



## **Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**Unidad Iztapalapa**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA**

### **TESIS**

**“Participación de las proteínas LEA en la viabilidad de semillas de  
*Escontria chiotilla* conservadas *in situ* y *ex situ*”**

Que para obtener el grado de  
Maestra en Biología

### **PRESENTA**

Nancy Noemí Dorantes Mejía

Matrícula: 2192802218

Contacto: 5579282598

CO-DIRECTORA: M. en C. Angélica Martínez Bernal

CO-DIRECTOR: Dr. Juan Manuel Villa Hernández

ASESORA INTERNA: Dra. Claudia Barbosa Martínez

### **JURADO**

PRESIDENTE: Dra. Laura Josefina Pérez López

ASESORA Y SECRETARIO: Dra. Claudia Barbosa Martínez

VOCAL: Dra. María Dolores García Suárez

VOCAL: Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera

### **FECHA DEL EXAMEN DE GRADO**

IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO, A 01 DE ABRIL DEL 2022



La Maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT (001464).

El jurado designado por la Comisión del Posgrado en Biología, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis que presentó:

Biól. NANCY NOEMÍ DORANTES MEJÍA

El día 01 de ABRIL del año 2022

### COMITÉ TUTORAL Y JURADO DE EXAMEN



M. en C. Angélica Martínez Bernal  
Departamento de Biología, Área de Botánica, UAMI

CO-DIRECTORA



Dra. Laura Josefina Pérez López  
Departamento de Ciencias de la Salud, UAMI

PRESIDENTE



Dr. Juan Manuel Villa Hernández  
Instituto de Ecología UMAR, Campus Puerto Escondido

CO-DIRECTOR



Dra. Claudia Barbosa Martínez  
Departamento de Biología, UAMI

ASESORA Y SECRETARIO



Dra. María Dolores García Suárez  
Departamento de Biología, UAMI

VOCAL



Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera  
Programa de Posgrado en Botánica, Colegio de Posgraduados

VOCAL

## DEDICATORIA

A mi mamá, María del Carmen Mejía Alonso, la mujer más trabajadora y maravillosa que Dios me dio en esta vida para cuidarme, guiarme y quererme. Gracias por creer siempre en mí, por tu apoyo incondicional, por ser mi ejemplo a seguir, y por continuar alentándome a ser mejor persona cada día; te amo con todo mi corazón, mami.

A mi Comité Tutorial, que siempre me apoyó, me enseñó y me aconsejó en los momentos más difíciles. Con mucha dedicación y cariño, cada uno me impulsó durante este arduo camino de la Maestría; jamás lo habría logrado sin ustedes.

## Declaración de originalidad

La que suscribe Nancy Noemí Dorantes Mejía, alumna del posgrado Maestría en Biología, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "Participación de las proteínas LEA en la viabilidad de semillas de *Escontria chiotilla* conservadas *in situ* y *ex situ*",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante H. Jurado para lo obtención del grado de Maestra en Biología es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 24 de marzo del 2022.

Atentamente



---

Nancy Noemí Dorantes Mejía

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me brindó durante la Maestría y que permitió la realización del presente proyecto (1012560).

A la Universidad Autónoma Metropolitana por mi formación académica desde la Licenciatura en Biología, y por permitirme aprender de los mejores Docentes, personas admirables que enseñan con amor y pasión por la ciencia.

Al Coordinador de la Maestría en Biología, el Doctor Francisco José Gutiérrez Mendieta, por aclarar las millones y millones de dudas que iban surgiendo durante la Maestría; siempre le agradeceré por su comprensión y apoyo.

Al Laboratorio de Ecofisiología que me abrió nuevamente las puertas para seguir con mi formación académica durante el Posgrado; un laboratorio integrado por personas maravillosas.

A la Doctora Claudia Barbosa Martínez, por su apoyo, confianza, paciencia, por los consejos y sugerencias durante este proyecto, y por tanto cariño que me brindó desde la Licenciatura en Biología; la mejor madre académica que pude tener.

A la Maestra Angélica Martínez Bernal, que aceptó formar parte de mi Comité Tutorial desde el primer momento. Gracias por no olvidarse de mi en aquellas clases de Botánica, por jamás dejar de creer en mí, por todo su apoyo y tanto cariño y por guiarme con tanta paciencia durante esta etapa mi vida académica.

Al Doctor Juan Manuel Villa Hernández, por llevarme de la mano en el mundo de la Biología Molecular. Sus enseñanzas, consejos, todo su apoyo y confianza me

permitieron realizar y concluir este proyecto. Una persona que siempre admiraré por todo su conocimiento y esfuerzo en cada

A la Doctora María del Rocío Zárate, quien me brindó su apoyo para el análisis estadístico de los datos del presente proyecto; no tenía ningún tipo de obligación en ayudarme y aun así lo hizo. Gracias por su tiempo, paciencia y cariño.

A las Doctoras Araceli Zavaleta, Dolores García y Laura Pérez por haber aceptado ser miembros del jurado; cada una de sus observaciones fue de gran ayuda para mejorar la tesis. Y agradezco doblemente a la Doctora Laura Pérez, quien facilitó equipo y material de laboratorio para llevar a cabo parte experimental del proyecto.

A la Maestra, a nada de ser Doctora, en Biología Experimental, Carolina Franco, por brindarme tanta ayuda en el manejo de los equipos y el material empleados durante la parte experimental del presente proyecto; una linda persona siempre dispuesta a colaborar con la mejor actitud y una bella sonrisa. Gracias, Caro.

A la M. en Biología, Itzel Castillo, por asesorarme en trámites administrativos y académicos durante toda la Maestría, a pesar del corto tiempo de conocernos. Gracias por tu empatía y solidaridad.

A mis compañeros y amigos de la Maestría en Biología de la generación 19-P: Alex, Ana, Caro, Magda, Marhec, Rosario, Nacho, Manuel e Iván. Su apoyo y amistad facilitaron el camino del Posgrado.

A mis amigas y colegas, la M. en B. Ale López y la Doctora Yess Márquez, por permitirme estar presente en parte de su formación durante la Maestría; la dedicación en sus proyectos me impulsó para ingresar a la Maestría. Las quiero y admiro mucho.

A la Bióloga, Angélica Anastacio Del Angel por seguir siendo mi amiga, a pesar del tiempo y la distancia. Eres una gran amiga, la cual he llegado a apreciar como una hermana. Te admiro por la gran mujer que eres y te agradezco por seguir a mi lado, Angie preciosa; mi amiga y mi hermana por siempre.

A uno de mis mejores amigos, Alejandro Hernández García, quien vivió conmigo todo este camino de la Maestría. No sólo fuiste mi compañero de clases, te convertiste en mi mejor amigo y, prácticamente, en mi hermano. Gracias, porque fuiste mi cómplice en cada una de mis locuras, porque me aguantaste, me cuidaste y procuraste en cada momento difícil, porque me levantaste con cada consejo cuando me sentía derrotada, y porque seguiste conmigo hasta el final de esta etapa. Amigo mío, siempre llevaré nuestra amistad tatuada en la piel y en mi corazón.

A otro de mis mejores amigos, Abraham Correa, quien me regaló momentos inolvidables, aún en la distancia. Me cuidaste y procuraste cada vez que tuviste la oportunidad escuchándome y aguantándome en los momentos difíciles; me enseñaste que, a pesar de los problemas, nuestra amistad es inquebrantable; te adoro, amigo.

A una de mis mejores amigas, Ana Paola Zepeda López, quien me ha brindado su bella amistad desde la Preparatoria Andersen. Amiga Pao, te admiro y respeto mucho; eres una de las mujeres más trabajadora, nobles y dedicadas que he conocido. Te agradezco por seguir en mi vida, por todo tu apoyo, por jamás dejar de confiar en mí y por hacerme sentir parte de tu familia; daré mi mayor esfuerzo en la vida por llegar a ser, al menos, la mitad de mujer que eres tú. Te quiero, Pao.

A mis buenos amigos, Aldo Melgoza, David Guzmán, Deira Gordillo y Francisco Macías, por regalarme divertidos momentos en CoD®, a todos les agradezco porque cada partida fue un respiro ante tanto estrés; hermosas personas que llevaré siempre en mi corazón. Especialmente a Angel Rouse quien, además, se convirtió en una persona muy especial en mi vida, por demostrarme tanto cariño en la distancia y en aquellos días inolvidables en Hermosillo; el hermanito más hermoso que la vida pudo regalarme.

Especialmente, agradezco al Biólogo José Ramón Hernández Martínez, por haberme brindado su amistad, por haberme soportado y cuidado en mis peores momentos, por su apoyo y por tantas lecciones de vida. Fuiste una pieza fundamental durante esta etapa, porque sin ti no habría sido la misma experiencia. Me regalaste respiros cuando más los necesitaba, nunca me negaste tu ayuda, jamás me criticaste, me regalaste los momentos más felices de mi vida, me hiciste sentir plena con tu compañía, me hiciste reír y me hiciste llorar; me hiciste sentir viva, y no tengo forma de agradecerte. Atesoraré en mi corazón cada minuto que compartimos. Eres de las personas más maravillosas que he conocido y viviré agradecida con la vida y con Dios por haberte puesto en mi camino, a pesar de todo. Seré feliz con tu felicidad y aplaudiré cada uno de tus logros; y aunque nuestros caminos se separen, yo seguiré ahí, apoyándote y queriéndote. Aun en la sombra de la amistad, te amaré por siempre...

## RESUMEN

*Escontria chiotilla* (Cactaceae) es una especie endémica de México, única dentro del género y sólo se reproduce sexualmente, por lo que la formación de bancos de semillas es una vía fundamental para su reproducción. En cactáceas, la viabilidad de las semillas es variable entre especies y son diversos los factores que intervienen para su mantenimiento. Las semillas de las especies que se distribuyen en zonas áridas y semiáridas, como *E. chiotilla*, presentan adaptaciones que les permiten mantenerse viables y son el resultado de una serie de procesos celulares y moleculares durante su desarrollo. La viabilidad de las semillas con la presencia de diversas biomoléculas, como las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (LEA). Debido a la poca información sobre los genes de proteínas con relación a la viabilidad en semillas de cactáceas, resulta interesante analizar las proteínas en semillas de *E. chiotilla* almacenadas *ex situ* durante 0 y 10 años, enterradas posteriormente *in situ* y exhumadas a los 6, 12 y 18 meses. Los niveles de proteínas totales fueron cuantificados en las semillas de *E. chiotilla* almacenadas *in situ* y se analizó el efecto de los factores climáticos para evaluar una posible correlación entre la viabilidad y la concentración de las proteínas totales. Los resultados demostraron que los niveles de viabilidad de las semillas de esta especie almacenadas *ex situ* durante 0 y 10 años es >75%. Las semillas almacenadas *in situ*, presentaron una correlación entre los niveles de viabilidad y la concentración de proteínas totales, ya que ambos disminuyen drásticamente a los 18 meses de enterramiento, probablemente debido a los factores ambientales como la precipitación pluvial y la temperatura. El análisis de los alineamientos de secuencias nucleotídicas de genes reportados para las proteínas LEA en cuatro especies de cactáceas, y la revisión de diversas fuentes sobre biomoléculas implicadas en la viabilidad y longevidad de semillas, indicó que las proteínas LEA son un grupo conservado, por lo que no se descarta la participación de estas biomoléculas en la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla*. Finalmente, es importante resaltar que los estudios de conservación *ex situ* e *in situ* permiten contribuir con las estrategias de conservación del acervo genético de las especies y sus poblaciones, a mediano y largo plazo.

## ABSTRACT

*Escontria chiotilla* (Cactaceae) is an endemic species of Mexico, unique within the genus and only reproduces sexually, so the formation of seed banks is a fundamental way for its reproduction. In Cactaceae, seed viability is variable among species and there are several factors involved in their maintenance. The seeds of species distributed in arid and semi-arid zones, such as *E. chiotilla*, present adaptations that allow them to remain viable and are the result of a series of cellular and molecular processes during their development. Seed viability with the presence of diverse biomolecules, such as late embryogenesis abundant proteins (LEA). Due to the limited information on protein genes in relation to viability in Cactaceae seeds, it is interesting to analyze proteins in *E. chiotilla* seeds stored *ex situ* for 0 and 10 years, subsequently buried *in situ* and exhumed at 6, 12 and 18 months. Total protein levels were quantified in *E. chiotilla* seeds stored *in situ* and the effect of climatic factors was analyzed to evaluate a possible correlation between viability and total protein concentration. The results showed that the viability levels of seeds of this species stored *ex situ* for 0 and 10 years was >75%. Seeds stored *in situ*, presented a correlation between viability levels and total protein concentration, as both decrease drastically after 18 months of burial, probably due to environmental factors such as rainfall and temperature. The analysis of nucleotide sequence alignments of genes reported for LEA proteins in four Cactaceae species, and the review of diverse sources on biomolecules involved in seed viability and longevity, indicated that LEA proteins are a conserved group, so the participation of these biomolecules in the viability of *E. chiotilla* seeds is not discarded. Finally, it is important to emphasize that *ex situ* and *in situ* conservation studies can contribute to strategies for the conservation of the genetic pool of species and their populations in the medium and long term.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	XV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XVI
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	4
2.1. Familia Cactaceae en México.....	4
2.2. Importancia de los bancos de semillas .....	8
2.3. Desarrollo de la semilla y periodo de embriogénesis tardía .....	9
2.4. Viabilidad y Longevidad.....	13
2.5. Conservación <i>in situ</i> y <i>ex situ</i> .....	14
2.6. Semillas ortodoxas .....	15
2.7. Proteínas en semillas.....	17
2.7.1. Proteínas de almacenamiento de semillas .....	18
2.7.2. Proteínas y otras biomoléculas relacionadas con la tolerancia a la desecación y viabilidad .....	19
2.7.3. Características y adaptaciones de semillas en ambientes áridos y semiáridos .....	30
2.8. Características de la especie de estudio: <i>Escontria chiotilla</i> (F.A.C. Weber ex K. Schum.) Rose .....	31
2.9. Área de estudio.....	34
2.9.1. Características del Valle de Tehuacán-Cuicatlán .....	34
2.9.2. Descripción del micrositio de estudio .....	36
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	39
4. HIPÓTESIS.....	39

