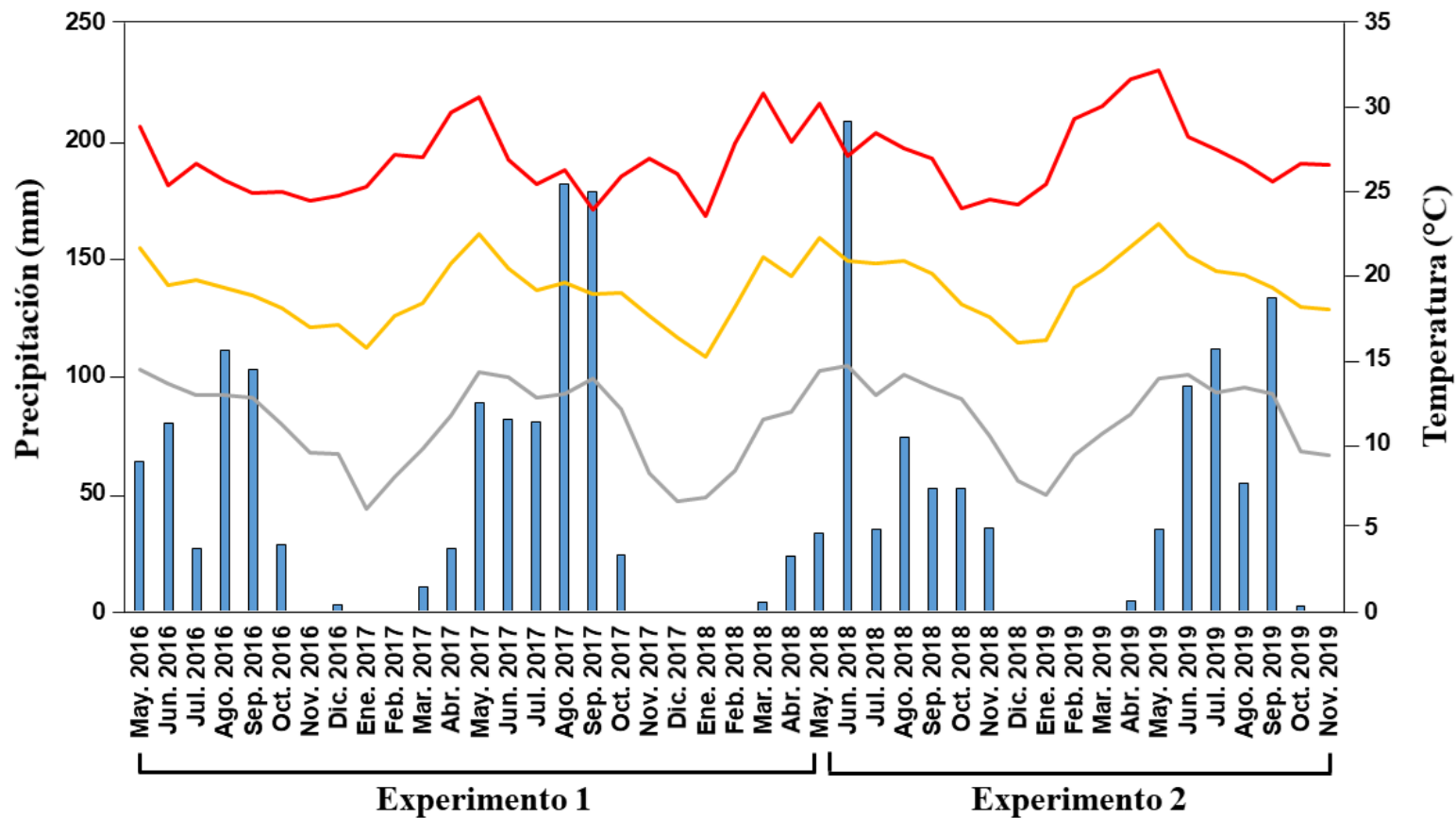
- Roshan MR, Grassi G, Bergami E, Marques-Santos LF, Faleri C, Liberatori G & Corsi I.** (2018). Co-exposure to titanium dioxide nanoparticles does not affect cadmium toxicity in radish seeds (*Raphanus sativus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **148**, 359-366.
- Saatkamp A, Affre L, Dutoit T & Poschlod P.** (2009). The seed bank longevity index revisited: limited reliability evident from a burial experiment and database analyses. *Annals of Botany* **104**, 715-724.
- Sánchez-Mejorada H.** (1982). *Algunos usos prehispánicos de las cactáceas entre los indígenas de México*. Toluca, México, Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Gobierno del Estado de México.
- Sánchez-Salas J, Muro PG, Flores RJD, Jurado YE & Sáenz MJ.** (2015). Los bancos de semillas y su germinación en ambientes semiáridos. *Ciencia UANL* **18**, 70-76.
- Sandate-Flores L, Romero-Esquivel E, Rodríguez-Rodríguez J, Rostro-Alanis M, Melchor-Martínez EM, Castillo-Zacarías C & Parra-Saldívar R.** (2020). Functional attributes and anticancer potentialities of Chico (*Pachycereus Weberi*) and Jiotilla (*Escontria chiotilla*) Fruits Extract. *Plants* **9**, 1623.
- Seal CE, Zammit R, Scott P, Flowers TJ & Kranter I.** (2010). Glutathione half-cell reduction potential and  $\alpha$ -tocopherol as viability markers during the prolonged storage of *Suaeda maritima* seeds. *Seed Science Research* **20**, 47-53.
- Serrano A, Silva SMM, Cano GMA, Medina GG & Ruiz CA.** (2005). *Estadísticas climatológicas básicas del estado de Oaxaca (período 1961-2003)*. México, Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
- Sharma P & Dubey RS.** (2007). Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports* **26**, 2027-2038.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS & Pessarakli M.** (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* **2012**.
- Silva GP, Sales JF, Nascimento KJT, Rodrigues AA, Camelo GN & Borges EEDL.** (2020). Biochemical and physiological changes in *Dipteryx alata* Vog. seeds during germination and accelerated aging. *South African Journal of Botany* **131**, 84-92.
- Singh R & Bassi G.** (2016). Response of bitter gourd (*Momordica charantia*) seed to seed priming treatments under sub-optimal environments. *Indian Journal of Agricultural Science* **86**, 935-939.

- Singh R, Singh S, Parihar P, Mishra RK, Tripathi DK, Singh VP & Prasad SM.** (2016). Reactive oxygen species (ROS): beneficial companions of plants' developmental processes. *Frontiers in Plant Science* **7**, 186069.
- Smirnoff N & Wheeler GL.** (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Plant Sciences* **19**, 267-290.
- Sotomayor DA & Gutiérrez JR.** (2015). Seed bank of desert annual plants along an aridity gradient in the southern Atacama coastal desert. *Journal of Vegetation Science* **26**, 1148-1158.
- Stegner M, Wagner J & Roach T.** (2022). Antioxidant depletion during seed storage under ambient conditions. *Seed Science Research* **32**, 150-156.
- Stintzing FC, Herbach HM & Mosshammer MR.** (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 442-451.
- Strack D, Vogt T & Schliemann W.** (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* **62**, 247-269.
- Sun WK & Leopold AC.** (1995). The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. *Physiologia Plantarum* **94**, 94-104.
- Suresh A, Shah N, Kotecha M & Robin P.** (2019). Evaluation of biochemical and physiological changes in seeds of *Jatropha curcas* L. Under natural aging, accelerated aging and saturated salt accelerated aging. *Scientia Horticulturae* **255**, 21-29.
- Thompson K & Grime JP.** (1979). Seasonal variations in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *Journal of Ecology*, **67**:893-921.
- Thompson K.** (2000). The functional ecology of soil seed banks, pp 215-235 En: Fenner M (Ed). *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. Wallingford, UK, CAB International.
- Tian PP, Lv YY, Yuan WJ, Zhang SB & Hu YS.** (2019). Effect of artificial aging on wheat quality deterioration during storage. *Journal of Stored Products Research* **80**, 50-56.
- Trejo L & Garza M.** (1993). Efecto del tiempo de almacenamiento en la germinación de semillas de *Mammillaria heyderi* Muchl, en 4 sustratos. *Biotam* **5**, 19-24.
- Valavanidis A, Vlachogianni T & Fiotakis C.** (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health Part C* **27**, 120-139.

- Valiente-Banuet A.** (2002). Vulnerabilidad de los sistemas de polinización de cactáceas columnares de México. *Revista Chilena de Historia Natural* **75**, 99-104.
- Valverde PL & Zavala-Hurtado JA.** (2006). Assessing the ecological status of *Mammillaria pectinifera* Weber (Cactaceae), a rare and threatened species endemic of the Tehuacán-Cuicatlán Region in Central Mexico. *Journal of Arid Environments* **64**, 193-208.
- Vázquez-Yanes C & Orozco-Segovia A.** (1993). Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **24**, 69-87.
- Vázquez-Yanes C, Orozco SA, Rojas AM & Sánchez CM.** (1997). *La reproducción de las plantas: semillas y meristemas*. México, Fondo de Cultura Económica.
- Ventura L, Donà M, Macovei A, Carbonera D, Buttafava A, Mondoni A, Rossi G & Balestrazzi A.** (2012). Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. *Plant Physiology and Biochemistry* **60**, 196-206.
- Villavicencio-Gutiérrez EE, González-Cortés A & Carranza-Pérez MA.** (2012). Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) FAC Weber ex Britt. & Rose cactácea ornamental y recurso fitogenético del desierto chihuahuense. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* **3**, 83-102.
- Walck JL, Baskin JM, Baskin CC & Hidayati SN.** (2005). Defining transient and persistent seed banks in species with pronounced seasonal dormancy and germination patterns. *Seed Science Research* **15**, 189-196.
- Walters C, Wheeler LM & Grotenhuis JM.** (2005). Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research* **15**, 1-20.
- Way MJ.** (2003). Collecting seeds from non-domesticated plants for long-term conservation, pp 163-201 in Smith RD, Dickie JB, Linington SH, Pritchard HW, Probert RJ (Eds). *Seed conservation: turning science into practice*. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Wei Y, Xu H, Diao L, Zhu Y, Xie H, Cai Q, Wu F, Wang Z, Zhang J & Xie H.** (2015). Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase 1 (PIMT1) in rice improves seed longevity by preserving embryo vigor and viability. *Plant Molecular Biology* **89**, 475-492.
- Wettlaufer SH & Leopold AC.** (1991). Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. *Plant Physiology* **97**, 165-169.
- Williams RJ & Leopold AC.** (1989). The glassy state in corn embryos. *Plant Physiology* **89**, 977-981.

- Wrzaczek M, Brosche M & Kangasjärvi J.** (2013). ROS signaling loops—production, perception, regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, **16**, 575-582.
- Xia F, Chen L, Sun Y & Mao P.** (2015). Relationships between ultrastructure of embryo cells and biochemical variations during ageing of oat (*Avena sativa* L.) seeds with different moisture content. *Acta Physiologiae Plantarum* **37**, 1-11.
- Xin X, Lin XH, Zhou YC, Chen XL, Liu X & Lu XX.** (2011). Proteome analysis of maize seeds: the effect of artificial ageing. *Physiologia Plantarum* **143**, 126-138.
- Yáñez-López MDL, Barbosa-Martínez C, Serrato-Díaz A, Balderas-Morales A, Campos-Muñiz C, Fernández FJ & Armella-Villalpando MA.** (2016). Genetic relationships between varieties of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the states of Puebla and Oaxaca, Mexico, by means of AFLP markers. *Agrociencia* **50**, 595-601.
- Zhang Y, Chen B, Xu Z, Shi Z, Chen S & Huang X.** (2014). Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. *Journal of Experimental Botany* **65**, 3189-3200.
- Zhao L, Wang S, Fu YB & Wang H.** (2020). Arabidopsis seed stored mRNAs are degraded constantly over aging time, as revealed by new quantification methods. *Frontiers in Plant Science* **10**, 1764.
- Zhou W, Chen F, Luo X, Dai Y, Yang Y, Zheng C & Shu K.** (2020). A matter of life and death: molecular, physiological, and environmental regulation of seed longevity. *Plant, Cell & Environment* **43**, 293-302.
- Zimmer K & Schultz K.** (1975). Untersuchungen über den Einfluss der Temperatur auf die Keimung von Kakteensaatgut, IX. Zur Veränderung des Temperaturbereichs für die Keimung in Abhängigkeit vom Samenalter. *Gartenbauwissenschaft* **40**, 120-125.

# 12. ANEXOS



**Anexo I.** Datos climáticos, precipitación mensual (barras azules) y temperaturas ambiente máxima (línea roja), media (línea amarilla) y mínima (línea gris) de mayo de 2016 a noviembre de 2019 para la región de estudio.



## Research Paper

**Cite this article:** Guzmán-Hernández DA, Barbosa-Martínez C, Villa-Hernández JM, Pérez-Flores LJ (2024). Redox imbalance accompanies loss of viability in seeds of two cacti species buried *in situ*. *Seed Science Research* 1–9. <https://doi.org/10.1017/S0960258524000011>

Received: 28 June 2023

Revised: 16 December 2023

Accepted: 20 January 2024

### Keywords:

cacti seeds; germination; glutathione half-cell reduction potential; seed bank; seed ageing


### Corresponding author:

Laura J. Pérez-Flores;

Email: [ljpf@xanum.uam.mx](mailto:ljpf@xanum.uam.mx)

# Redox imbalance accompanies loss of viability in seeds of two cacti species buried *in situ*

David A. Guzmán-Hernández<sup>1</sup>, Claudia Barbosa-Martínez<sup>2</sup>,

Juan M. Villa-Hernández<sup>3</sup> and Laura J. Pérez-Flores<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México; <sup>2</sup>Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Ciudad de México CP 09310, México; <sup>3</sup>Instituto de Investigación de Genética, Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido, Puerto Escondido, Oaxaca CP 71980, México and <sup>4</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Ciudad de México CP 09310, México

## Abstract

This work provides insights into the deterioration of cacti seeds of *Escontria chiotilla* (F.A.C. Weber ex K. Schum) and *Stenocereus pruinosus* (Otto ex Pfeiff.) Buxbaum stored *ex situ* at 25 °C, under dry and dark conditions or buried *in situ* conditions in a xerophytic shrubland. Viability, germination speed, electrolyte leakage and indicators of the redox balance including glutathione content, glutathione half-cell reduction potential ( $E_{GSSG/2GSH}$ ) and malondialdehyde (MDA), oxidized protein content, together with water-soluble antioxidant enzyme activity were assessed. Over a period of two years of storage, viability was maintained when seeds were stored *ex situ* at 7–9% water content compared to seeds buried in the soil. A second burial experiment showed that seeds of *E. chiotilla* maintained viability during a year of storage that included a rainy season followed by a dry season. Thereafter, they died rapidly during the second rainy season. In contrast, those of *S. pruinosus* started to lose viability after 6 months of burial at the end of the rainy season and were mostly dead at the end of the dry season. This difference in persistence between species was related to a difference in the glutathione content and antioxidant enzyme activities. In both storage experiments, the loss of viability of both species was associated to a  $E_{GSSG/2GSH}$  shift to a more oxidative state during burial. Yet, contents in MDA and oxidized soluble proteins were not related to redox imbalance and loss of viability, indicating that these compounds are not good markers of oxidative stress in cacti seeds during storage.

## Introduction

Seed persistence refers to the survival of seeds in the environment after they reach maturity on the mother plant (Long et al., 2015). Long after the death of the mother plant, seeds can persist *in situ* in soil seed banks, or *ex situ* in gene banks (Reed et al., 2011; Long et al., 2015). The formation of soil seed banks is a reproductive strategy for Spermatophytes to allow plant populations to withstand adverse periods and to persist in time and space. This occurs particularly in unpredictable environments such as those prevailing in arid and semi-arid zones (Cano-Salgado et al., 2012; Álvarez-Espino et al., 2014). Soil seed banks can be transient, short- or long-term persistent (Walck et al., 2005). In transient seed banks, seeds lose viability in less than one year, whereas in short-term persistent banks, they maintain their viability between one and five years. Long-term persistent seed banks consist of seeds remaining viable for more than five years (Walck et al., 2005). Seed gene banks aim to preserve viable seeds *ex situ* for the longest period possible in dry and cold conditions (Hay and Whitehouse, 2017).

Although seeds should maintain their viability to fulfil their different purposes both in *ex situ* and *in situ* conditions, viability progressively decreases albeit at different rates based on the storage conditions (Hay and Probert, 2013; Nascimento and Meiado, 2017). Seed ageing or deterioration is commonly described as the loss of viability and vigour during storage (Jyoti and Malik, 2013). Ageing depends on the seed maturity state, genetic composition and storage conditions, namely, temperature, seed moisture content and oxygen concentration (Roach et al., 2018; Zhou et al., 2020; Gerna et al., 2022). In soil banks, buried seeds can be exposed to various stress factors, both biotic (predators and pathogenic microorganisms) and abiotic (temperature, humidity, pH, salinity). Furthermore, they experience cycles of imbibition and desiccation (Munné-Bosch et al., 2011; Garcia et al., 2012).