5.	OBJETIVOS.....	40
6.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
6.1.	Material biológico de cosechas 2008 y 2018 .....	41
6.2.	Almacenamiento <i>in situ</i> y <i>ex situ</i> .....	42
6.3.	Siembra de semillas en placas de agar bacteriológico.....	42
6.4.	Viabilidad de las semillas de <i>E. chiotilla</i> .....	43
6.5.	Elementos y factores climáticos: Efecto de la temperatura y humedad en la viabilidad de las semillas.....	44
6.6.	Extracción y cuantificación de proteínas totales .....	44
6.7.	Correlación entre los niveles de proteínas totales y la viabilidad de las semillas de <i>E. chiotilla</i> almacenadas en condiciones <i>in situ</i> .....	45
6.8.	Alineamientos de secuencias nucleotídicas de genes LEA reportados en la literatura .....	45
6.9.	Proteínas y moléculas implicadas en procesos de viabilidad y longevidad en semillas de cactáceas y familias relacionadas .....	46
7.	RESULTADOS.....	48
7.1.	Viabilidad de las semillas de <i>Escontria chiotilla</i> .....	48
7.1.1.	Almacenamiento <i>ex situ</i> .....	48
7.1.2.	Almacenamiento <i>in situ</i> .....	51
7.2.	Efecto de la temperatura y precipitación pluvial en la viabilidad de las semillas .....	54
7.3.	Contenido de proteínas totales en semillas de <i>E. chiotilla</i> .....	59

7.4.	Correlación entre los niveles de proteínas totales y la viabilidad de las semillas de <i>E. chiotilla</i> almacenadas en condiciones <i>in situ</i> .....	61
7.5.	Secuencias y análisis filogenético de los genes LEA reportados para las especies de la familia Cactaceae.....	65
7.6.	Proteínas y moléculas implicadas en procesos de viabilidad y longevidad en semillas de cactáceas y familias relacionadas .....	69
8.	DISCUSIÓN .....	73
8.1.	Viabilidad de las semillas de <i>Escontria chiotilla</i> .....	73
8.1.1.	Almacenamiento <i>ex situ</i> .....	73
8.1.2.	Almacenamiento <i>in situ</i> .....	77
8.2.	Efecto de la temperatura y la precipitación pluvial en la viabilidad de las semillas de <i>E. chiotilla</i> .....	80
8.3.	Proteínas totales y su relación con la viabilidad en semillas de <i>E. chiotilla</i> .....	82
8.3.1.	Correlación entre los niveles de proteínas totales y la viabilidad de las semillas de <i>E. chiotilla</i> almacenadas en condiciones <i>in situ</i> .....	84
8.4.	Alineamientos y análisis filogenético de secuencias nucleotídicas de genes LEA reportados para la familia Cactaceae .....	85
8.5.	Proteínas y moléculas implicadas en procesos de viabilidad y longevidad en semillas de cactáceas	

	y familias relacionadas.....	87
9.	CONCLUSIONES .....	90
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	92
11.	APÉNDICE.....	111

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Características de semillas de algunas especies de la familia Cactaceae .....	7
<b>Cuadro 2.</b> Genes LEA reportados en la literatura en diferentes especies vegetales .....	29
<b>Cuadro 3.</b> Promedios (n=3) de las concentraciones de proteínas totales y Tiempo Medio de Germinación (TMG) de semillas de <i>E. chiotilla</i> de las cosechas 2008 y 2018 a diferentes tiempos de almacenamiento <i>in situ</i> .....	60
<b>Cuadro 4.</b> Porcentajes de identidad entre las secuencias nucleotídicas de cuatro especies de cactáceas ( <i>Opuntia streptacantha</i> , <i>Leuchtenbergia principis</i> , <i>Mammillaria bombycina</i> , <i>Opuntia ficus-indica</i> ) y <i>Suaeda salsa</i> . Generados mediante el programa BLAST.....	68
<b>Cuadro 5.</b> Longevidad reportada por diferentes autores para semillas de especies de cactáceas almacenadas en condiciones <i>ex situ</i> .....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Procesos fisiológicos y metabólicos durante el desarrollo y germinación de semillas ortodoxas .....	12
<b>Figura 2.</b> <i>Escontria chiotilla</i> .....	33
<b>Figura 3.</b> Semilla de <i>E. chiotilla</i> .....	33
<b>Figura 4.</b> Micrositio de estudio, Trinidad de Huaxtepec, Valle de Tehuacán-Cuicatlán .....	37
<b>Figura 5.</b> Capacidad de germinación de las semillas de <i>E. chiotilla</i> de las cosechas 2008 y 2018 (almacenadas <i>ex situ</i> durante 10 y 0 años, respectivamente) .....	49
<b>Figura 6.</b> Capacidad de germinación de <i>E. chiotilla</i> almacenadas <i>ex situ</i> a los 0, 6, 12 y 18 meses .....	49
<b>Figura 7.</b> Capacidad de germinación de las semillas de <i>E. chiotilla</i> de las cosechas 2008 y 2018 (almacenadas <i>ex situ</i> durante 10 y 0 años, respectivamente) (análisis estadístico de U-Mann-Whitney; NCSS v.2020) .....	50
<b>Figura 8.</b> Capacidad de germinación de las semillas de <i>E. chiotilla</i> de las cosechas 2008 y 2018 almacenadas <i>in situ</i> durante 0, 6, 12 y 18 meses .....	52
<b>Figura 9.</b> Capacidad de germinación de las semillas de <i>E. chiotilla</i> de las cosechas 2008 y 2018 (almacenadas <i>ex situ</i> durante 10 y 0 años, respectivamente; comparación de medias de t-Student; NCSS v.2020) .....	53
<b>Figura 10.</b> Relación de la precipitación pluvial y la temperatura mensual en el año 2008 de la estación meteorológica Tonahuixtla (CONAGUA) .....	57

<b>Figura 11.</b> Relación de la precipitación pluvial y temperatura mensual en los años 2018 y 2019 de la estación meteorológica Tonahuixtla (CONAGUA).....	58
<b>Figura 12.</b> Contenido de proteínas totales en semillas de <i>E. chiotilla</i> de las cosechas 2008 y 2018 (almacenadas <i>ex situ</i> durante 10 y 0 años, respectivamente) almacenadas <i>in situ</i> durante 0, 6, 12 y 18 meses .....	60
<b>Figura 13.</b> Correlación entre los promedios de la capacidad de germinación (n=3) y los promedios de la concentración de proteínas totales (n=2) de las semillas de <i>E. chiotilla</i> del año de cosecha 2008 almacenadas <i>in situ</i> durante 0, 6, 12 y 18 meses .....	62
<b>Figura 14.</b> Correlación entre los promedios de la capacidad de germinación (n=3) y los promedios de la concentración de proteínas totales (n=2) de las semillas de <i>E. chiotilla</i> del año de cosecha 2018 almacenadas <i>in situ</i> durante 0, 6, 12 y 18 meses .....	63
<b>Figura 15.</b> Correlación entre los promedios de la capacidad de germinación (n=3) y los promedios de la concentración de proteínas totales (n=2) de las semillas de <i>E. chiotilla</i> de los años de cosecha 2008 y 2018 almacenadas <i>in situ</i> .....	64
<b>Figura 16.</b> Alineamientos nucleotídicos de genes LEA de cuatro especies de cactáceas, <i>Opuntia streptacantha</i> , <i>Leuchtenbergia principis</i> , <i>Mammillaria bombycina</i> , <i>Opuntia ficus-indica</i> .....	67
<b>Figura 17.</b> Árbol filogenético generado por el programa CLUSTAL Omega (CLUSTER Aligning W) mediante el programa bioinformático BLAST de cuatro especies de cactáceas ( <i>Opuntia streptacantha</i> , <i>Leuchtenbergia principis</i> , <i>Mammillaria bombycina</i> , <i>Opuntia ficus-indica</i> ) .....	68

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae es originaria del Continente Americano y presenta su máxima diversidad en México con alrededor de 670 especies, de las cuales 80% son endémicas del país (Miguel-Talonia *et al.*, 2014). Debido a que la riqueza de cactáceas no se distribuye homogéneamente, existen áreas que presentan una notable diversidad, tal es el caso del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (VTC), considerado como una de las principales zonas semiáridas, no sólo de México sino de Norteamérica; el cual alberga 28 géneros con 86 especies de cactáceas, y es considerado centro de evolución de la flora semiárida con alrededor del 11 % de especies endémicas, incluyendo numerosas cactáceas (Arias Toledo *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2012; Miguel-Talonia *et al.*, 2014).

Las zonas áridas y semiáridas presentan condiciones ambientales que pueden ser estresantes para las plantas (Godínez-Álvarez, 2017). Por lo anterior, las semillas de las plantas que habitan en estos ecosistemas presentan adaptaciones que les permiten mantenerse viables bajo dichas condiciones para promover el establecimiento exitoso de una nueva plántula a partir de la germinación oportuna. Estas características adaptativas se transmiten, genéticamente, a nuevas generaciones de bancos de semillas, los cuales son conjuntos de semillas maduras viables, enterradas en el suelo durante periodos variables en un hábitat determinado, y son la vía principal por la cual se regeneran las comunidades de especies vegetales que difícilmente se reproducen vegetativamente en su hábitat (Bowers, 2000; McCarty, 2001; Rojas-Aréchiga y Batis, 2001; Hernández, 2006; Montenegro *et al.*, 2006;

Sánchez *et al.*, 2015; Sánchez-Salas *et al.*, 2015; Villanueva *et al.*, 2016; Hernández Camacho *et al.*, 2017).

En cactáceas, la pérdida de viabilidad de las semillas varía entre especies (Rojas-Aréchiga y Batis, 2001). En el caso de *Escontria chiotilla* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) Rose, que se ha estudiado en el grupo de trabajo, se observó que la viabilidad es alta cuando las semillas son almacenadas en condiciones *ex situ* hasta por 10 años. Por el contrario, almacenadas *in situ*, la viabilidad de semillas disminuye a partir de los 15 meses y se pierde en su totalidad a los dos años, formando bancos de semillas de tipo persistente a corto plazo (Guzmán-Hernández, 2018).

Las investigaciones indican que la sobrevivencia de las semillas bajo condiciones de aridez es el resultado de una serie de procesos celulares y moleculares durante su desarrollo; la maduración del embrión en una fase tardía involucra procesos relacionados con la adquisición de la tolerancia a la desecación o deshidratación, el cual es un proceso natural que presentan estas semillas y es independiente de las condiciones de aridez (Leprince *et al.*, 2017); todos estos eventos contribuyen a la preparación de la semilla para la germinación.

La acumulación y función de moléculas protectoras, como azúcares no reductores y proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA, por las siglas en inglés; Late Embryogenesis Abundant), otorgan protección contra la deshidratación (Matilla, 2008; Berjak y Pammenter, 2010; Chatelain *et al.*, 2012).

Las proteínas LEA ayudan a proteger a otras proteínas contra el estrés, pero su mecanismo preciso de acción aún no es bien conocido (Silva Ortega, 2008; Hernández-Camacho, 2016). Aunque son pocos los estudios realizados en cactáceas sobre la participación de las proteínas en el mantenimiento de la viabilidad de semillas, se ha reportado la participación de diferentes genes LEA en varias especies de cactáceas en la respuesta al estrés (Silva Ortega, 2008; Ochoa Alfaro, 2011; Hernández Camacho, 2016).

Debido a la poca información sobre la viabilidad de semillas de cactáceas y la participación de genes que codifican proteínas involucradas en respuesta al estrés bajo diferentes condiciones de almacenamiento, resulta interesante analizar las proteínas LEA en semillas de *E. chiotilla* almacenadas *in situ* y *ex situ*, y establecer una posible correlación con la viabilidad y longevidad, contribuyendo al estudio de los bancos de semillas para aquellas especies que difícilmente pueden reproducirse vegetativamente. Considerando lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue estudiar la participación de las proteínas LEA y otras biomoléculas en la viabilidad y longevidad de las semillas de *E. chiotilla*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Familia Cactaceae en México

La Familia Cactaceae es originaria del continente americano, se distribuye desde Canadá, a una latitud de 56°N, hasta el estrecho de Magallanes en América del Sur (Bravo-Hollis, 1978). México presenta la mayor diversidad de cactáceas con ca. 670 especies, de las cuales el 80% son endémicas del país (Miguel-Talonia *et al.*, 2014).

La morfología distintiva de los cactus se considera evidencia de su naturaleza única y especializada (reducción o pérdida de las hojas, tallos fotosintéticos, transformación de la corteza y la médula en tejido suculento de almacenamiento de agua), lo que resulta en una historia evolutiva larga y aislada. Es probable que la diversificación evolutiva de la familia diera lugar a las formas de crecimiento del tipo ramificado y arborescente-columnar hasta formas solitarias de crecimiento pequeño y no ramificadas (Nyffeler y Eggli, 2010).

La Familia Cactaceae se ubica en el orden Caryophyllales, considerado como un grupo monofilético. Algunas sinapomorfías que presenta el orden son: tallos que, a menudo, tienen anillos concéntricos de xilema y floema o de haces vasculares (los tubos de floema presentan plastidios con anillo periférico de filamentos proteicos y, a menudo, un cristal de proteína central); betalainas que forman pigmentos de rojo a amarillo; un solo verticilo de tépalos; placentación central libre a basal; embrión curvado y la presencia de perispermo, con endospermo escaso o ausente (Judd *et al.*, 1999). La monofilia de este grupo está fuertemente soportada por la presencia de secuencias de

los genes *rbcL* (gen de cadena larga ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa), *atpB* (codifica la subunidad beta de la ATP sintasa) y 18S rADN (secuencia nuclear ribosomal del ADN) (Cuénoud *et al.*, 2002). El orden incluye 15 familias y 8,600 especies; las familias principales incluyen a Caryophyllaceae, Phytolaccaceae, Petiveriaceae, Nyctaginaceae, Amaranthaceae (que incluye a la familia Chenopodiaceae), Cactaceae y Portulacaceae (Judd *et al.*, 1999). Oliveira Marinho y colaboradores (2019) indican que el orden Caryophyllales es uno de los principales linajes de angiospermas, con ca. 12,500 especies e incluye principalmente plantas suculentas, halófitas, gipsófilas y carnívoras (pocas familias), con adaptaciones a hábitats extremos, distribuidas principalmente en América, África y Australia.