The causes of seed deterioration leading to death are not yet fully understood since ageing is a complex and multifactorial trait involving a network of molecular, biochemical and physiological processes (Fu et al., 2015; Ebone et al., 2019; Kurek et al., 2019; Lee et al., 2019; Zhou et al., 2020). The mechanisms related to seed ageing are associated with production and accumulation of reactive oxygen species (ROS) during storage. ROS are highly reactive and toxic molecules, with the potential to cause oxidative damage to membrane lipids (lipid

© The Author(s), 2024. Published by Cambridge University Press. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted re-use, distribution and reproduction, provided the original article is properly cited.



peroxidation), proteins and nucleic acids, causing irreversible damage to cellular systems and ultimately leading to cell death. This has been documented indirectly by measuring ROS induced damage in *Arabidopsis thaliana* (Rajjou *et al.*, 2008) and in crops (*Avena sativa*, *Cucumis sativus*, *Daucus carota*, *Helianthus cucumerifolius*, *Jatropha curcas*, *Lactuca sativa*, *Lepidium sativum*, *Phaseolus vulgaris*, *Raphanus sativus*, *Triticum sp* and *Zea mays*) (Xin *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2015; Suresh *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2019; Stegner *et al.*, 2022). For example, the comparison of oxylipid profiles of 15 year-old seeds stored in ambient and cold conditions revealed that lipid oxidation processes in aged seeds was enhanced under warm conditions, a treatment associated with reduction in viability (Riewe *et al.*, 2017). Oxidative shifts of the cellular redox environment, which can be assessed by half-cell reduction potential ( $E_{GSSG/2GSH}$ ) have been related to loss of seed viability in seeds that age rapidly during storage (Krammer *et al.*, 2006; Seal *et al.*, 2010). Malondialdehyde (MDA) is one of the down-products of lipid peroxidation and widely used as a marker of oxidative stress because it can be easily assessed using its binding to thiobarbituric acid (TBA) that leads to the MDA-(TBA)<sub>2</sub> adduct of reddish colour with an absorbance maximum at 532 nm. However, other plants compounds can react with TBA, such as sugars, which can lead to misinterpretation (Morales and Munné-Bosch, 2019). MDA alters cell membrane fluidity and permeability, leading to changes in their structure and function, as well as increased solute leakage (Morales and Munné-Bosch, 2019). In addition, free radicals derived from lipid oxidation can also damage other biomolecules and cellular organelles such as mitochondria (Roach *et al.*, 2018). To cope with oxidative stress, seeds have enzymatic antioxidant systems, such as superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6) and peroxidases (POD; EC 1.11.1.7); and molecular antioxidant such as glutathione (GSH), ascorbate, phenolic compounds, tocopherols and tocotrienols (Ratajczak *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2015; Roach *et al.*, 2018).

In cacti seeds such as *Escobaria chiotilla* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) and *Stenocereus pruinosus* (Otto ex Pfeiff.) Buxbaum, seed persistence and the mechanisms of deterioration during *ex situ* and *in situ* storage are poorly understood. *E. chiotilla* and *S. pruinosus* are columnar cacti endemic to Mexico, particularly from arid and semi-arid regions, such as those located in the Balsas River basin and Tehuacán-Cuicatlán Valley (Arellano and Casas, 2003; García-Cruz *et al.*, 2013). Both species are ecologically important in their growing regions due to their interactions with pollinators and dispersers. In addition, they produce edible fruits that are of economic, nutritional and cultural interest (Arellano and Casas, 2003; García-Cruz *et al.*, 2013; Sandate-Flores *et al.*, 2020).

Our research group has studied the viability of *E. chiotilla* and *S. pruinosus* seeds preserved in *ex situ* and *in situ* conditions. Seeds of both species stored in *ex situ* conditions (in rubber sealed glass jars at  $25 \pm 3$  °C and darkness) maintain viability for at least eight years. On the other hand, viability of seeds stored in *in situ* conditions decreased from 90% to 30% after 12–15 months of burial, possibly as a consequence of temperature and humidity changes experienced by the seeds in the soil. Based on this evidence, this study tested whether seeds buried *in situ* showed increased symptoms of oxidative damage such as increased MDA, oxidized proteins and/or decrease in antioxidant enzymes activity (SOD, CAT and POD), and a shift of the  $E_{GSSG/2GSH}$  to an oxidative state, compared to seeds stored in *ex situ* conditions, that could be associated with the loss of seed viability and vigour.

## Materials and methods

### Fruit collection and seed extraction

For this study, 150 *E. chiotilla* and 60 *S. pruinosus* fruits, respectively were collected in Tehuacán-Cuicatlán Valley region, Mexico ( $18^{\circ}12'41''$  N,  $97^{\circ}23'58''$  W), in May 2016, 2017 and 2018. Seeds were extracted from the fruits without pericarp and washed with running water until pulp removal. An *E. chiotilla* fruit contains between 400 and 900 seeds, while an *S. pruinosus* fruit has between 600 and 2000 seeds. For each harvest year the viability of seeds freshly extracted from the fruits was determined, and in each case, germination percentages were  $\geq 90\%$ . After extraction, seeds were dried at room temperature ( $25 \pm 3$  °C) on blotting paper for 48 h until reaching water content (WC) of 7–9%. Seed WC was assessed gravimetrically before and after drying at 103 °C for 17 h (ISTA, 2020) and expressed on a fresh weight basis.

### Ex situ and in situ conservation

For *ex situ* storage, seeds were kept in rubber sealed glass jars at  $25 \pm 3$  °C under dark conditions. Seed burial was carried out in the soil of a xerophytic shrubland located in the town of Trinidad Huaxtepec, Municipality of Santiago Chazumba, Oaxaca, Mexico ( $18^{\circ}16'24''$  N,  $97^{\circ}70'93''$  W), a region that is part of the Tehuacán-Cuicatlán Valley. The climate is classified as hot semi-arid (García, 2004), with a mean annual temperature of 19.7 °C. May is the warmest month (14.3–32.8 °C) and January the coldest (6.5–14.2 °C). Average annual precipitation is 532 mm. Rainfall occurs mostly during August (74–181 mm) and September (52–178 mm). Dry season begins between October–November and ends between March–April. Climate data for the region for the years of 2016, 2017 and 2018 were obtained from climate stations at Acatepec ( $18^{\circ}13' 36.97''$  N,  $97^{\circ}34'44.03''$  W), Caltepec ( $18^{\circ}12' 14.18''$  N,  $97^{\circ}27'12.62''$  W) and Tonahuixtla ( $18^{\circ}11' 13.51''$  N,  $97^{\circ}55'16.36''$  W) (<https://smn.conagua.gob.mx/es/>). No climatic anomalies were registered during the study period (See Supplementary Figure S1).

Two experiments were conducted at this site, which are described below.

### Experiment 1

The purpose of this experiment was to assess physiological and biochemical changes in seeds buried *in situ* for one and two years compared to seeds that were preserved *ex situ*. One thousand seeds of *E. chiotilla* and *S. pruinosus* were placed in five polyethylene mesh envelopes (6 × 4 cm) in May 2016 and 2017 and buried 5–10 cm deep, which is the depth at which cacti seed banks naturally form (Holland and Molina-Freaner, 2013; Álvarez-Espino *et al.*, 2014). In May 2018, buried seeds were exhumed and viability, vigour, glutathione contents (GSH and GSSG), redox state ( $E_{GSSG/2GSH}$ ), MDA content, soluble proteins and oxidized proteins, as well as the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT and POD) were determined. These parameters were evaluated simultaneously in seeds stored in *ex situ* conditions, as well as in freshly harvested seeds collected in 2018.

### Experiment 2

The purpose of this experiment was to determine if the loss of *E. chiotilla* and *S. pruinosus* seed viability during burial was related to the oxidative damage in response to the weather pattern. One



thousand seeds of both species collected in 2018 were buried as described above and exhumed at 6, 12, 14 and 16 months after burial. In each exhumation, five seed envelopes of each species were recovered for physiological and biochemical analyses, as described below.

#### Seed viability and vigour

Seed viability was determined by germination. Three replicates of 50 seeds were sown in Petri dishes with 1% (w/v) bacteriological agar and incubated in a germinator (Precision<sup>®</sup>, Dual Program Illuminated Incubator) at  $25 \pm 3$  °C and a 12 h light ( $15.25 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) photoperiod. Germination was scored based on the radicle emergence during 21 days after sowing. In order to verify seed viability, a tetrazolium test (ISTA, 2020) was performed. Three replicates of 10 seeds were cut longitudinally and placed in a 1% (w/v) Tetrazolium red solution at 40 °C for 1 h. Seeds, in which the embryonic axis was completely stained red-dish, were considered as viable.

Vigour was determined as the time necessary to reach 50% of the final germination percentages based on the equation reported by Farooq et al. (2005):

$$T_{50} = t_i + \frac{(N+1)/2n_i}{(n_j - n_i)}(t_j - t_i)$$

where  $N$  is the final number of germinated seeds and  $n_i$  and  $n_j$  the cumulative number of seeds germinated by adjacent counts at times  $t_i$  and  $t_j$  when  $n_i < (N+1)/2 < n_j$ .

Solute leakage was determined by measuring electrical conductivity (EC) according to Silva et al. (2020). Hundred mg of seeds was placed in 20 mL of deionized H<sub>2</sub>O for 24 h at  $25 \pm 3$  °C. EC was measured with a conductivity meter (OAKTON<sup>®</sup> CON 700) and results were expressed as  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1} \text{DW}$ .

#### Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined by assessing TBA-reactive substances using the Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit<sup>®</sup> (ABCAM), according to the manufacturer's instructions. Two hundred mg of seeds were frozen in liquid nitrogen and homogenized with 300  $\mu\text{L}$  of lysis solution, 3  $\mu\text{L}$  of butylated hydroxytoluene (BHT) solution and 303  $\mu\text{L}$  of 2 N HClO<sub>4</sub>. The homogenate was centrifuged at 13,000  $g$  for 10 min at 4 °C. Thereafter, 200  $\mu\text{L}$  of supernatant or 200  $\mu\text{L}$  of the MDA standards provided by the manufacturer were mixed in 600  $\mu\text{L}$  of TBA. The mixture was incubated at 95 °C for 60 min and then cooled in an ice bath for 10 min. The absorbance was immediately measured at 532 nm (ScanReady, Microplate photometer P-800, Life Real<sup>®</sup>). MDA concentration was derived from the calibration curve using 0–5 nmol of MDA standard.

#### Soluble protein extraction and quantification

Soluble proteins were extracted according to Reyes de la Cruz et al. (2004). Two hundred mg of seeds were frozen in liquid nitrogen and homogenized with 2 mL of extraction buffer (pH 7.5) containing, 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 50 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 20 mM NaF, 4 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 20 mM ethylene glycol tetracetic acid (EGTA),

200 mM mannitol and 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVPP). To 200 mL of extraction buffer, tablet of protease inhibitors COMPLETE<sup>®</sup> (Roche) was added. The homogenate was centrifuged at 16,000  $g$  at 4 °C for 25 min and the supernatant was recovered and stored at  $-80$  °C until use.

Soluble protein concentration was determined using the Bioassay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Oxidized proteins were determined by quantifying carbonyl groups according to Hernández-Arciga et al. (2020). Twenty  $\mu\text{L}$  of 50 mM phosphate buffer (pH 7.2) or 20  $\mu\text{L}$  of sample were mixed with 20  $\mu\text{L}$  of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, dissolved in 0.5 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) and 10  $\mu\text{L}$  of 6 M NaOH. Samples were placed on an ELISA plate and shaken for 10 min. Absorbance was measured immediately at 450 nm.

#### Glutathione content and redox state

Reduced and oxidized glutathione content was determined using the Quantification kit for oxidized and reduced glutathione (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions. Two hundred mg of seeds were frozen in liquid nitrogen and homogenized with 1.5 mL of an aqueous solution containing 0.5% (w/v) of 5-sulfosalicylic acid. The homogenate was centrifuged at 8,000  $g$  for 10 min at 4 °C. The absorbance of the supernatant was measured at 405 nm. GSH and GSSG were assessed using a calibration curve with 0–25  $\mu\text{M}$  GSSG and 0–50  $\mu\text{M}$  GSH standard solutions.  $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$  was calculated as described by Kranner et al. (2010) using the Nernst equation that was corrected for the seed WC.

$$E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}} = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{GSH}]^2}{[\text{GSSG}]}$$

where  $R$  is the ideal gas constant;  $T$  is the temperature in K;  $n$ , the number of electrons transferred;  $F$ , the Faraday constant;  $E^0$ , the standard half-cell reduction potential at pH 7 [ $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}^0 = -240 \text{ mV}$ ].

#### Antioxidant enzyme activity

SOD activity was determined according to Parrilla-Taylor and Zenteno-Savín (2011). Twenty-five  $\mu\text{L}$  of potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5) or protein extract was added to 1.45 mL of assay xanthine buffer (pH 9.5) containing, 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1 mM xanthine, 25  $\mu\text{M}$  nitroblue tetrazolium chloride (NBT), 0.1 mM EDTA, 25  $\mu\text{L}$  of Xanthine oxidase (XO) solution (0.1 U of XO in 1 mL of 2 M ammonium sulfate). Absorbance was measured at 560 nm every 30 s for 3 min at 25 °C. One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme required to inhibit 50% of the NBT reduction rate.

CAT activity was determined according to Roshan et al. (2018). An assay mixture was prepared with 600  $\mu\text{L}$  of 100 mM phosphate buffer (pH 7) and 200  $\mu\text{L}$  of 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reaction was started by adding 200  $\mu\text{L}$  of protein sample to the mixture. The decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was determined by measuring the absorbance at 240 nm every minute for 3 min at 25 °C. One unit of CAT activity was defined as the amount of enzyme needed to catalyse the decomposition of 1  $\mu\text{mol}$  of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per minute.

POD activity was determined according to Corona-Carrillo et al. (2014). An assay mixture was prepared with 870  $\mu\text{L}$  of

50 mM phosphate buffer (pH 6.8), 10  $\mu$ L of the protein sample and 10  $\mu$ L of 1 mM guaiacol. The reaction was started by adding 10  $\mu$ L of 3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the mixture. Absorbance was measured at 475 nm every minute for 3 min at 25 °C. One unit of POD activity was defined as the amount of enzyme needed to catalyse the peroxidation of 1 mmol of guaiacol per minute.

### Statistical analysis

All physiological and biochemical tests were performed in triplicate and results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Normal distribution of the data was confirmed using a Shapiro-Wilk test. Data were statistically analysed by one-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test at  $p < 0.05$  as significance level using the statistical packages SPSS® (ver. 15.0) and NCSS® for Windows.

### Results

Water content of dried freshly harvested seeds of *E. chiotilla* and *S. pruinosus* was  $8.6 \pm 0.5\%$  and  $7.2 \pm 0.3\%$ , respectively. After *ex situ* storage and *in situ* burial, seed WC did not show significant difference with freshly harvested seeds. However, WC of buried seeds of *E. chiotilla* and *S. pruinosus* increased to  $28.6 \pm 4.7\%$  and  $28.1 \pm 3.7\%$  after one day of rainfall, and then decreased to 8–9% and 7–8%, respectively, 24 h after rainfall.

#### Experiment 1: comparison between *ex situ* and *in situ* storage

##### Effect of *ex situ* storage and *in situ* burial on the seed viability and vigour

Germination of both *E. chiotilla* and *S. pruinosus* seeds remained above 90% after two years of *ex situ* storage (Fig. 1A, B). After one year of burial, seeds of both species germinated at ca. 35%. After two years of burial seeds of *E. chiotilla* germinated to  $23 \pm 2.8\%$ , whereas those of *S. pruinosus* were dead (verified by tetrazolium chloride test) (Fig. 1A, B). After one year of storage, T<sub>50</sub> values of both species were respectively 1.2 and 1.6 days higher compared to the T<sub>50</sub> values in stored *ex situ* seeds (Fig. 1C, D). In *E. chiotilla*, T<sub>50</sub> values of two-year old seeds were also significantly higher for buried seeds. Solute leakage from seeds of both species buried *in situ* for one and two years was more than twice that of seeds stored *ex situ* (Fig. 1E, F).

##### Effect of *ex situ* storage and *in situ* burial on markers of oxidative stress

Before storage, the MDA contents in seeds harvested in 2018 were ca. 16 nmol g<sup>-1</sup> DW for both species. Seeds harvested in 2017 and buried *in situ* for one year exhibited a MDA content that was 2.4-fold higher than seeds stored *ex situ*. In contrast, the MDA content in seeds harvested in 2016 and buried for two years was low and not significantly different from those stored *ex situ* (Fig. 2A, B).

The soluble protein content in freshly harvested seeds of *E. chiotilla* and *S. pruinosus* was 118.8 and 164.8 mg g<sup>-1</sup> DW, respectively. Compared to seeds stored *ex situ*, it was significantly lower in buried seeds of both species, particularly after two years of storage (Fig. 2C, D). The content of carbonyl groups from freshly harvested *E. chiotilla* and *S. pruinosus* seeds was 0.022 and 0.010  $\mu$ mol mg<sup>-1</sup> protein, respectively. Both species showed similar contents in seeds harvested in 2017 and stored *ex situ* or buried *in situ* for one year. However, for the seeds harvested

in 2016 and buried for two years, the content of carbonyl groups in *E. chiotilla* and *S. pruinosus* seeds was respectively 5.3-fold higher and 28.4-fold higher, compared to those seeds stored *ex situ* (Fig. 2E, F).