Antes de la aparición de los estudios moleculares basados en el ADN, el orden Caryophyllales *sensu stricto* comprendía 12 familias: Phytolaccaceae, Achatocarpaceae, Nyctaginaceae, Aizoaceae, Didiereaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Portulacaceae, Basellaceae, Molluginaceae y Caryophyllaceae (Brockington *et al.*, 2009).

Con base en estudios moleculares, Oliveira Marinho y colaboradores (2019) identificaron un clado bien soportado dentro del orden Caryophyllales, el suborden Cactineae (Portulacineae), que incluye una diversidad de especies asociadas con hábitats xéricos, tejidos suculentos y metabolismo CAM; a su vez, dentro del suborden Cactineae, existe un clado llamado ACPT (Anacampserotaceae, Cactaceae, Portulacaceae y Talinaceae). Para analizar la evolución del cariotipo en familias del suborden Cactineae, se han empleado modelos probabilísticos de reconstrucción de

números cromosómicos ancestrales con los cuales consideran a la familia Talinaceae como grupo basal, y al analizar con estudios previos, se señalan a las familias Anacampserotaceae y a Portulacaceae como grupos hermanos de la familia Cactaceae.

México es el país con mayor concentración de cactáceas distribuidas particularmente en zonas áridas y semiáridas. Las especies de esta familia han podido establecerse en otros tipos de vegetación como matorral de duna costera (Torres *et al.*, 2010), bosque tropical caducifolio y bosque templado (Miguel-Talonia *et al.*, 2014). Estas plantas tienen un valor ecológico, cultural, social y económico, pero existe un decremento de sus poblaciones debido al comercio y recolección ilegal, sumando a estos factores el cambio de uso de suelo y la industrialización. Se han cultivado más de 40 especies de cactáceas y domesticado alrededor de 20, de las cuales 17, son columnares (Luna Morales, 2006). La necesidad de implementar acciones para preservar o incrementar la tasa de producción de las cactáceas por medio de propagación por semillas, esquejes, brotes y vástagos que son considerados métodos tradicionales y de bajo costo, ha surgido como consecuencia de la extracción desmedida de cactáceas de su hábitat natural (Villanueva *et al.*, 2016).

Las precipitaciones de las zonas áridas (< 250 mm) y semiáridas (< 500 mm) fluctúan ampliamente (González Medrano, 2012). Las semillas de las plantas presentes en estos ambientes emplean diversas estrategias como son: diferentes tamaños para germinar de acuerdo con los periodos de humedad, presencia de estructuras que facilitarán su dispersión, así como la producción de semillas que respondan

positivamente a los periodos intermitentes de humedad, o la presencia de latencia con la finalidad de disminuir la actividad metabólica de la semilla (Sánchez *et al.*, 2015). Por lo cual, la persistencia de las semillas dependerá de la latencia y la germinación en periodos y microambientes favorables.

En general, todas las semillas, así como las de la Familia Cactaceae, presentan características morfológicas variables como: forma, tamaño y color de la cubierta seminal; estas características pueden variar entre especies (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Características de semillas de algunas especies de la familia Cactaceae (Arias *et al.*, 2012).

ESPECIE	FORMA	TAMAÑO (cm)	CUBIERTA SEMINAL
<i>Ferocactus flavovirens</i> (Scheidw.) Britton. & Rose	Ampliamente ovadas	1.0 – 1.3 mm largo, 0.8 – 1.0 mm ancho	Negra a pardo-oscura, brillante, sin microrrelieve
<i>Ferocactus macrodiscus</i> (Mart.) Britton & Rose	Ampliamente ovadas	1.7 – 2.0 mm largo, 1.4 – 1.6 mm ancho	Lisa sin microrrelieve
* <i>Pachycereus grandis</i> Rose.	Ovadas a ampliamente ovadas	3.8 – 6.1 mm largo, 2.4 – 3.6 mm ancho	Negra o pardo negra, brillante, sin microrrelieve
<i>Mammillaria albinata</i> Backeb.	Orbiculares, ovadas o ampliamente ovadas	1.0 – 1.2 mm largo, ca. 1.0 mm ancho	Pardo clara, microrrelieve estriado
<i>Mammillaria carnea</i> Zucc. ex Pfeiff.	Orbiculares, ovadas o ampliamente ovadas	0.6 – 0.8 mm largo, ca. 0.5 mm ancho	Pardo clara, microrrelieve reticulado
* <i>Opuntia streptacantha</i> Lem.	Discoides a esferoidales	3.8 – 4.5 mm largo, ca. 2.6 mm ancho	Dura y blanquecina

* <i>Echinocereus pulchellus</i> (Mart.) F.Seitz	Ampliamente ovadas	ca. 1.5 mm largo, ca. 1.2 mm ancho	Negra o pardo- oscura, opaca, con microrrelieve marcado
<i>Escontria chiotilla</i> (F.A.C.Weber ex K.Schum.) Rose	Ampliamente ovadas a orbiculares	1.7 – 2 mm largo, 0.9 – 1.3 mm ancho	Negra, opaca con microrrelieve

\*Las características de la forma y la cubierta seminal son descritas a nivel de Género

## 2.2. Importancia de los bancos de semillas

Ecológica y evolutivamente, los bancos de semillas son relevantes en la dinámica poblacional de las especies vegetales y son una estrategia para su conservación por ser los encargados de la regeneración natural en los ecosistemas, especialmente para las especies que difícilmente se reproducen vegetativamente. Estos se encuentran constituidos básicamente por semillas provenientes de plantas anuales o efímeras, conformando el 95% del número total de semillas (Rojas-Aréchiga y Batis, 2001; Montenegro *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2015). Las semillas presentes en el suelo constituyen los bancos de semillas naturales cuya persistencia dependerá de las condiciones del suelo, en el cual se presenta un flujo continuo de aporte y pérdida de semillas, ya sea por dispersión o bien por depredación. Por otro lado, también existen bancos de semillas artificiales, que se encuentran en instituciones, laboratorios o centros de investigación que se encargan de la conservación *ex situ* de las semillas, con importancia a nivel mundial para evitar la extinción (Sánchez *et al.*, 2015).

Se han propuesto clasificaciones para los bancos de semillas considerando características como la viabilidad y la longevidad, que dan la persistencia a los mismos. De esta manera, los bancos de semillas se clasifican en: *i)* transitorios, cuando las

semillas presentan viabilidad menor a un año y un sólo evento de germinación; y *ii*) persistentes, cuando las semillas permanecen viables por varios años y con varios eventos de germinación. Ecológicamente, los bancos de semillas persistentes son considerados los de mayor impacto en ecosistemas donde se presentan condiciones ambientales limitantes como la precipitación impredecible o errática (Thompson y Grime, 1979; Thompson *et al.*, 1997; Baskin y Baskin, 1998; Montenegro *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2015).

Existe una gran variedad de plantas formadoras de bancos de semillas del tipo: *i*) transitorio, como *Circaea lutetiana* L., *Bromus sterilis* L., *Festuca ovina* L. y *Triticum aestivum* L., y *ii*) persistente, como son *Lythrum salicaria* L., *Rumex hydrolapathum* Huds., *Poa annua* L. y *Chenopodium album* L. (Hendry *et al.*, 1994). Algunos ejemplos de especies formadoras de bancos de semillas de la familia Cactaceae son: *Opuntia rastrera* F.A.C.Weber, *Coryphantha gladiospina* (Boed.) A.Berger, *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto, *Ferocactus wislizeni* (Engelm.) Britton & Rose, *Stenocereus griseus* (Haw.) Buxb. y *S. stellatus* (Pfeiff.) Riccob. (Rojas-Aréchiga y Batis, 2001).

### 2.3. Desarrollo de la semilla y periodo de embriogénesis tardía

Las semillas son el medio de propagación sexual de las plantas, las cuales tienen la función de perpetuar la especie (Suárez y Melgarejo, 2010). La semilla se forma mediante una embriogénesis cigótica que comprende los cambios morfológicos, estructurales y de expresión génica que tienen lugar desde la formación del cigoto y el

desarrollo del endospermo, hasta el final del desarrollo y maduración del embrión (Matilla, 2008). La semilla es el resultado de la fecundación del óvulo y está protegida por cubiertas seminales de origen materno. Las cubiertas seminales están conformadas por el tegmen y la testa, los cuales se originan a partir del tegumento interno y externo del rudimento seminal, respectivamente (Megías *et al.*, 2018).

La semilla consta de tres componentes principales: el cigoto diploide ( $2n$ ), formado por la fecundación de la ovocélula ( $n$ ) con un núcleo espermático, transportado a través del tubo polínico que se transforma en un embrión que dará lugar posteriormente a la plántula (Díaz Pontones y Corona Carrillo, 2018); el endospermo ( $3n$ ), que proporciona nutrientes al embrión para el desarrollo y el crecimiento de la plántula; y la cubierta seminal, que rodea al embrión y al endospermo y que se forma por los integumentos que representan los tejidos maternos de la ovocélula (Ohto *et al.*, 2007; Suárez y Melgarejo, 2010). Durante la embriogénesis, se sintetizan proteínas, lípidos y carbohidratos en diferentes periodos y en diversos órganos de la semilla, como en cotiledones y en el endospermo (Matilla, 2008). Las sustancias de reserva, como almidón y lípidos, son transformadas enzimáticamente para formar compuestos solubles que son movilizados al embrión y propiciar el crecimiento de la plántula (Rangel-Fajardo *et al.*, 2014)

Se han identificado diferentes fases en el proceso del desarrollo de la semilla (Ohto *et al.* 2007; Segura, 2008; Flores, 2010; Bareke, 2018). Matilla (2008) divide el desarrollo de la semilla en tres fases: i) periodo embriogénico temprano o inicial o histodiferenciación (alta tasa de divisiones nucleares y la formación de paredes

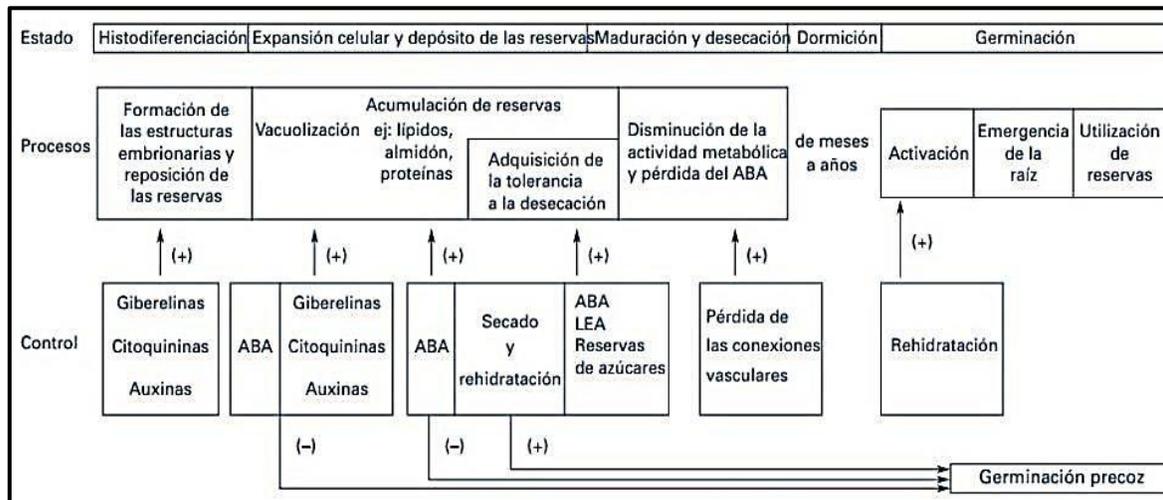
celulares), ii) periodo embriogénico medio o expansión celular (síntesis elevada de auxinas y acumulación de sustancias de reserva) y iii) periodo embriogénico tardío, caracterizados por la maduración y desecación de la semilla en presencia de ácido abscísico (ABA), así como la adquisición de la tolerancia a la desecación (Figura 1).

La embriogénesis, además de ser el periodo en el que se forma la semilla, constituye la fase de preparación para la germinación, y donde el metabolismo de los ácidos nucleicos y la expresión génica son muy intensos. La síntesis y degradación del ARN durante la embriogénesis da lugar a la producción de nucleótidos y ribosa, para integrarse en las rutas metabólicas celulares. Existe un incremento notable en los niveles de mRNA y tARN durante el desarrollo de la semilla y, sobre todo, durante la fase de expansión celular en la que la síntesis de proteínas es muy alta, especialmente las de reserva (Matilla, 2008).

Se calcula que hay alrededor de 4000 genes implicados en el desarrollo de la semilla, pero es escaso el conocimiento sobre la regulación de la expresión génica durante los primeros momentos de la embriogénesis (Matilla, 2008). A partir de estudios realizados en diversas angiospermas, los genes expresados durante la embriogénesis se han agrupado en: i) constitutivamente expresados, presentes en todos los estadios embriogénicos; ii) abundantemente expresados en la fase temprana; iii) genes relacionados, en su mayoría, con las proteínas de reserva durante la fase de expansión de los cotiledones (periodo medio); iv) genes expresados durante la embriogénesis tardía almacenados durante la maduración y desecación de la semilla, en su mayoría son genes relacionados con las proteínas LEA (proteínas abundantes en la

embriogénesis tardía (LEA, por las siglas en inglés; Late Embryogenesis Abundant) (Matilla, 2008).

El periodo de embriogénesis tardía, o también llamado periodo embriogénico tardío, se relaciona con la fase de la maduración de la semilla en la que tiene lugar la estimulación de la expresión de un inhibidor de una quinasa dependiente de la ciclina que provoca que se detenga el ciclo celular. Este periodo inicia con la fase de expansión con la generación y crecimiento del embrión torpedo, para finalizar con el embrión en fase cotiledonar, rico en sustancias de reserva en la fase de maduración (Díaz Pontones y Corona Carrillo, 2018). Durante este periodo, también existen niveles elevados de ABA-libre, descenso en el peso fresco de la semilla debido a la pérdida de agua y adquisición de la tolerancia a la desecación (Matilla, 2008; Figura 1).