The GSH and GSSG contents in freshly harvested seeds of *E. chiotilla* and *S. pruinosus* were 277.2 and 178.7 nmol g<sup>-1</sup> DW, and 304.7 and 175.5 nmol g<sup>-1</sup> DW, respectively (Fig. 3). Seeds of both species stored *ex situ* showed significantly higher GSH and lower GSSG contents than seeds buried *in situ*. As a result, the glutathione half-cell redox potentials were significantly higher in seeds buried *in situ* compared to seeds stored *ex situ*, indicating a difference in the oxidative response according to the storage environment (Fig. 3).

Activities of antioxidant enzymes exhibited similar values in seeds that were harvested in 2018 before storage and in seeds that were harvested in 2017 and stored *ex situ* and *in situ* for one year. However, in seeds of *E. chiotilla* harvested in 2016 and buried for two years, the activities of SOD, CAT and POD were 1.6, 1.8 and 2.9-fold lower respectively than in seeds stored *ex situ* (Fig. 4A, C, E). Likewise, in seeds of *S. pruinosus* buried for two years, the activity of SOD was 4.2-fold lower, and activities of CAT and POD were not detectable in comparison with seeds stored *ex situ* (Fig. 4B, D, F).

#### Experiment 2

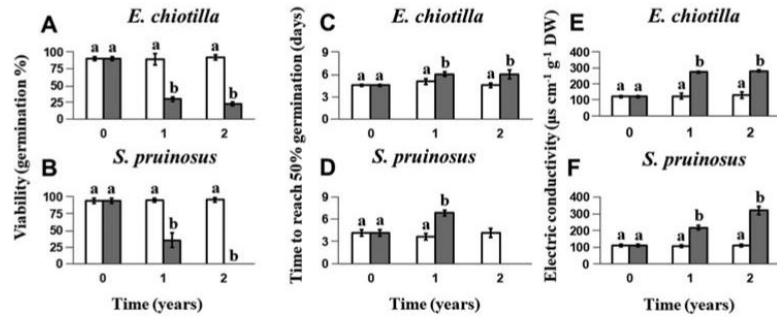
In experiment 1, it is unclear whether time and conditions of storage, year of harvest or the combination of both was responsible for the differences found between seeds buried *in situ* for one and two years. For this reason, the oxidative markers and loss of viability were monitored in seeds harvested in 2018 and buried *in situ* for shorter time intervals (6, 12, 14 and 16 months). In addition, rainy periods during burial were monitored as a proxy to assess imbibition/desiccation cycles of buried seeds (see Supplementary Fig. S1).

In *E. chiotilla* seeds, viability was maintained during the first rainy season and dry season, then decreased abruptly from 83.5% at 12 months of burial (at the beginning of the second rainy season to 10% after 14 months (Fig. 5A). In *S. pruinosus* seeds, a different pattern was observed. Loss of viability started during the first rainy season but was accelerated during the dry season between 6 and 12 months after burial (Fig. 5B). Time of 50% germination in the remaining living seed lots increased progressively during burial of both species, resulting in 1.7-fold increase after 14 months in *E. chiotilla* seeds and 1.4-fold increase after 12 months in *S. pruinosus* seeds (Fig. 5C, D). Symptoms of deterioration were observed in the EC profiles during storage, exhibiting a similar pattern as loss of viability. In *E. chiotilla* seeds, EC slightly increased 1.3-fold during the first 12 months of burial then 1.7-fold between 12 and 14 months (Fig. 5E). Likewise, EC in *S. pruinosus* seeds increased 1.7-fold between 6 and 12 months of burial, and 1.6-fold between 12 and 14 months of storage while all seeds were already dead (Fig. 5F).

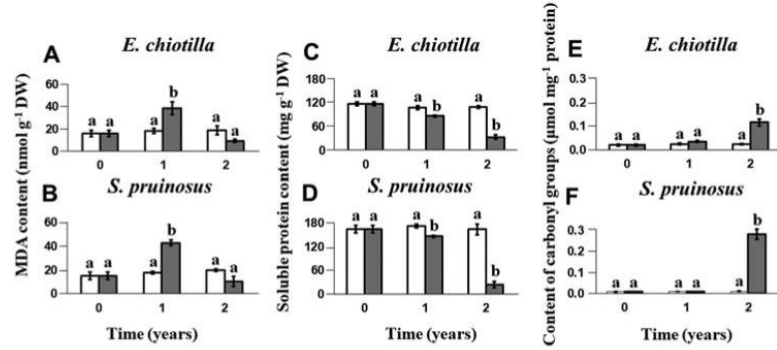
##### Changes in markers of oxidative stress during burial

The MDA contents in *E. chiotilla* seeds increased progressively 2.6-fold during 12 months of burial before the dramatic loss of viability. Thereafter, they decreased 4.4-fold after 14 months of burial that led to the largest increase in dead seeds, compared to freshly harvested seeds (Fig. 6A). A similar pattern was also observed in *S. pruinosus* seeds, with a 2-fold increase in MDA

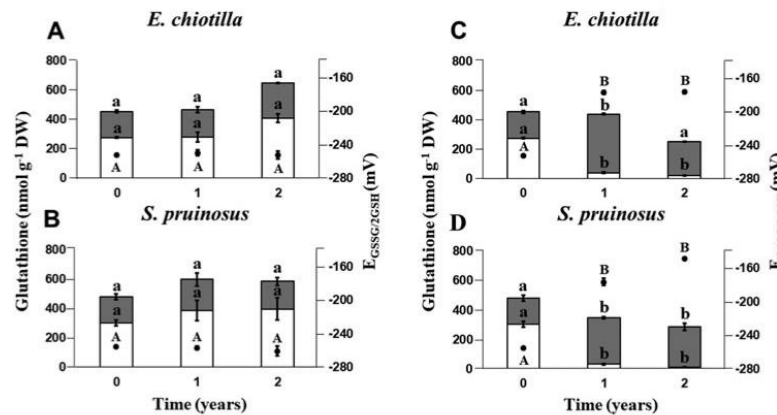




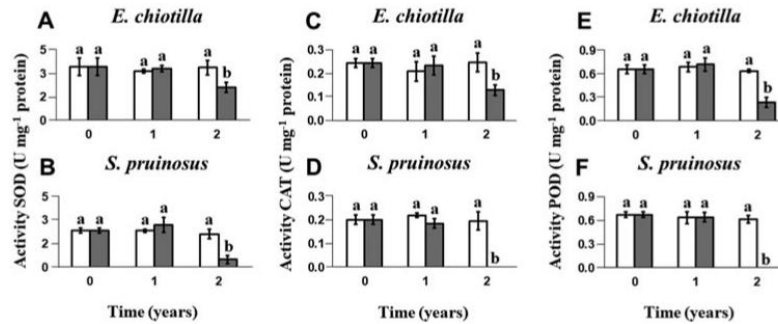
**Figure 1.** Effect of *ex situ* storage (white bars) and *in situ* burial (grey bars) for 0, 1 and 2 years on viability (A, B),  $T_{50}$  (C, D) and electric conductivity (E, F) of *E. chiotilla* and *S. pruinus* seeds. Data show mean  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ). Comparison of means was carried out between seeds stored *ex situ* and buried *in situ* at the same time.



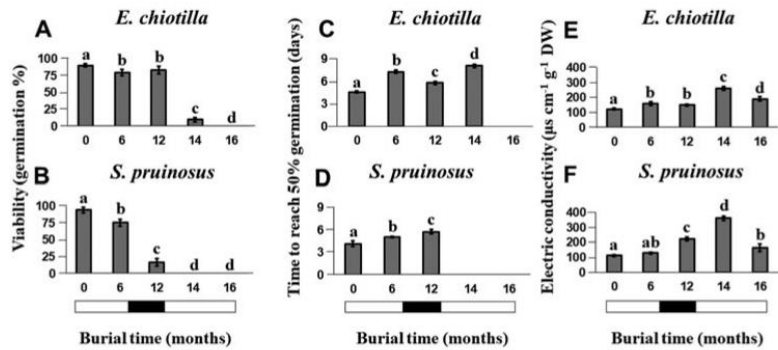
**Figure 2.** Effect of *ex situ* storage (white bars) and *in situ* burial (grey bars) for 0, 1 and 2 years on the content of MDA (A, B), soluble proteins (C, D) and oxidized proteins (E, F) of *E. chiotilla* and *S. pruinus* seeds. Data show mean  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ). Comparison of means was carried out between seeds stored *ex situ* and buried *in situ* at the same time.