**Figura 1.** Procesos fisiológicos y metabólicos durante el desarrollo y germinación de semillas ortodoxas (Tomado de Matilla, 2008).

## 2.4. Viabilidad y Longevidad

La viabilidad es la capacidad de la semilla para poder germinar en condiciones favorables; su pérdida es la etapa final del deterioro de la semilla (Flores, 2010; González, 2013; Muñoz Sánchez, 2015); por lo tanto, el envejecimiento de la semilla produce una declinación gradual de sus capacidades como la tasa de germinación que culmina con la muerte (Flores, 2010).

El tiempo durante el cual las semillas permanecen viables se denomina longevidad (Vázquez Yanes *et al.*, 1997). La longevidad de las semillas puede relacionarse con la plasticidad fenotípica mediada por la planta madre (Mondoni *et al.*, 2014; Zinsmeister *et al.*, 2020), así como el efecto de factores ambientales como la luz, la temperatura, la sequía y la salinidad; la temperatura y la disponibilidad de agua parecen ser los factores ambientales dominantes, dependiendo de la especie. En semillas de *Arabidopsis*, durante la maduración y la longevidad, el gen DOG1 (por sus siglas en inglés) relacionado con el retraso de la germinación, funciona como sensor de temperatura que modula la latencia de las semillas (Zinsmeister *et al.*, 2020).

La longevidad de las semillas almacenadas dependerá de factores como el contenido de humedad, la viabilidad inicial de las semillas, la temperatura y humedad relativa durante el tiempo de almacenamiento (Kugbei, 2019), así como de factores fisiológicos y moleculares. Durante el almacenamiento, la variación de la composición lipídica de las semillas puede ser un indicador del envejecimiento debido a que los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles que los monoinsaturados a la peroxidación (Castellión, 2008).

## 2.5. Conservación *in situ* y *ex situ*

La conservación de las especies no sólo se refiere a su protección, sino también a la preservación de éstas a todos los niveles, desde los ecosistemas hasta el acervo genético y las interrelaciones entre dichos niveles (Franco-Martínez, 1995).

Se han establecido diversas estrategias de conservación agrupadas en dos categorías: *in situ* y *ex situ*. Ambas categorías son complementarias y permiten garantizar la conservación del patrimonio genético de las especies y sus poblaciones, en el mediano y largo plazo (Pezoa, 2001).

El objetivo de la conservación *in situ* es la preservación de las especies biológicas en su hábitat y área de distribución natural, entre estas, podemos mencionar para México las Áreas Naturales Protegidas como La Reserva de la Biósfera El Vizcaíno en Baja California Sur, la Reserva de la Biósfera El Cielo en Tamaulipas y el Valle de Tehuacán-Cuicatlán en los Estados de Puebla y Oaxaca (Franco-Martínez, 1995).

Es importante resaltar que el almacenamiento *ex situ* se refiere a la concentración de las semillas bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y luz para mantener su viabilidad durante largos periodos (Kugbei, 2019). La conservación *ex situ* implementa estrategias de conservación fuera del hábitat y áreas de distribución natural de muestras representativas de la biodiversidad vegetal en espacios o volúmenes reducidos, como los bancos de germoplasma y bancos de semillas presentes en Jardines Botánicos y Viveros (Franco-Martínez, 1995). La manipulación

de las semillas en el almacenamiento a largo plazo pretende mantener elevada la viabilidad (Kugbei, 2019).

## 2.6. Semillas ortodoxas

Las semillas difieren en su tolerancia a la desecación que sigue tras su diseminación. Según este parámetro, las semillas pueden clasificarse en i) recalcitrantes, toleran una deshidratación entre 15 y 50% en su contenido de humedad, ii) intermedias, toleran una deshidratación entre 10 y 12.5% en su contenido de humedad y iii) ortodoxas (toleran una deshidratación de hasta 5% de en su contenido de humedad que les permite ser almacenadas durante periodos muy prolongados, dando lugar a la conservación *ex situ*; un ejemplo de semillas ortodoxas es la Familia Cactaceae (Magnitskiy y Plaza, 2007; González-Arno y Engelmann, 2013).

La principal característica fisiológica de las semillas ortodoxas es su gran tolerancia a la deshidratación la cual es adquirida durante el desarrollo de la semilla que les permite asegurar la supervivencia; la viabilidad depende del contenido de humedad de cada semilla y de la temperatura durante su almacenamiento (Vázquez-Yanes y Toledo, 1989; Magnitskiy y Plaza, 2007; Berjak y Pammenter, 2010). Durante la adquisición de la tolerancia a la desecación, las células embrionarias presentan cambios estructurales, moleculares y bioquímicos, como la movilización de cuerpos lipídicos a la periferia de la pared celular, presencia de proteínas LEA, conformación del ADN y presencia de sistemas antioxidantes (Rangel-Fajardo *et al.*, 2014).

En almacenamiento, la longevidad de las semillas aumenta con la reducción del contenido de agua. Las semillas ortodoxas se subdividen en: i) ortodoxas verdaderas, que pueden ser almacenadas por largos periodos de tiempo, con niveles de humedad del 5 a 10 %; y ii) subortodoxas, que pueden ser almacenadas bajo las mismas condiciones que las ortodoxas verdaderas, pero por periodos de tiempo más cortos, debido al alto contenido de lípidos o testas delgadas (Flores, 2010).

Desde un punto de vista ecológico, las semillas ortodoxas son características de aquellas especies para las que en el medio natural es importante la persistencia de las semillas en el tiempo como factor de sobrevivencia. Las semillas ortodoxas predominan entre las especies de plantas anuales y en regiones con estación seca marcada, como es el caso de las cactáceas (Vázquez-Yanes y Toledo, 1989).

En semillas deshidratadas, las reacciones enzimáticas no son determinantes durante el envejecimiento debido a que el metabolismo enzimático requiere de altos contenidos de agua, esto dependerá del tipo de almacenamiento. La presencia de algunas reacciones espontáneas no-enzimáticas en condiciones de bajos contenidos de agua, como las reacciones de Maillard las cuales ocurren mediante glucosilación no-enzimática con azúcares, o reacciones con aldehídos producto de la lipoperoxidación (estrés oxidante alterando la composición lipídica) mediada por radicales libres. Las reacciones de Maillard pueden contribuir al envejecimiento de la semilla mediante la alteración química de proteínas funcionales, debido a que reduce la capacidad del sistema metabólico de limitar el daño mediado por radicales libres y de reparar el daño durante la etapa de germinación (Castellón, 2008).

Durante el proceso de imbibición-germinación la tolerancia a la desecación se pierde y se produce deterioros a nivel celular (Rangel-Fajardo *et al.*, 2014). Aunque se ha señalado la participación de las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) en semillas, particularmente en el deterioro de las membranas debido a la disminución de la fluidez de los lípidos que las conforman, la presencia de lipoxigenasas puede contribuir a modificar la composición de las membranas celulares y se sugiere que las semillas almacenadas pasan por diversos eventos de lipoperoxidación (McDonald, 1999), las EROs en bajas concentraciones desempeñan un papel importante en la señalización celular asociada con la germinación y la latencia (Hendry, 1993; Bailly y Kranner, 2011). Los daños producidos por EROs pueden ser revertidos durante el metabolismo pre-germinativo donde existe reparación y síntesis *de novo* de ácidos nucleicos y proteínas (Castellión, 2008). Los aminoácidos reactivos más susceptibles al daño oxidante son la cisteína, histidina, triptófano, metionina y fenilalanina (McDonald, 1999).

## 2.7. Proteínas en semillas

Las proteínas están compuestas por aminoácidos, formados de C, H, O y N. Las proteínas en la célula vegetal pueden clasificarse de acuerdo con su función: i) enzimas, las cuales aceleran las reacciones bioquímicas; ii) proteínas estructurales, que forman parte estructural de la célula; iii) proteínas de reserva, que almacenan aminoácidos y nitrógeno asimilable; iv) proteínas de transporte, las cuales trasladan

sustancias a través de las membranas; y v) proteínas de reconocimiento, que reconocen señales del ambiente intercelular o extracelular (Grajales Muñiz, 2005).

Miernyk y Hajduch (2011) identificaron, mediante análisis proteómicos, alrededor de 1496 proteínas en semillas de cebada (*Hordeum vulgare* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), maíz (*Zea mays* L.) y arroz (*Oryza sativa* L.), y las dividieron en 10 clases funcionales: metabolismo central, estructuras celulares, respuesta al estrés, metabolismo de ácidos nucleicos, síntesis de proteínas, plegado de proteínas, focalización de proteínas, hormonas y señalización, transporte de membrana y proteínas de función desconocida (modificado de Bevan *et al.*, 1998).

#### 2.7.1. Proteínas de almacenamiento de semillas

Las proteínas de almacenamiento de semillas (Seed Storage Proteins, SSP, por sus siglas en inglés) se acumulan en grandes cantidades, principalmente como reserva de nitrógeno, carbón y azufre, para el desarrollo de la semilla (Krishnan y Coe, 2001; Radhika y Hari Rao, 2014). Estas proteínas pueden hidrolizarse para liberar aminoácidos constituyentes. La semilla utiliza estos aminoácidos como fuente de nitrógeno reducido, lo cual es esencial para la germinación y el crecimiento temprano de las plántulas (Radhika y Hari Rao, 2014). Las proteínas de almacenamiento de semillas se sintetizan durante la maduración de la semilla y se acumulan en el endospermo de las monocotiledóneas o en los cotiledones y embriones de dicotiledóneas (Wakasa y Takaiwa, 2013).

Las SSP se clasifican fundamentalmente en: albúmina soluble en agua, globulina soluble en sal, prolamina soluble en alcohol y soluble en ácido como glutelinas, de acuerdo con las propiedades físicas basadas en la solubilidad (Krishnan y Coe, 2001).

#### 2.7.2. Proteínas y otras biomoléculas relacionadas con la tolerancia a la desecación y viabilidad

La viabilidad de las semillas es una característica que varía entre especies debido a que algunas conservan su viabilidad durante décadas, mientras que otras la pierden a los pocos días (Roberts *et al.*, 1973). Las semillas que permanecen almacenadas por largos periodos de tiempo presentan cambios en los sistemas intracelulares y en las macromoléculas, como el daño proteico severo causado por el estrés oxidante. Es posible que dichos cambios se deban a las condiciones de almacenamiento como la temperatura y el contenido de humedad que son factores clave del deterioro de la semilla, la reducción y la pérdida de la viabilidad (Ogé *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2015).

Algunos procesos que pueden otorgar protección contra la deshidratación son la reducción del grado de vacuolización, cantidad y naturaleza de reservas insolubles acumuladas, integridad del citoesqueleto, conformación del ADN, desdiferenciación intracelular, reducción del metabolismo, presencia y operación eficiente de sistemas antioxidantes, acumulación y función de las moléculas protectoras, despliegue de ciertas moléculas anfipáticas, capa de oleosina alrededor de cuerpos lipídicos, y la

presencia y operación de mecanismos de reparación durante la rehidratación (Berjak y Pammenter, 2010).

En semillas ortodoxas, la tolerancia a la desecación está relacionada con la presencia de proteínas LEA, proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés Heat Shock Protein) y las proteínas de almacenamiento. Los azúcares, especialmente los disacáridos, oligosacáridos y sacarosa; las proteínas de choque térmico y las proteínas LEA son sintetizados antes de que se inicie la desecación de la semilla y desempeñan un papel importante en la tolerancia a la desecación (Matilla, 2008; Boudet *et al.*, 2006; Chatelain *et al.*, 2012). En el caso de las semillas ortodoxas, la acumulación de azúcares no reductores, particularmente de la serie rafinosa, y con sistemas que secuestran radicales libres, participan en la “hipótesis de reemplazo del agua” y en el proceso de vitrificación, también llamada formación del estado vítreo (Matilla, 2008; Berjak y Pammenter, 2010).

La acumulación de azúcares no reductores se ha correlacionado con la tolerancia a la desecación de las semillas. La sacarosa participa en mecanismos que ayudan a soportar la sequía en las semillas; por ejemplo, se ha sugerido la importancia de la biosíntesis de la rafinosa a bajas concentraciones de agua para prevenir la cristalización de la sacarosa o para estabilizar membranas secas. Por otra parte, la trehalosa participa como protector de membranas contra los efectos adversos de la deshidratación. Así como los azúcares, las oleosinas ayudan al almacenamiento de triacilglicérolas que sirven como fuente alimenticia durante la germinación y el

crecimiento post-germinativo. Las oleosinas son proteínas que rodean a las gotas de lípidos en las células vegetales (Méndez Ferreira *et al.*, 2013).

Mientras que las proteínas de choque térmico (HSP) son un grupo numeroso y diverso, y tienen la capacidad de proteger o reparar los componentes celulares ya que interactúan con otras proteínas y funcionan como chaperonas; son proteínas importantes durante el periodo de deshidratación de la semilla, así como en condiciones de estrés por calor, frío, salinidad y estrés oxidante (Wu *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2016). Se ha reportado que estas proteínas se expresan durante ciertas etapas del desarrollo y germinación de la semilla, sugiriendo su participación en la movilización de las reservas asociadas a las proteínas de almacenamiento (Kaur *et al.*, 2016). Por tal razón, es posible que estén relacionadas con la viabilidad de las semillas durante su maduración y almacenamiento (Wu *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2016).

El daño oxidante inducido por la desecación puede ser originado por la formación y acumulación de EROs, para contender con estas especies reactivas, las células cuentan con mecanismos antioxidantes enzimáticos (ascorbato peroxidasa, guaiacol peroxidasa, catalasa, dihidroascorbato reductasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa) y mecanismos no enzimáticos (ácido ascórbico, glutatión, retinol y tocoferoles). Estudios de Kranner y Birtic (2005) indican que durante la desecación a largo plazo o el envejecimiento en el estado seco prevalecen procesos oxidantes, las moléculas antioxidantes se rompen y, a nivel celular, esto sirve como señalización al organismo para eliminar las células dañadas, pero si este proceso ocurre repetidamente, todo el organismo pierde viabilidad (Méndez Ferreira *et al.*, 2013).