**Figure 3.** Effect of *ex situ* storage (A, B) and *in situ* burial (C, D) for 0, 1 and 2 years on glutathione content and redox state of *E. chiotilla* and *S. pruinus* seeds. GSH (white bars), GSSG (grey bars) and  $E_{\text{GSSG/GSH}}$  (black circles, right Y-axis). Data show mean  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ). Lowercase letters indicate the comparison of GSH and GSSG, while uppercase letters indicate the comparison of  $E_{\text{GSSG/GSH}}$  between seeds stored *ex situ* and buried *in situ* at the same time.



**Figure 4.** Effect of *ex situ* storage (white bars) and *in situ* burial (grey bars) for 0, 1 and 2 years on the activity of SOD (A, B), CAT (C, D) and POD (E, F) of *E. chiotilla* and *S. pruinus* seeds. Data show mean  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ). Comparison of means was carried out between seeds stored *ex situ* and buried *in situ* at the same time.

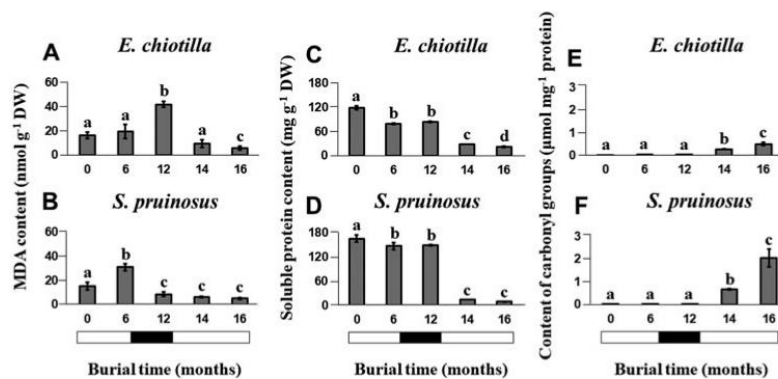


**Figure 5.** Viability (A, B), T<sub>50</sub> (C, D) and electric conductivity (E, F) of *E. chiotilla* and *S. pruinus* seeds buried *in situ* for 0, 6, 12, 14 and 16 months. Data show mean  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ). Seeds buried *in situ* were exposed to two rainy periods (white bars) and one dry period (black bar).

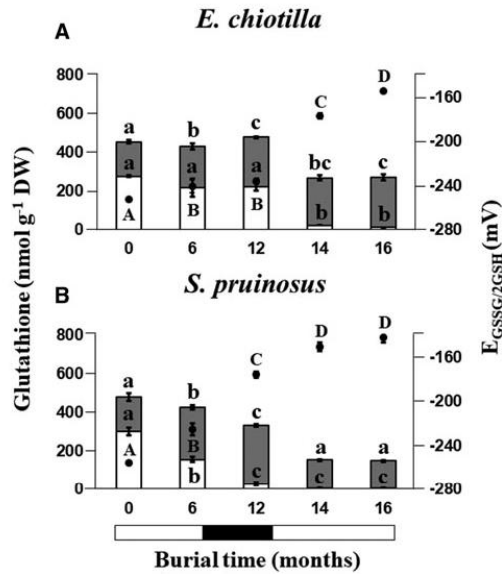
content at 6 months and a 3.6-fold decrease at 12 months (Fig. 6B).

In *E. chiotilla* seeds, content of soluble proteins decreased slightly during burial when seeds remained alive, then decreased

3-fold after 14 months of burial when most seeds were found dead (Fig. 6C). In contrast, the soluble proteins content of *S. pruinus* slightly decreased during storage leading to the decline of viability at 12 months of burial, thereafter they decreased by



**Figure 6.** MDA (A, B), soluble proteins (C, D) and oxidized protein contents (E, F) of *E. chiotilla* and *S. pruinus* seeds buried *in situ* for 0, 6, 12, 14 and 16 months. Data show mean  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ). Seeds buried *in situ* were exposed to two rainy periods (white bars) and one dry period (black bar).



**Figure 7.** Glutathione content and redox state of *E. chiotilla* (A) and *S. pruinosus* (B) seeds buried *in situ* for 0, 6, 12, 14 and 16 months. GSH (white bars), GSSG (grey bars) and  $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$  (black circles, right Y-axis). Data show mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Seeds buried *in situ* were exposed to two rainy periods (white bars) and one dry period (black bar). Lowercase letters indicate the comparison of GSH and GSSG, while uppercase letters indicate the comparison of  $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ .

10.6-fold in dead seeds after 14 months (Fig. 6D). Contents of carbonyl groups in seeds of both species did not change significantly during the first 12 months of burial. An important increase was only observed concomitantly with the increase in dead seeds of both species at 14 and 16 months (Fig. 6E, F).

In *E. chiotilla* seeds, GSH content mostly decreased between 12 and at 14 months corresponding to the loss of viability, while GSSG did not change significantly during that period (Fig. 7). This resulted in an oxidative shift in  $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$  from  $-236.2$  at 12 months to  $-176.8$  mV at 14 months. This value continued to increase, reaching  $-154.6$  mV in dead seeds after 16 months

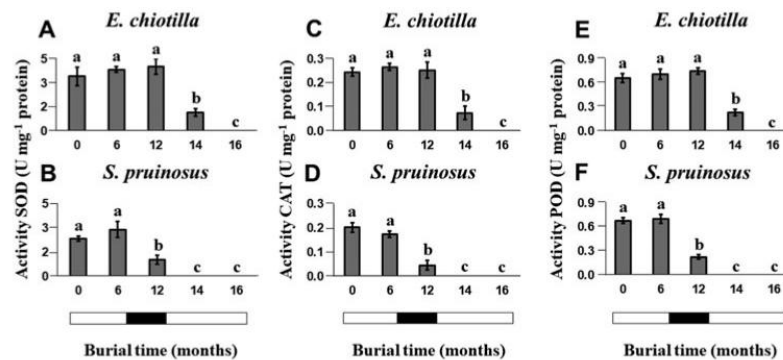
of burial (Fig. 7A). A similar pattern was observed in *S. pruinosus* seeds during the 12 months of burial. Within that period, the  $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$  values shifted from  $-255.4$  to  $-175.6$  mV and reached  $-150.1$  mV at 14 months in dead seeds (Fig. 7B).

A high antioxidant activity was observed during the first rainy season, but then decreased during the loss of viability in buried seeds of both species, respectively between 12 and 14 months in *E. chiotilla* and between 6 and 12 months of burial in seeds of *S. pruinosus*, a period in which more than 50% of antioxidant activity was lost (Fig. 8). Altogether, this suggests that seeds death during burial is accompanied by an oxidative shift.

## Discussion

Under *in situ* conditions, seeds of both species form a short-term persistent soil seed bank (Fig. 1A, B and 5A, B). Similar results have been reported for other species of cacti, such as *Opuntia rastrea* (Montiel and Montaña, 2003), *Arthrocerus glaziovii*, *Arthrocerus melanurus* (Cheib and García, 2012), *Harrisia fragrans* (Goodman et al., 2012), *Stenocereus stellatus* (Álvarez-Espino et al., 2014), *Discocactus bahiensis* (Nascimento and Meiado, 2017) and *Echinopsis* and *Gymnocalycium* spp (Lindow-López et al., 2018).

In experiment 1, *E. chiotilla* and *S. pruinosus* seeds stored *ex situ* deteriorated slower than those buried *in situ* (Fig. 1–4). During *ex situ* storage, the dry condition at room temperature ( $25 \pm 3$  °C) maintained a low WC in seeds between 7–9%. A plausible explanation is that seeds would have formed a glassy state leading to restricted molecular diffusion, thereby slowing the rates of biochemical reactions involved in seed deterioration (Walters et al., 2005; Ballesteros and Walters, 2011). However, a biophysical study of water properties as a function of temperature is needed to ascertain such explanation. In contrast, seeds of both species harvested in 2017 and 2016, and buried *in situ* for one and two years, respectively, were exposed to different rainy periods with fluctuant temperatures in contrast with seeds stored *ex situ* (see Supplementary Fig. S1). Throughout the burial, seeds stored for one or two years experienced one or two precipitation cycle with warm temperature between 25 °C and 33 °C, leading to increased WC up to 28% after rainfall. These conditions are similar to accelerated ageing conditions because the seeds are no longer in a glassy state and are submitted to a deranged



**Figure 8.** Activity of SOD (A, B), CAT (C, D) and POD (E, F) of *E. chiotilla* and *S. pruinosus* seeds buried *in situ* for 0, 6, 12, 14 and 16 months. Data show mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Seeds buried *in situ* were exposed to two rainy periods (white bars) and one dry period (black bar).



metabolism (Rajjou *et al.*, 2008; Ballesteros and Walters, 2011; Zhou *et al.*, 2020).