Las proteínas de reserva sirven en algunos casos como protectores celulares durante la fase de desecación de la semilla y han sido muy estudiadas en dicotiledóneas; en semillas de angiospermas, las sustancias de reserva se acumulan en cuerpos proteicos, cuerpos lipídicos y amiloplastos (Boudet, *et al.*, 2006; Matilla, 2008).

Las proteínas desempeñan un papel importante para el mantenimiento de la viabilidad y longevidad de las semillas. Un análisis proteómico reveló que la pérdida de viabilidad en *Arabidopsis* está relacionada con los cambios de proteínas en semillas deshidratadas (el deterioro de las semillas conlleva un aumento masivo de proteínas carboniladas) y la incapacidad de las semillas con baja viabilidad para sintetizar proteínas durante la germinación (Wu *et al.*, 2011). Se ha reportado que la enzima L-isoaspartil metiltransferasa (PIMT) reduce el daño proteico provocado por la acumulación de residuos de isoaspartil (isoAsp). La actividad de PIMT contribuye al mantenimiento de la viabilidad de las semillas ya que limitan la acumulación de residuos perjudiciales de isoAsp en las proteínas (Ogé *et al.*, 2008). La actividad de esta enzima es más alta en las semillas, donde se cree que el daño proteico no enzimático es frecuente durante la deshidratación en la fase de maduración y durante el almacenamiento en seco (Wei *et al.*, 2015).

La L-isoaspartil metiltransferasa 1 está involucrada tanto en la longevidad de las semillas como en el vigor de la germinación en *Arabidopsis*, y la baja acumulación de esta proteína se relaciona con la pérdida de la viabilidad de las semillas. Por otro lado, en arroz, la enzima aldehído deshidrogenasa 7 (OsALDH7) es importante en el mantenimiento de la viabilidad de la semilla al desintoxicar los aldehídos generados

por la lipoperoxidación durante el almacenamiento de la semilla; la insaturación de ácidos grasos y la acumulación de malondialdehído son indicadores de la lipoperoxidación (Shin *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2014).

Por otra parte, Sathish y colaboradores (2015) identificaron cambios en el proteoma de semillas del frijol negro (*Vigna mungo* (L.) Hepper) como la regulación del factor de elongación termoestable (Ef-Tu) que participa en la traducción de proteínas relacionadas con la pérdida de la viabilidad durante el envejecimiento.

El análisis proteómico de semillas de lupino (*Lupinus albus* L.) mostró que la mayoría de las proteínas de reserva son conglutinas, un grupo de proteínas de reserva que se degradan al inicio de la germinación. La capacidad de almacenamiento de las semillas puede verse afectada por dichas proteínas y son sometidas a proteólisis al inicio de la germinación de la semilla (Dobiesz y Piotrowicz- Cieslak, 2017).

El ácido abscísico (ABA) es una importante fitohormona que participa en múltiples procesos fisiológicos (Jordán y Casaretto, 2006). Durante el periodo de embriogénesis tardía, existen niveles elevados de ABA-libre; el ABA es el responsable de la tolerancia a la desecación por su implicación en la síntesis de proteínas LEA y otras proteínas relacionadas con el estrés (Matilla, 2008).

En 1981, Leon Dure III identificó por primera vez las proteínas LEA en la etapa tardía de la embriogénesis de semillas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) (Battaglia *et al.*, 2008; Mercado Díaz, 2018). Las proteínas LEA son un grupo de proteínas altamente hidrofílico y, en su mayoría, se acumulan en altas concentraciones en los tejidos

embrionarios durante la última etapa del desarrollo de la semilla antes de la desecación. Este grupo de proteínas no es específico de semillas, también se ha reportado su abundancia en tallos, hojas y raíces, especialmente, cuando la planta es sometida a déficit hídrico como sequía, salinidad y congelamiento (Hong-Bo *et al.*, 2005; Battaglia *et al.*, 2008; Silva Ortega, 2008; Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011; Díaz García, 2018). Hong-Bo y colaboradores (2005) indican que la regulación de la expresión de los genes LEA ocurre mediante cuatro pasos, cuando son inducidos por la sequía, los cuales son: reconocimiento de señales, transducción de señales, amplificación e integración de señales y respuestas de expresión de los genes LEA y la formación de productos.

Las proteínas LEA se han agrupado con base en la similitud de sus secuencias (motivos conservados) y peso molecular. Por ejemplo, Battaglia y colaboradores (2008) clasificaron las proteínas LEA en siete grupos de acuerdo con la similitud en la secuencia de aminoácidos, de tal forma que cada grupo se distingue por ciertos motivos consenso distintivos. Los grupos 1, 2, 3, 4, 6 y 7 corresponden a proteínas hidrofílicas, mientras que las hidrofóbicas se encuentran en el grupo 5, tomando como referencia clasificaciones anteriores, considerando proteínas LEA atípicas e hidrofóbicas y estableciendo nuevos grupos de clasificación (Dure, 1993; Bies-Ethève *et al.*, 2008; Hundertmark e Hinch, 2008). Por el contrario, también se establecen Familias de Proteínas (Pfam) las cuales pueden incluir a los diferentes grupos como las dehidrinas (DHN; Grupo 2), LEA\_1 (Grupo 4), LEA\_2, LEA\_3, LEA 4 (Grupo 3 y

Grupo 5), LEA\_5 (Grupo 1) y SMP (proteínas de maduración de la semilla; Grupo 6) (Hernández-Camacho, 2016).

Las proteínas LEA son solubles y básicas, ricas en glicina y lisina, y presentan pocos residuos hidrofóbicos, por lo que se consideran proteínas muy hidrofílicas y estables (López Bilbao, 1996; Berjak y Pammenter, 2010). Aunque su mecanismo preciso de acción aún no se ha descrito, se ha propuesto que las proteínas LEA tienen una función protectora ante la pérdida de agua en la última etapa de desarrollo de la embriogénesis. Las proteínas LEA no son capaces de proveer tal protección ante temperaturas elevadas, lo cual indica que su función está dirigida a condiciones de baja disponibilidad de agua (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011; Hernández-Camacho, 2016). Además, los genes LEA pueden clasificarse en genes que se expresan sólo en embriones (EMB564 en maíz) y aquellos que pueden inducirse por tratamientos con ABA (López Bilbao, 1996).

Rajjou y colaboradores (2008) caracterizaron el proteoma de semillas de *Arabidopsis* sometidas a diferentes tratamientos de envejecimiento e identificaron que el grupo 2 de las proteínas LEA (grupo DHN) podría contribuir en mantener su viabilidad. En semillas de maíz se encontró que la falta del ordenamiento estructural y la alta hidrofilia de la proteína EMB564, que pertenece al grupo 1 de las proteínas LEA con actividad antiagregante reducida, así como la presencia de enzimas antioxidantes, son de gran importancia para mantenimiento de la viabilidad de las semillas durante su maduración y almacenamiento (Wu *et al.*, 2011). Las proteínas extraídas de embriones de maíz se sometieron a análisis de SDS-PAGE y espectrometría de masas. La proteína EMB564

destaca por las numerosas modificaciones post-traduccionales, fosforilación, acetilación, metilación y desaminación de la proteína nativa que son relevantes para su función específica en semillas (López Bilbao, 1996; Wu *et al.*, 2011).

Las DHN es el grupo de las proteínas LEA más estudiadas debido a que desempeñan un papel fundamental en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico por sequía, alta salinidad, y bajas temperaturas. Los genes tipo DHN se expresan al haber salida de electrolitos a través de las membranas y lipoperoxidación; están involucradas en la unión y estabilización de membranas y en el equilibrio REDOX por ser antioxidantes; previenen la inactivación de proteínas por calor, protegen enzimas durante periodos de estrés, y ayudan reparando el daño oxidante provocado por estrés debido a la salinidad y sequía, al reducir la concentración de malondialdehído que proviene de la acción de EROs en lípidos y activando a la enzima superóxido dismutasa que actúa en los radicales superóxido transformándolos en peróxido de hidrógeno (Wang *et al.*, 2016; Mercado Díaz de León, 2018).

Se han realizado diversos estudios para explicar los mecanismos de acción de las DHN. La presencia de la región conservada llamada K (EKKGIMDKIKEKLP) es importante en la capacidad de protección de la proteína; se ha observado que, a mayor tamaño de la dehidrina, mayor capacidad de protección (Díaz García, 2018). Así mismo, se ha reportado que las regiones ricas en histidina permiten la unión de la proteína con iones metálicos evitando la producción de radicales hidroxilos en plantas expuestas a estrés hídrico. La presencia de un bloque de residuos de serina llamado segmento S (poliserina) puede sufrir una fosforilación extensa, y un dominio Y

(DEYGNP) similar al sitio de unión de nucleótidos en plantas y bacterias con una función chaperona (Hara *et al.*, 2005; Hernández Sánchez *et al.*, 2015; Qiu *et al.*, 2014; Hernández-Camacho *et al.*, 2017).

Las DHN pueden actuar como protectoras para otras proteínas a través del fragmento K formando una estructura  $\alpha$ -hélice anfifílica o anfipática, la cual permite que las DHN se unan a proteínas parcialmente desnaturalizadas en niveles bajos de agua; función similar a la de las moléculas chaperonas. Algunos estudios han demostrado que las dehidrinas KS son inducidas principalmente por bajas temperaturas, pero también en respuesta al estrés por sequía (Qiu *et al.*, 2014). Hernández-Camacho y colaboradores (2017), a partir de múltiples alineaciones de secuencias de aminoácidos en cactáceas, identificaron la presencia de tres repeticiones del segmento K, similar a la secuencia conservada en la base comparado con proteínas reportadas en la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Estudios *in silico*, empleando programas como TMHMM v.2, y observaciones experimentales, Tunnacliffe y Wise (2007) sugieren que las proteínas LEA se expresan en compartimientos celulares como cloroplastos, retículo endoplásmico, mitocondrias, núcleo y el citoplasma. Hundertmark e Hinch (2008) realizaron estudios en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. e identificaron diferentes tipos de genes LEA en las semillas; la predicción de la localización celular de las proteínas LEA a partir del análisis de sus secuencias proteicas; por ejemplo, las proteínas del grupo LEA\_3 podría encontrarse en la mitocondria y el grupo LEA\_4 y las proteínas de la maduración de la semilla (SMP) se localizan tanto en la mitocondria como en el cloroplasto.

Diversos autores han reportado la presencia de diversos genes LEA presentes en diferentes especies vegetales (Cuadro 2). Aunque todavía son pocos los estudios realizados en cactáceas sobre la participación de las proteínas en el mantenimiento de la viabilidad, se ha reportado la participación de diferentes genes LEA en el estrés de diferentes especies de cactáceas. Silva Ortega (2008) aisló e identificó genes de estas proteínas en *Opuntia streptacantha* Lem. a partir de oligonucleótidos diseñados en las regiones conservadas de cadenas de ADN (Osactina-1, Osp5cs, Osef-1, Ostpdpk $\alpha$ 0, Ostpdpk $\alpha$ 1, Ostpdpk $\alpha$ 2) inducidos en respuesta a la defensa contra un estrés de tipo abiótico (por sequía, calor, salinidad y tratamiento con ácido abscísico). La acumulación del gen Ops5cs codifica para la enzima denominada delta-1-pirrolin-5-carboxilato sintetasa que participa en la producción del aminoácido prolina, el cual evita que las plantas de *O. streptacantha* pierdan agua al encontrarse en suelos salinos (Delgado-Sánchez *et al.*, 2019).

Ochoa Alfaro (2011) y Hernández Sánchez (2013) caracterizaron el gen OpsDHN1, igualmente en *O. streptacantha*, mientras que Hernández-Camacho (2016) trabajó con las especies *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., *Leuchtenbergia principis* Hook. y *Mammillaria bombycina* Quehl para caracterizar el gen MabDHN-like; los genes OpsDHN1 y MabDHN-like son del tipo dehidrina y también están involucrados en respuesta al estrés por sequía, bajas temperaturas y salinidad.

**Cuadro 2.** Genes LEA reportados en la literatura en diferentes especies vegetales

ESPECIE	LEA (gen/código AGI/ID)	GRUPO LEA	REFERENCIA
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	smLEA2	LEA_2	Wang <i>et al.</i> , 2016
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.)	AtEm6	LEA_1	Bies-Ethève <i>et al.</i> , 2008
	Cor47	LEA_2	
	Lti30		
	Ecp63	LEA_3	
	EST PAP260, EST PAP051	LEA_4	
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	D29	LEA_5	
	D73	LEA_7	
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.)	EM6, EM1	LEA_1	Battaglia y Covarrubias, 2013
	RAB18	LEA_2	
	AtLEA4-1, AtLEA4-2	LEA_4	
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	PM2	LEA_3	
	GmPM29, GmPM16	LEA_4	
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.)	Atlg01470	LEA_2	
	Atlg52690	LEA_4	
	At2g40170	LEA_5	
<i>Zea mays</i> L.	DHN1		
<i>Citrus unshiu</i> (Yu.Tanaka ex Swingle) Marcow.	Q9ZR21_CITUN	LEA_2	Hundertmark e Hincha, 2008
<i>Triticum aestivum</i> L.	Q06540_WHEAT		
<i>Pisum sativum</i> L.	Q41060_PEA	LEA_3	
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Q39873_SOYBN		

### 2.7.3. Características y adaptaciones de semillas en ambientes áridos y semiáridos

Las cactáceas han desarrollado estrategias morfofisiológicas para asegurar una germinación exitosa y su establecimiento, entre los que se encuentran la modificación de tallos y raíces en las plantas. Así también, en algunos casos, se presentan asociaciones mutualistas con hongos y bacterias que permitan el establecimiento exitoso del organismo (De la Barrera, 1997; Sánchez-Salas *et al.*, 2015).