A limiting factor in experiment 1 was the use of seeds harvested in different years from which the maternal environment was not monitored. Indeed, seed longevity can be altered by the maternal environment during seed formation and maturation (Long *et al.*, 2015; Leprince *et al.*, 2017). Furthermore, the storage conditions of buried seeds for one and two years were different: seeds stored for two years experienced two rainy seasons in contrast to seeds stored for one year. Therefore, in order to clarify if the loss of viability was related with redox imbalance as a consequence of *in situ* burial, experiment 2 used seeds of the same harvest to avoid the complication of a putative impact of the maternal environment on seed longevity and to better take into account the rehydration/dehydration cycle. Interestingly, seeds of *E. chiotilla* were able to maintain a high viability throughout the first year of burial, during which they were exposed to high and dry storage conditions. This could be explained by a high antioxidant activity throughout this period. In contrast, the moist soil conditions during the first six months were already deleterious for *S. pruinosus* as viability significantly declined. Loss of viability was accelerated during the dry season.

This study showed no correlation between the content of carbonyl groups and MDA as oxidative markers and longevity during storage. The increase in carbonyl groups occurred when the seeds were mostly or completely dead (Fig. 5A, B). Changes in MDA contents during loss of viability did not match the patterns of redox imbalance. In experiment 2, 14 months of burial in *E. chiotilla* and 12 months in *S. pruinosus* seeds lead to a strong decrease in antioxidant activity. If we assume that such decrease would lead to an increase in oxidation as the  $E_{GSSG/CGH}$  suggest, we should have expected a major increase in MDA, which was not the case. Therefore, our data argues against the use of TBA as a proxy to assess MDA as a marker of oxidative damage during storage in cacti seeds. There are other examples suggesting that great care should be taken in interpretation in the data using the TBA assay (Morales and Munné-Bosch, 2019). Similar results were reported in aged seeds of *Glycine max* (Priestley and Leopold, 1979; Priestley *et al.*, 1980).

The decrease in GSH content and increase in GSSG in the seeds of the species studied resulted in an increase in  $E_{GSSG/2GSH}$  values during *in situ* burial (Fig. 7). In buried seeds of *E. chiotilla* and *S. pruinosus*,  $E_{GSSG/2GSH}$  values of  $-176.8$  and  $-175.6$  mV were recorded at 14 and 12 months, respectively, corresponding to the times when seed viability loss was recorded (Fig. 5A, B). At later times, when most seeds were dead,  $E_{GSSG/2GSH}$  values were recorded at *ca.*  $-150$  mV. According to Kranner *et al.* (2010), values of  $E_{GSSG/2GSH}$  between  $-180$  and  $-160$  mV show a loss in viability, while values higher than  $-160$  mV indicate that the seeds have died. Similar results to those observed in this study have been reported in *S. maritima* seeds, which lost viability at  $E_{GSSG/2GSH}$  values between  $-180$  and  $-160$  mV (Seal *et al.*, 2010). In seeds of other species such as *Hordeum vulgare*, *D. carota*, *C. sativus*, *R. sativus* and *L. sativa*, viability loss has been reported to occur at  $E_{GSSG/2GSH}$  ranges between  $-200$  and  $-180$  mV (Roach *et al.*, 2018; Stegner *et al.*, 2022). Altogether, our data confirm that the redox imbalance accompanies loss of viability in seeds of *E. chiotilla* and *S. pruinosus* buried *in situ*. Long *et al.*, 2011 suggested that wet-dry cycles play a key role for seed persistence in soil through a mechanism that may involve the recovery of the glutathione antioxidant system. At the species level, our data do not support this hypothesis

for cactus seeds. A year-long wet-dry cycle did not affect GSH content in *E. chiotilla* whereas the moist conditions during the first six months of storage led to a significant decrease in GSH content that was exacerbated by the dry season in *S. pruinosus* seeds. For both species, the antioxidant activities remained high, suggesting that the GSH homeostasis is regulated differently between both species. This warrants further work investigating the response of GSH synthesis and antioxidant responses to short- and long-term wet-dry cycles.

**Supplementary material.** The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0960258524000011>.

**Acknowledgements.** We would like to thank Mina Königsberg Fainstein for her assistance in the determination of MDA content and redox potential. This work was supported by Universidad Autónoma Metropolitana and a grant from CONAHCYT to David A. Guzmán-Hernández (with scholarship registration CVU: 718628) as part of his Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud at Universidad Autónoma Metropolitana.

**Author contributions.** D.A.G-H. performed the experiments, collected and analysed the data, and drafted the manuscript; C.B-M., J.M.V-H. and L.J.P-F. conceived the project, contributed to the experimental design, data analysis and interpretation, and critical revision of the manuscript. All authors reviewed and approved the final manuscript.

**Competing interest.** The authors declare no competing financial interest.

## References

- Álvarez-Espino R, Godínez-Álvarez H and De la Torre-Almaráz R (2014) Seed banking in the columnar cactus *Stenocereus stellatus*: distribution, density and longevity of seeds. *Seed Science Research* **24**, 315–320.
- Arellano E and Casas A (2003) Morphological variation and domestication of *Escontria chiotilla* (Cactaceae) under silvicultural management in the Tehuacán Valley, Central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* **50**, 439–453.
- Ballesteros D and Walters C (2011) Detailed characterization of mechanical properties and molecular mobility within dry seed glasses: relevance to the physiology of dry biological systems. *The Plant Journal* **68**, 607–619.
- Cano-Salgado A, Zavala-Hurtado JA, Orozco-Segovia A, Valverde-Valdés MT and Pérez-Rodríguez P (2012) Composition and abundance of the seed bank in a semiarid region in tropical Mexico: spatial and temporal patterns. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **83**, 437–446.
- Cheib LA and García SQ (2012) Longevity and germination ecology of seeds of endemic Cactaceae species from high-altitude sites in south-eastern Brazil. *Seed Science Research* **22**, 45–53.
- Corona-Carrillo JI, Flores-Ponce M, Chávez-Najera G and Díaz-Pontones DM (2014) Peroxidase activity in scutella of maize in association with anatomical changes during germination and grain storage. *Springer Plus* **3**, 1–16.
- Ebone LA, Caverzan A and Chavarria G (2019) Physiologic alterations in orthodox seeds due to deterioration processes. *Plant Physiology and Biochemistry* **145**, 34–42.
- Farooq M, Basra SMA, Ahmad N and Hafeez K (2005) Thermal hardening: a new seed vigor enhancement tool in rice. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**, 187–193.
- Fu YB, Ahmed Z and Diederichsen A (2015) Towards a better monitoring of seed ageing under *ex situ* seed conservation. *Conservation Physiology* **3**, cov026.
- García-Cruz L, Valle-Guadarrama S, Salinas-Moreno Y and Joaquín-Cruz E (2013) Physical, chemical, and antioxidant activity characterization of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruits. *Plant Foods for Human Nutrition* **68**, 403–410.
- García E (2004) *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)* (5th Edn). México, Universidad Nacional Autónoma de México.
- García QS, Giorni VT, Müller M and Munné-Bosch S (2012) Common and distinct responses in phytohormone and vitamin E changes during seed