Las semillas de ambientes áridos y semiáridos presentan características que les permiten mantenerse viables bajo condiciones naturales, como *i)* características morfológicas: cámaras internas de aire para evitar el contacto directo del embrión con la testa, evitando exponer al mismo a las temperaturas extremas; y *ii)* características fisiológicas, como bajos contenidos de humedad (Rojas-Aréchiga y Batis, 2001; Sánchez *et al.*, 2015). Algunas estrategias de germinación que presentan las semillas de algunas especies son: *i)* variaciones de los tamaños, las más pequeñas germinarán antes que las de mayor tamaño debido a un menor requerimiento de humedad; *ii)* formación de estructuras que permiten la dispersión y funcionan como reservas de sustancias nutritivas como la dispersión dirigida a un sitio seguro para germinar; *iii)* rapidez de germinación, semillas de especies que germinan después de las lluvias o semillas con alta germinación por la acumulación de la humedad de varios días en el suelo; y *iv)* presencia de latencia, que se refiere a la baja actividad metabólica para su reactivación bajo condiciones favorables de germinación (Sánchez *et al.*, 2015).

La producción de semillas depende de los ciclos de vida de las plantas; es decir, la estrategia germinativa de las semillas está relacionada principalmente con el número de eventos reproductivos que presentan las plantas (Sánchez *et al.*, 2015).

Por otro lado, las semillas de cactáceas presentan variaciones en forma (ovoide, esférica irregular, ovada-reniforme, subesférica, reniforme), tamaño (1.8 x 1.4 mm, 2.1 x 1.6 mm, 1.4 x 1.1 mm, entre otros) (Weisser, 1979) y características estructurales (rudimentos seminales, coloración y grosor de los tegumentos, entre otros) (Flores y Engleman, 1976). Algunas características de las semillas que les permiten mantener la viabilidad bajo condiciones naturales, y que han sido el resultado de estrategias adaptativas, son: requerimiento de un periodo de postmaduración para que el embrión termine su desarrollo, el requerimiento de luz para la germinación que asegura que las semillas muy enterradas no germinen y la formación de un banco de semillas persistente (Sánchez *et al.*, 2015).

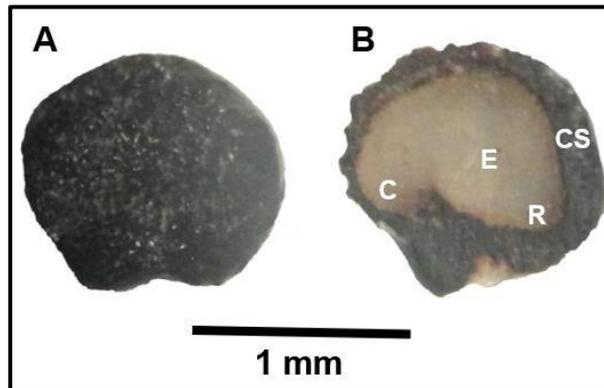
2.8. Características de la especie de estudio: *Escontria chiotilla* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) Rose

*Escontria chiotilla* (Figura 2) es una planta con una altura promedio de 7 m, con un tallo principal corto y con ramas numerosas (Figura 2A). Las ramas presentan de 7 a 8 costillas con areolas elípticas de 0.8 a 1.3 cm de largo generalmente confluentes en la parte terminal o media de las ramas, distantes entre sí. Espinas radiales subuladas, rectas, grises de 0.5 a 1.0 cm de largo; espinas centrales rectas, subuladas, pardo-

grisáceas y de longitud variable de 1 a 7 cm de largo (Arellano y Casas, 2003; Arias *et al.*, 2012; Villanueva *et al.*, 2016). Las flores crecen, generalmente, cerca de la parte superior de las ramas, tienen tépalos amarillos, con un pericarpio escamoso sin espinas. miden 3 cm de largo, en promedio (Figura 2B). Frutos globosos con cáscara roja, brácteas amplias y pulpa de color púrpura de sabor dulce, miden en promedio 5 cm de diámetro (Figura 2B y 2C), se consumen como fruta fresca; además, se emplean en la elaboración de bebidas refrescantes y vinillo de jiotilla, helados y mermeladas o conservas. Las semillas (Figura 2D y Figura 3) son ampliamente ovadas a orbiculares, cubierta seminal negra, opaca, con microrrelieve, miden 1.7 – 2 mm de largo y 0.9 – 1.3 mm de ancho, y tienen un peso que varía entre 0.3 – 0.7 mg (Arellano y Casas, 2003; Aguilar Barajas y Trujillo-Hernández *et al.*, 2009; Arias *et al.*, 2012; Ruíz Huerta *et al.*, 2015; Trujillo-Hernández *et al.*, 2017). Trujillo-Hernández y colaboradores (2017) indican que en *E. chiotilla* el número promedio de semillas por fruto es de  $532 \pm 181$ . Por el contrario, Casas y colaboradores (2007) resaltan la importancia del tipo de población; la cantidad promedio de semillas de una población silvestre es de  $407.632 \pm 20.67$ , mientras que para una población de poco manejo (*in situ*) es de  $532.718 \pm 15.601$ .



**Figura 2.** *Escontria chiotilla*. A) hábito; B) flor y fruto; C) frutos maduros; D) semilla.



**Figura 3.** A) Semilla de *E. chiotilla*; B) Corte longitudinal de la semilla de *E. chiotilla*: C, cotiledones; E, embrión; R, radícula; CS, cubierta seminal (C. Barbosa, comunicación personal, octubre de 2021).

*Escontria chiotilla* es apreciada por su aportación comercial ya que sus frutos son comestibles; pero hay que mencionar que su crecimiento y desarrollo, como en todas las cactáceas, es muy lento; en condiciones naturales, tardan de 6 a 8 años para

producir flores y frutos. Esta especie no tiene un manejo de cultivo y su comercialización no es rentable, por lo que se distribuye sólo de forma local o regional (Tenango Cabañas, 2004). Esta especie también se emplea como forraje y para cercas vivas, siendo una especie silvestre cosechada y manejada *in situ*.

*Escontria chiotilla* es una especie endémica y se distribuye en los estados de Guerrero, Michoacán y en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, el cual abarca parte del estado de Puebla y Oaxaca. *E. chiotilla* se distribuye en bosque tropical caducifolio y en matorral xerófilo, en elevaciones de 600 – 2000 msnm. Es una especie que forma parte de las asociaciones de plantas llamadas 'jiotillales' o 'quiotillales' caracterizados por altas densidades de esta especie. La fenología de la especie incluye dos periodos de floración, de marzo a mayo y de julio a agosto; y dos periodos de fructificación, de abril a mayo y de septiembre a noviembre (Valiente-Banuet *et al.*, 2000; Aguilar Barajas y Trujillo Hernández, 2009; Arias *et al.*, 2012).

*Escontria chiotilla* en condiciones naturales se reproduce sexualmente (López-Gómez *et al.*, 2000), por lo que emplea la formación de bancos de semillas como vía fundamental para su reproducción (Sánchez *et al.*, 2015).

## 2.9. Área de estudio

### 2.9.1. Características del Valle de Tehuacán-Cuicatlán

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán se localiza entre los 17° 48' y 18° 58' N y los 97° 03' y 97° 43' O (Valiente-Banuet *et al.*, 2000), se encuentra a una altitud que va de los 400

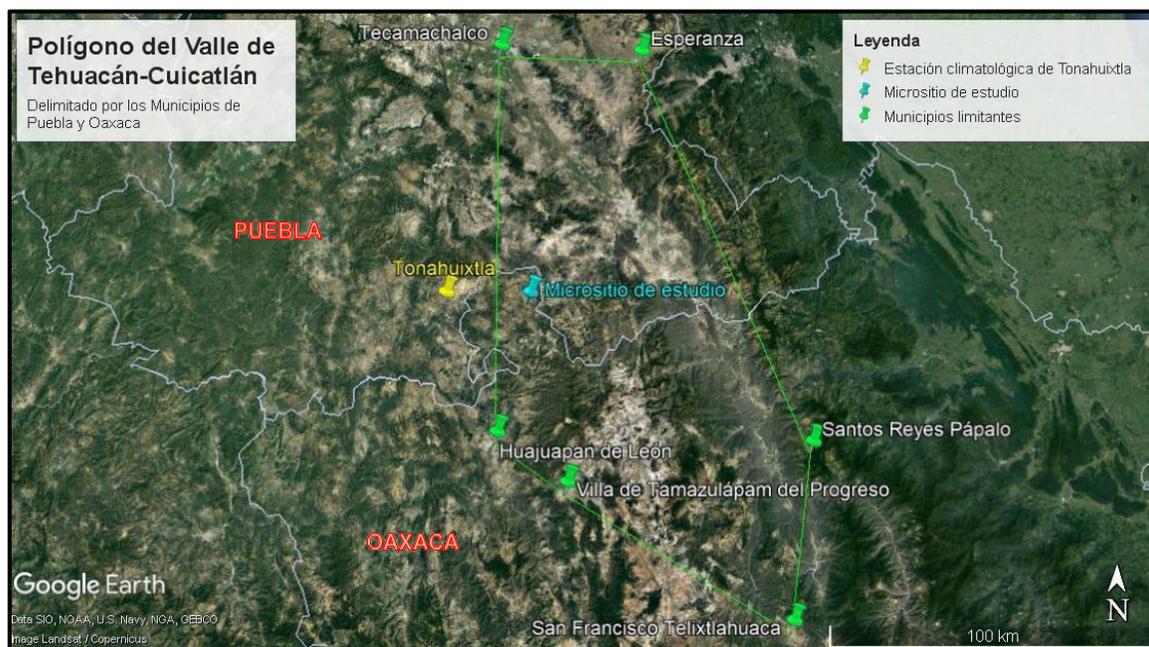
hasta los 3200 msnm. Presenta una temperatura media anual de 21°C y una precipitación media anual de 400 mm (Arias Toledo *et al*, 2000; Dávila *et al.*, 2002; Arias *et al.*, 2012; Miguel-Talonia *et al.*, 2014), predomina el clima seco, así como el templado subhúmedo en las partes altas; esta área forma parte de la provincia Mixteca-Oaxaqueña en la que existen valles tectónicos como los de Cuicatlán, Huajuapán, Tehuacán, Tepelmeme y Zapotitlán (Miguel-Talonia *et al.*, 2014).

Valiente-Banuet y colaboradores (2000) reconocieron 29 asociaciones vegetales presentes en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán clasificadas en seis categorías vegetales: i) agrupación de cactáceas arborescentes (bosques de cactáceas columnares), ii) agrupaciones de plantas arbóreas de zonas bajas (< 1800 m de altitud), iii) agrupación de plantas arbóreas de zonas altas (1 900 a 2 900 m de altitud), iv) agrupaciones de plantas arbóreas y herbáceas asociadas a ríos con agua permanente, v) agrupaciones de plantas arbustivas espinosas perennifolias y vi) plantas arbustivas inermes perennifolias. Destacan 10 tipos de vegetación dominada por especies endémicas: tetecheras de *Neobuxbaumia tetetzo* (F.A.C.Weber) Backeb.; *N. mezcalaensis* (Bravo) Backeb. y *N. macrocephala* (F.A.C. Weber) E.Y. Dawson; cardonales de *Cephalocereus columna-trajani* (Karw. ex Pfeiff.) K.Schum.; de *Mitrocereus fulviceps* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) Backeb. ex Bravo, de *Neobuxbaumia macrocephala* y *Stenocereus dumortieri* (Scheidw.) Buxb.; chichiperas de *Polaskia chichipe* (Gosselin) Backeb. y *P. chende* Gibson & Horak; jiotillales de *Escontria chiotilla*; izotales de *Beaucarnea gracilis* Lem. y de *B. purpusii* Rose; así como el matorral de *Gochnatia hypoleuca* (DC.) A.Gray.

En el año 2009, Valiente-Banuet y colaboradores reconocieron un total de 36 tipos de vegetación incluidos en seis asociaciones vegetales (bosques de cactáceas columnares, vegetación arbolada de zonas bajas, vegetación arbolada en zonas altas, vegetación asociada a ríos con agua permanente, matorrales dominados por arbustos o plantas espinosas y agrupamiento de plantas arbustivas sin espinas perennifolias) relacionadas con los diferentes tipos de clima, que están presentes en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán como son: templado, templado subhúmedo y seco de acuerdo con el sistema de clasificación de climas de Köeppen modificado por García (1998).

#### 2.9.2. Descripción del micrositio de estudio

El micrositio, donde se localiza el banco de semillas de este estudio, se encuentra en la localidad Trinidad de Huaxtepec (coordenadas 18°11'18.62"N y 97°40'43.99"O); en el Municipio de Santiago Chazumba, Distrito Huajuapán, estado de Oaxaca; forma parte del Valle de Tehuacán-Cuicatlán y se ubica en la región denominada Mixteca Baja (Figura 4).



**Figura 4.** Micrositio de estudio, Trinidad de Huaxtepec, Valle de Tehuacán-Cuicatlán

(Adaptado de Google Earth®, s.f.).

La composición del suelo del micrositio de estudio está conformada por arena (77.5%), limo (9.8%) y arcilla (17.7%), y es de una textura Franco-Arenoso. El pH es de 5.9, la materia orgánica es del 2.82%, la cantidad de fósforo es de 9.55 mg Kg<sup>-1</sup> y de magnesio es de 82 mg Kg<sup>-1</sup> (Guzmán-Hernández, 2018).

El Municipio Santiago Chazumba se encuentra entre los paralelos 18°03' y 18°18' de latitud norte y los meridianos 97°36' y 97°52' de longitud oeste; altitud entre 1 300 y 2 300 m. Colinda al norte con el municipio de Atexcal; al este con el municipio de Zapotitlán, ambos presentes en Puebla; al oeste con el municipio de Cosoltepec y al sur con el municipio de San Pedro y San Pablo Tequixtepec; que se encuentra en el estado de Oaxaca (Figura 4). El tipo de clima presente es cálido y templado con lluvias en verano (INAFED, 2010).

En el Municipio de Santiago Chazumba, existe una gran variedad de plantas como el mezquite (*Prosopis laevigata* (Willd.) M.C.Johnst.), huizache (*Acacia farnesiana* (L.) Willd.), cazahuate (*Ipomoea* sp.), ahuehuete (*Taxodium* sp.), sauce (*Salix* sp.), nopal (*Opuntia* sp), quelite (*Amaranthus hybridus* L.), pitaya (*Stenocereus* sp.), xoconostle dulce (*Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Riccob.), garambullo (*Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff.) Console) y la jiotilla (*Escontria chiotilla*) (INAFED, 2010).

### 3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Las semillas de *E. chiotilla* conservadas *ex situ* bajo condiciones subóptimas durante 0 y 10 años mantienen la viabilidad elevada?
2. ¿Las semillas de *E. chiotilla* conservadas *ex situ* durante 0 y 10 años, y enterradas posteriormente *in situ*, pierden la viabilidad entre los 6 y 18 meses?
3. ¿Cuáles son los niveles de proteínas que se mantienen en semillas viables de *E. chiotilla*?
4. ¿Existe una correlación entre los niveles de proteínas y la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla*?

### 4. HIPÓTESIS

1. Si el almacenamiento *ex situ* permite a las semillas de *E. chiotilla* mantener alta la viabilidad, entonces las semillas conservadas durante 0 y 10 años mantendrán la viabilidad elevada.
2. Si las semillas de *E. chiotilla* conservadas *ex situ* durante 0 y 10 años son enterradas *in situ*, entonces perderán su viabilidad entre 6 y 18 meses.
3. Si las semillas de *E. chiotilla* conservadas *ex situ* o *in situ* mantienen la viabilidad elevada, entonces los niveles de proteínas que participan en la viabilidad y longevidad se mantendrán elevados.

## 5. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de las proteínas LEA en la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla* conservadas *ex situ* durante 0 y 10 años.
- Determinar la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla* conservadas *ex situ* durante 0 y 10 años, enterradas posteriormente *in situ* y exhumadas a los 6, 12 y 18 meses.
- Cuantificar los niveles de proteínas en semillas de *E. chiotilla* almacenadas *ex situ* e *in situ*.
- Realizar una revisión bibliográfica sobre el metabolismo de las proteínas LEA y moléculas relacionadas en los procesos de viabilidad y longevidad en semillas de especies de Cactaceae y familias relacionadas.

**NOTA.** La participación de las proteínas LEA en la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla* no se realizó experimentalmente en este estudio debido a la contingencia derivada de la pandemia de casi dos años, por lo que dos de los objetivos originales que fueron “Identificar las proteínas que se mantienen en semillas de *E. chiotilla* conservadas *ex situ* durante 0 y 10 años, y exhumadas a los 6, 12 y 18 meses (*in situ*)” y “Caracterizar las proteínas más abundantes en semillas de *E. chiotilla* con elevada

viabilidad conservadas *ex situ* durante 0 y 10 años, y exhumadas de la condición *in situ* a los 6, 12 y 18 meses” fueron modificados, como se observa en los últimos dos objetivos específicos, en común acuerdo con el Comité Académico de la Maestría con la finalidad de concluir en tiempo y forma el proyecto de tesis.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Material biológico de cosechas 2008 y 2018

Los frutos de *Escontria chiotilla* fueron adquiridos en el Mercado de Chazumba, ubicado dentro del Municipio Santiago Chazumba, provenientes de las cosechas de mayo de 2008 y 2018 dentro del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Las semillas de *E. chiotilla* del año de cosecha 2008 empleadas para este estudio se mantuvieron almacenadas *ex situ* durante 10 años en frascos de vidrio en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente ( $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Las semillas de la cosecha 2018 no tuvieron un previo almacenamiento *ex situ*.

Las semillas de las cosechas 2008 y 2018 fueron extraídas de los frutos y se enjuagaron con agua corriente con la finalidad de eliminar los restos de pulpa. Posteriormente, las semillas se secaron a temperatura ambiente ( $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) durante 48 horas y fueron almacenadas bajo condiciones de laboratorio (obscuridad,  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ).

Antes del almacenamiento y después de cada exhumación, se realizó la desinfección de las semillas de ambos años de cosecha y de ambos tipos de almacenamiento (*in*

*situ* y *ex situ*) empleando una solución comercial de hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 0.03% (v/v) durante 5 min.

## 6.2. Almacenamiento *in situ* y *ex situ*

Las semillas de *E. chiotilla* de la cosecha 2008 con 10 años de almacenamiento, y las semillas de la cosecha 2018 (sin almacenamiento) fueron conservadas *in situ* y *ex situ* como sigue:

Conservación *in situ*: Seis sobres de malla de polietileno (poros <0.5 mm) con un gramo de semillas cada uno (total de 6 g, 3 g de las semillas de la cosecha 2008 y 3 g de las semillas de la cosecha 2018) se enterraron (5 – 10 cm de profundidad) en el micrositio. Se realizaron exhumaciones de 2 sobres (un sobre de las semillas de la cosecha 2008 y otro sobre de las semillas de la cosecha 2018) a los 6, 12 y 18 meses después del enterramiento.

Conservación *ex situ*: Las semillas de ambos años de cosecha (2008 y 2018) se mantuvieron en frascos de vidrio en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente ( $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ).

## 6.3. Siembra de semillas en placas de agar bacteriológico

Las semillas se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar durante 24 h. Se sembraron 3 lotes de 50 semillas en placas de agar bacteriológico (BIOXON<sup>M.R.</sup>) al 1%

(p/v) y se incubaron a  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 21 días en una incubadora (Precision®, Dual Program Illuminated Incubator) y con un fotoperiodo de 12 h luz ( $15.25 \mu\text{m m}^{-2} \text{S}^{-1}$ ) / 12 h oscuridad.

#### 6.4. Viabilidad de las semillas de *Escontria chiotilla*

La viabilidad se determinó con la emergencia de la radícula, a través de los parámetros de germinación:

- a. Capacidad de Germinación (CdG) mediante la fórmula (Baskin y Baskin, 1998):

$$\text{CdG} = \frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Número total de semillas}} \times 100$$

- b. Tiempo Medio de Germinación (TMG), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{TMG} = \Sigma(Dn)/\Sigma n$$

donde  $n$  = número de semillas que germinan en el día  $D$ , y  $D$  = es el número de días a partir de la fecha de siembra (Ellis y Roberts, 1981; Flores *et al.*, 2011).

Los porcentajes de CdG correspondientes a la cosecha 2008 y 2018 del almacenamiento *ex situ* se analizaron mediante la prueba paramétrica de U-

Mann-Whitney, mientras que para los porcentajes de CdG de ambos años de cosecha del almacenamiento *in situ* se utilizó una prueba de comparación de medias de t-student. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si los porcentajes registrados de CdG presentaban diferencias significativas entre los tiempos de almacenamiento (NCSS v.2020).

#### 6.5. Elementos y factores climáticos: Efecto de la temperatura y humedad en la viabilidad de las semillas

La precipitación y temperatura de los años 2008, 2018 y 2019 reportados por la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, 2021) de la estación climatológica de Tonahuixtla en San Jerónimo Xayacatlán en el Estado de Puebla (18°11'7.00" N, 97°55'11.00" O) fueron documentados y estudiados. La estación climatológica fue elegida debido a la cercanía con el micrositio de estudio y por presentar los registros climáticos más completos y recientes.

#### 6.6. Extracción y cuantificación de proteínas totales

**NOTA EXPERIMENTAL.** En el presente estudio sólo se realizó la extracción y cuantificación de proteínas totales.

Las semillas se pulverizaron con N<sub>2</sub> líquido. Cada 0.5 g de tejido, se homogenizó con 5 mL de buffer de extracción (APÉNDICE), y luego las muestras se centrifugaron (Centrífuga (micro) 5415 R, Eppendorf®) a 226.4 g durante 15 min a temperatura

ambiente. El sobrenadante fue recuperado y almacenado en un ultracongelador (Thermo Scientific™ Forma™ serie 88000) a -86°C hasta su uso.

Las proteínas totales se cuantificaron con el método de Bradford® (Bradford, 1976) (APÉNDICE), usando una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) como estándar a diferentes concentraciones (APÉNDICE). La absorbancia se leyó a 590 nm (APÉNDICE) en un espectrofotómetro Genesys10S UV-VIS Spectrophotometer® (Villa-Hernández *et al.*, 2013).

#### 6.7. Correlación entre los niveles de proteínas totales y la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla* almacenadas en condiciones *in situ*

Para evaluar la correlación entre la CdG y la concentración de las proteínas totales para ambos años de cosecha 2008 y 2018 bajo almacenamiento *in situ*, se realizó un análisis de correlación de Pearson mediante el programa NCSS v.2020.

#### 6.8. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de genes LEA reportados en la literatura

**NOTA EXPERIMENTAL.** Para realizar los alineamientos, se utilizaron los genes LEA reportados en la literatura de especies de la Familia Cactaceae para obtener la relación filogenética entre las mismas.

Con la finalidad de analizar la relación entre especies de cactáceas, a partir de las secuencias nucleotídicas de los genes LEA reportadas por Silva Ortega (2008), Ochoa Alfaro (2011) y Hernández-Camacho (2016) de las especies *Opuntia streptacantha* (HM581971), *Leuchtenbergia principis* (KP720562), *Mammillaria bombycina* (KP720560) y *Opuntia ficus-indica* (KP720561), se realizaron análisis de alineamientos con el programa MultAlin (<http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/multalin.py>), se obtuvieron los porcentajes de similitud y la secuencia consenso. Posteriormente, se realizó una búsqueda en el programa BLAST utilizando la secuencia consenso.

#### 6.9. Proteínas y moléculas implicadas en procesos de viabilidad y longevidad en semillas de cactáceas y familias relacionadas

Se realizó una búsqueda bibliográfica empelando buscadores académicos como Academia.edu (<https://www.academia.edu/>), Google Académico (<https://scholar.google.es/>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Redalyc (<https://www.redalyc.org/>), ResearchGate (<https://www.researchgate.net/>), Scielo (<https://scielo.org/es/>), ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>), Springer Link (<https://link.springer.com/>) y World Wide Science (<https://worldwidescience.org/>) utilizando palabras clave como: *seed viability*, *seed proteins*, *seed development*, *seed proteomics*, *protein seed viability*, *molecular viability Cactaceae*, *viability cactaceae*, *proceso viabilidad semillas*, *proteínas y viabilidad en semillas de cactáceas*, entre otras, para determinar las proteínas y otras biomoléculas relacionadas con la viabilidad

y longevidad de semillas de las especies de las familias relacionadas filogenéticamente con la familia Cactaceae.

Los autores de los nombres científicos se revisaron utilizando principalmente la base de datos “The Plant List” ([www.theplantlist.com](http://www.theplantlist.com)) y “Plants of the World Online” (<https://powo.science.kew.org/>), así como diversos fascículos de la Flora del Valle de Tehuacán, como el No. 95 correspondiente al de la Familia Cactaceae (Arias *et al.*, 2012).

## 7. RESULTADOS

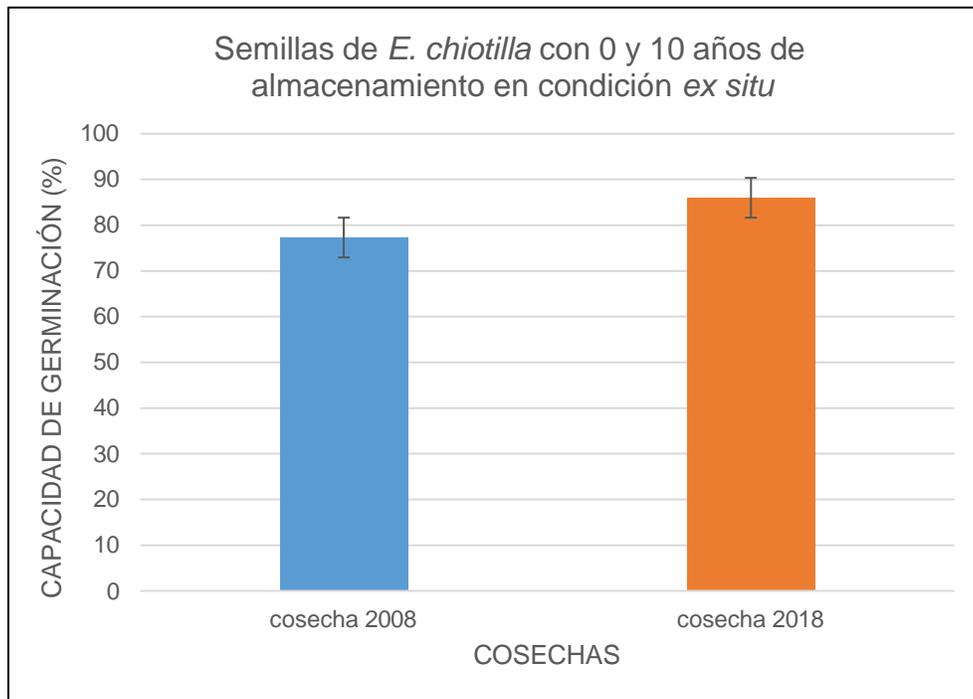
### 7.1. Viabilidad de las semillas de *Escontria chiotilla*

#### 7.1.1. Almacenamiento *ex situ*

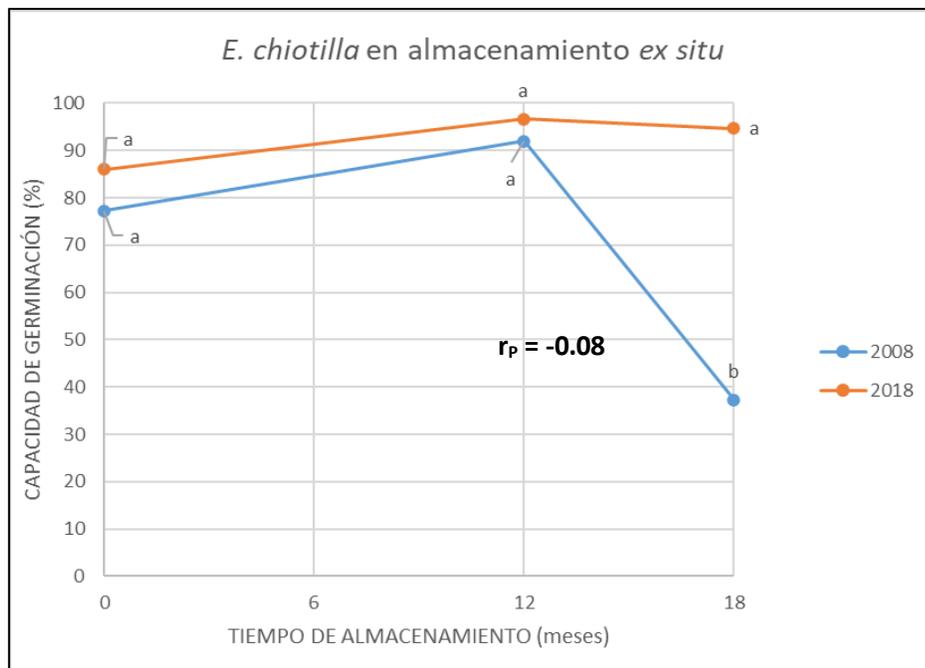
Las semillas de *E. chiotilla* almacenadas bajo condiciones *ex situ* durante 0 y 10 años (cosechas 2018 y 2008, respectivamente) presentaron niveles altos (>75%) de viabilidad, pero la viabilidad fue mayor en las semillas de la cosecha 2018 fue mayor ( $86 \pm 2\%$ ) en comparación con las semillas cosechadas en 2008 ( $77.3 \pm 9.9\%$ ; Figura 5).