- burial and dormancy in *Xyris bialata* and *X. peregrina*. *Plant Biology* **14**, 347–353.
- Gerna D, Ballesteros D, Arc E, Stöggel W, Seal CE, Marami-Zonouz N and Roach T** (2022) Does oxygen affect ageing mechanisms of *Pinus densiflora* seeds? A matter of cytoplasmic physical state. *Journal of Experimental Botany* **73**, 2631–2649.
- Goodman J, Walters D, Bradley K, Maschinski J and Salazar A** (2012) Seeds of endangered *Harrisia fragrans* from persistent soil seed banks withstand orthodox storage conditions. *Haseltonia* **18**, 85–94.
- Hay FR and Whitehouse KJ** (2017) Rethinking the approach to viability monitoring in seed genebanks. *Conservation Physiology* **5**, cox009.
- Hay FR and Probert RJ** (2013) Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. *Conservation Physiology* **1**, cot030.
- Hernández-Arciga U, Hernández-Álvarez D, López-Cervantes SP, López-Díazguerrero NE, Alarcón-Aguilar A, Luna-López A and Königsberg M** (2020) Effect of long-term moderate-exercise combined with metformin-treatment on antioxidant enzymes activity and expression in the gastrocnemius of old female Wistar rats. *Biogerontology* **21**, 787–805.
- Holland JN and Molina-Freaner F** (2013) Hierarchical effects of rainfall, nurse plants, granivory and seed banks on cactus recruitment. *Journal of Vegetation Science* **24**, 1053–1061.
- ISTA** (2020) *International rules for seed testing*. Bassersdorf, Switzerland, International Seed Testing Association.
- Jyoti and Malik CP** (2013) Seed deterioration: a review. *International Journal of Life Science, Biotechnology and Pharmaceutical Research* **2**, 374–385.
- Kranner I, Birtić S, Anderson KM and Pritchard HW** (2006) Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radical Biology and Medicine* **40**, 2155–2165.
- Kranner I, Minibayeva FV, Beckett RP and Seal CE** (2010) What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist* **188**, 655–673.
- Kurek P, Plitta-Michalak B and Ratajczak E** (2019) Reactive oxygen species as potential drivers of the seed aging process. *Plants* **8**, 174.
- Lee JS, Velasco-Punzalan M, Pacleb M, Valdez R, Kretzschmar T, McNally KL and Hay FR** (2019) Variation in seed longevity among diverse Indica rice varieties. *Annals of Botany* **124**, 447–460.
- Leprince O, Pellizzaro A, Berriri S and Buitink J** (2017) Late seed maturation: drying without dying. *Journal of Experimental Botany* **68**, 827–841.
- Lindow-López L, Galíndez G, Sühring S, Pastrana-Ignes V, Gorostiague P, Gutiérrez A and Ortega-Baes P** (2018) Do cacti form soil seed banks? An evaluation using species from the Southern Central Andes. *Plant Biology* **20**, 1053–1058.
- Long RL, Kranner I, Panetta FD, Birtic S, Adkins SW and Steadman KJ** (2011) Wet-dry cycling extends seed persistence by re-instating antioxidant capacity. *Plant and Soil* **388**, 511–519.
- Long RL, Gorecki MJ, Renton M, Scott JK, Colville L, Goggin DE, Commander LE, Westcott DA, Cherry H and Finch-Savage WE** (2015) The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise. *Biological Reviews* **90**, 31–59.
- Montiel S and Montaña C** (2003) Seed bank dynamics of the desert cactus *Opuntia rastrera* in two habitats from the Chihuahuan Desert. *Plant Ecology* **166**, 241–248.
- Morales M and Munné-Bosch S** (2019) Malondialdehyde: facts and artifacts. *Plant physiology* **180**, 1246–1250.
- Munné-Bosch S, Onate M, Oliveira PG and Garcia QS** (2011) Changes in phytohormones and oxidative stress markers in buried seeds of *Vellozia alata*. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **206**, 704–711.
- Nascimento JP and Meiado MV** (2017) *In situ* or *ex situ* seed conservation: which is more effective way to maintain seed longevity of an endangered cactus? *Plant Species Biology* **32**, 115–120.
- Parrilla-Taylor DP and Zenteno-Savín T** (2011) Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture* **318**, 379–383.
- Priestley DA and Leopold AC** (1979) Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. *Plant Physiology* **63**, 726–729.
- Priestley DA, McBride MB and Leopold AC** (1980) Tocopherol and organic free radical levels in soybean seeds during natural and accelerated aging. *Plant Physiology* **66**, 715–719.
- Rajjou L, Lovigny Y, Groot SP, Belghazi M, Job C and Job D** (2008) Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiology* **148**, 620–641.
- Ratajczak E, Malecka A, Bagniewska-Zadworna A and Kalembe EM** (2015) The production, localization and spreading of reactive oxygen species contributes to the low vitality of long-term stored common beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology* **174**, 147–156.
- Reed BM, Sarasan V, Kane M, Bunn E and Pence VC** (2011) Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* **47**, 1–4.
- Reyes de la Cruz H, Aguilar R and Sánchez de Jiménez E** (2004) Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70 (S6K). *Biochemistry* **43**, 533–539.
- Riewe D, Wiebach J and Altmann T** (2017) Structure annotation and quantification of wheat seed oxidized lipids by high-resolution LC-MS/MS. *Plant Physiology* **175**, 600–618.
- Roach T, Nagel M, Börner A, Eberle C and Kranner I** (2018) Changes in tocochromanols and glutathione reveal differences in the mechanisms of seed ageing under seedbank conditions and controlled deterioration in barley. *Environmental and Experimental Botany* **156**, 8–15.
- Roshan MR, Grassi G, Bergami E, Marques-Santos LF, Faleri C, Liberatori G and Corsi I** (2018) Co-exposure to titanium dioxide nanoparticles does not affect cadmium toxicity in radish seeds (*Raphanus sativus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **148**, 359–366.
- Sandate-Flores L, Romero-Esquivel E, Rodriguez-Rodriguez J, Rostro-Alanis M, Melchor-Martínez EM, Castillo-Zacarias C and Parra-Saldivar R** (2020) Functional attributes and anticancer potentialities of Chico (*Pachycereus weberi*) and Jotilla (*Escontria chiotilla*) Fruits Extract. *Plants* **9**, 1623.
- Seal CE, Zammit R, Scott P, Flowers TJ and Kranner I** (2010) Glutathione half-cell reduction potential and  $\alpha$ -tocopherol as viability markers during the prolonged storage of *Suaeda maritima* seeds. *Seed Science Research* **20**, 47–53.
- Silva GP, Sales JF, Nascimento KJT, Rodrigues AA, Camelo GN and Borges EEDL** (2020) Biochemical and physiological changes in *Dipteryx alata* Vog. Seeds during germination and accelerated aging. *South African Journal of Botany* **131**, 84–92.
- Stegner M, Wagner J and Roach T** (2022) Antioxidant depletion during seed storage under ambient conditions. *Seed Science Research* **32**, 150–156.
- Suresh A, Shah N, Kotecha M and Robin P** (2019) Evaluation of biochemical and physiological changes in seeds of *Jatropha curcas* L. under natural aging, accelerated aging and saturated salt accelerated aging. *Scientia Horticulturae* **255**, 21–29.
- Tian PP, Lv YY, Yuan WJ, Zhang SB and Hu YS** (2019) Effect of artificial aging on wheat quality deterioration during storage. *Journal of Stored Products Research* **80**, 50–56.
- Walck JL, Baskin JM, Baskin CC and Hidayati SN** (2005) Defining transient and persistent seed banks in species with pronounced seasonal dormancy and germination patterns. *Seed Science Research* **15**, 189–196.
- Walters C, Wheeler LM and Grotenhuis JM** (2005) Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research* **15**, 1–20.
- Xia F, Chen L, Sun Y and Mao P** (2015) Relationships between ultrastructure of embryo cells and biochemical variations during ageing of oat (*Avena sativa* L.) seeds with different moisture content. *Acta Physiologiae Plantarum* **37**, 1–11.
- Xin X, Lin XH, Zhou YC, Chen XL, Liu X and Lu XX** (2011) Proteome analysis of maize seeds: the effect of artificial ageing. *Physiologia Plantarum* **143**, 126–138.
- Zhou W, Chen F, Luo X, Dai Y, Yang Y, Zheng C and Shu K** (2020) A matter of life and death: molecular, physiological, and environmental regulation of seed longevity. *Plant, Cell & Environment* **43**, 293–302.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00155

Matrícula: 2183801758

Efecto del estrés oxidante en la viabilidad, germinación y vigor de semillas de *Escontria chiotilla* y *Stenocereus pruinosus*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 4 del mes de diciembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. LAURA JOSEFINA PEREZ FLORES  
DR. JOSE ALEJANDRO ZAVALA HURTADO  
DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ  
DRA. HILDA ARACELI ZAVALA MANCERA  
DR. JUAN MANUEL VILLA HERNANDEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:


DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: DAVID ALEJANDRO GUZMAN HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:


APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



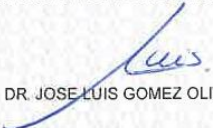
DAVID ALEJANDRO GUZMAN HERNANDEZ  
ALUMNO

REVISÓ




MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



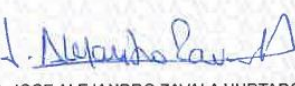
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA



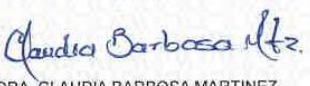
DRA. LAURA JOSEFINA PEREZ FLORES

VOCAL




DR. JOSE ALEJANDRO ZAVALA HURTADO

VOCAL



DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ

VOCAL



DRA. HILDA ARACELI ZAVALA MANCERA

SECRETARIO



DR. JUAN MANUEL VILLA HERNANDEZ