La viabilidad de las semillas (cosecha 2018) almacenadas *ex situ* durante 18 meses fue mayor ( $94.7 \pm 4.2\%$ ) que la de las semillas de la cosecha 2008 ( $37.3 \pm 5.03\%$ ) almacenadas durante el mismo periodo (Figura 6).

El TMG de las semillas (colecta 2008) almacenadas *ex situ* durante 10 años fue de  $10 \pm 0.6$  días, y las semillas (cosecha 2018) presentaron un TMG ( $6.6 \pm 0.5$  días). Cuando el almacenamiento *ex situ* se prolongó 18 meses más, el TMG de las semillas de la cosecha 2008 fue de  $8.6 \pm 0.4$  días, y el de las semillas de la cosecha 2018 fue  $5.7 \pm 1.1$  días (Cuadro 3).

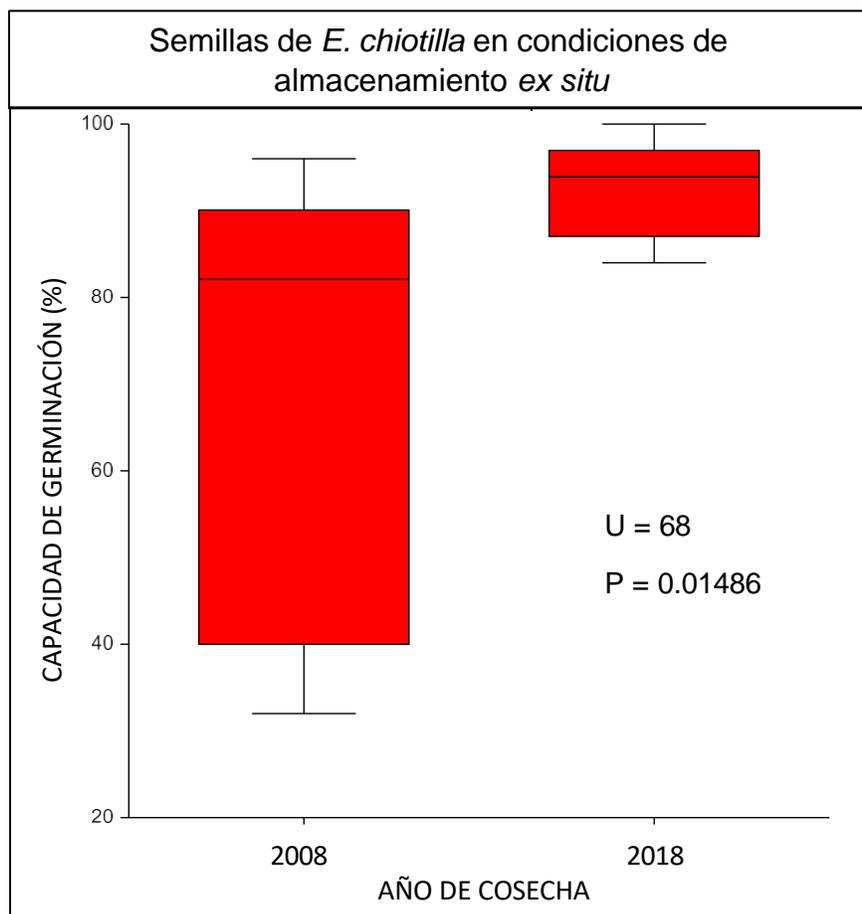


**Figura 5.** Capacidad de germinación de las semillas de *E. chiotilla* de las cosechas 2008 y 2018 (almacenadas *ex situ* durante 10 y 0 años, respectivamente).



**Figura 6.** Capacidad de germinación de *E. chiotilla* almacenadas *ex situ* a los 0, 6, y 18 meses (Comparación de medias por Tukey).

Los porcentajes registrados de CdG correspondientes a las cosechas 2008 y 2018 presentan diferencias significativas ( $U = 68$ ;  $P = 0.015$ ) (Figura 7).



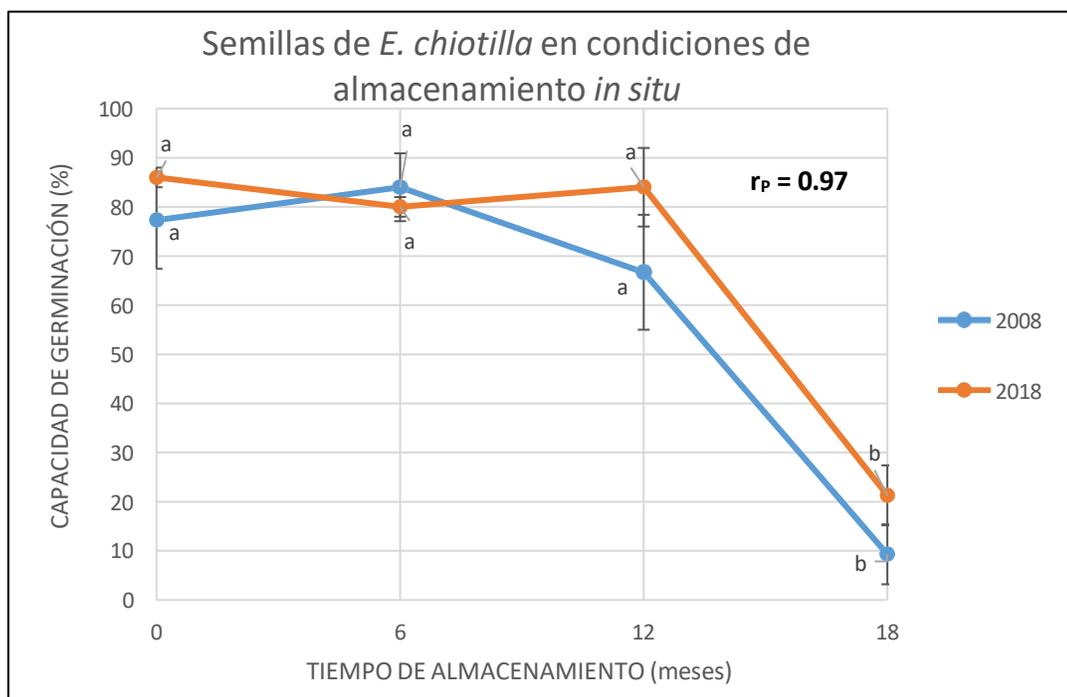
**Figura 7.** Capacidad de germinación de las semillas de *E. chiotilla* de las cosechas 2008 y 2018 (almacenadas *ex situ* durante 10 y 0 años, respectivamente) (análisis estadístico de U-Mann-Whitney; NCSS v.2020).

### 7.1.2. Almacenamiento *in situ*

La viabilidad de las semillas de la cosecha 2008 almacenadas *in situ* se mantiene alta después de los 12 meses ( $66.7 \pm 11.72\%$ ). Por el contrario, a los 18 meses de almacenamiento, se observó un descenso en la viabilidad ( $CdG = 9.3 \pm 6.11\%$ ) (Figura 8). La germinación ocurrió entre los 6 y 10 días.

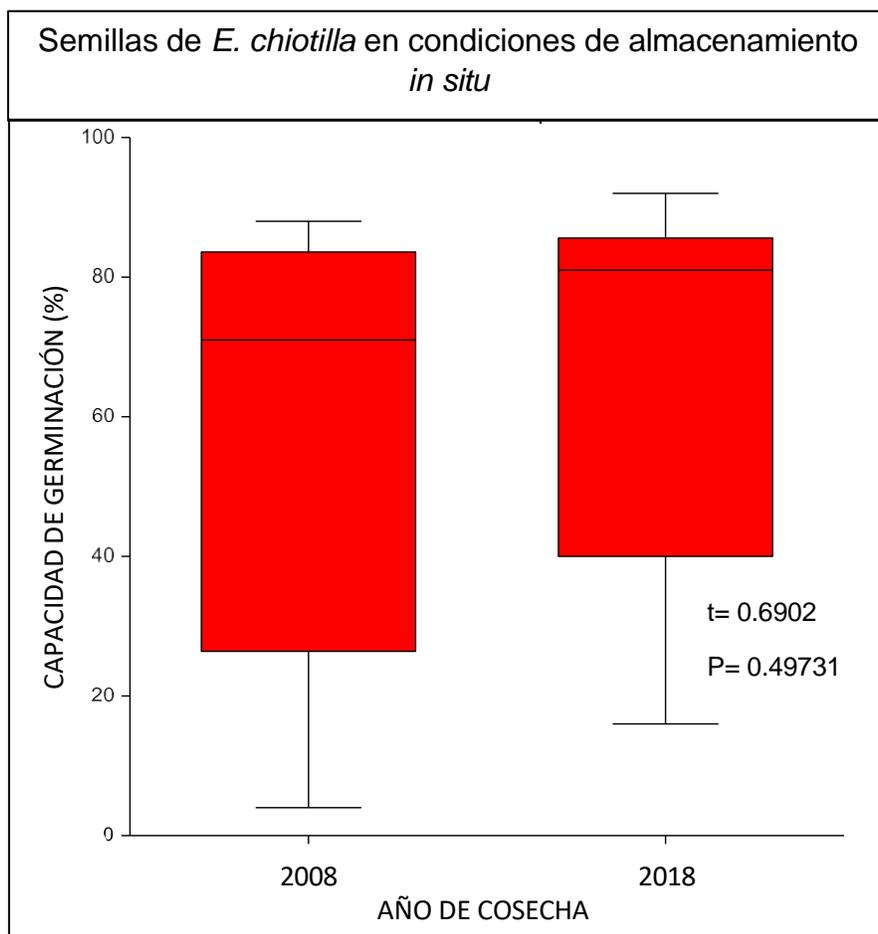
En las semillas de la cosecha 2018 almacenadas *in situ*, la viabilidad se mantiene alta entre los 0 y 12 meses ( $80 \pm 2\%$  y  $86 \pm 2\%$ , respectivamente). Al igual que en las semillas de la cosecha 2008 almacenadas *in situ*, se presentó una disminución de la viabilidad a los 18 meses con el  $21.3 \pm 6.1\%$  (Figura 8). La germinación ocurrió entre los 7 y 9 días.

La viabilidad de las semillas almacenadas *in situ* durante 0, 6 y 12 meses de los años de cosecha 2008 y 2018, no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $F = 0.97940$ ;  $P = 0.39830$ ), pero sí hubo diferencias respecto a la viabilidad de semillas almacenadas durante 18 meses ( $F = 75.38$ ;  $P < 0.0001$ ; Figura 8).



**Figura 8.** Capacidad de germinación de las semillas de *E. chiotilla* de las cosechas 2008 y 2018 almacenadas *in situ* durante 0, 6, 12 y 18 meses. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre los tiempos de almacenamiento (Comparación de medias por Tukey).

Los porcentajes registrados de CdG de las semillas entre los años de cosecha no presentaron diferencias significativas ( $t = 0.6902$ ;  $P = 0.49731$ ; Figura 9).



**Figura 9.** Capacidad de germinación de las semillas de *E. chiotilla* de las cosechas 2008 y 2018 (almacenadas *ex situ* durante 10 y 0 años, respectivamente; comparación de medias de t-Student; NCSS v.2020).

## 7.2. Efecto de la temperatura y precipitación pluvial en la viabilidad de las semillas

Las temperaturas máximas extremas disminuyeron durante el año 2008 por debajo de 30°C a partir del mes de junio y se mantuvieron alrededor de los 29°C de junio a diciembre (Figura 10). Las temperaturas mínimas extremas aumentaron por encima de 10°C a partir de marzo y permanecieron constantes la mayor parte de la temporada de lluvias (abril a septiembre); se registró una mínima temperatura en octubre (1°C). El aumento de las temperaturas mínimas extremas coincidió con el primer periodo de floración (marzo a mayo) y de fructificación (abril a mayo) de *E. chiotilla*.

La temporada de lluvias en 2008 se presentó durante los meses de abril a octubre; junio, julio y septiembre son los meses más lluviosos, con registros de precipitación por encima de los 100 mm; durante los meses de abril, mayo y octubre se registraron precipitaciones por debajo de los 50 mm. El inicio y el término de la temporada de lluvias coincidió con los dos periodos de fructificación de *E. chiotilla*. Durante el mes de septiembre se registraron los niveles más altos de precipitación del año, por arriba de los 150 mm, lo cual coincidió con el segundo periodo de fructificación de la especie de estudio (Figura 10).

La temporada de secas en el año 2018 (enero a marzo y diciembre) y 2019 (enero a marzo) coincidió con los registros de las temperaturas mínimas extremas (alrededor de los 5°C). En el año 2018, las temperaturas máximas extremas se registraron en marzo y en mayo (alrededor de 35°C) y disminuyeron en junio, registrado como el mes con mayor precipitación (> 200 mm). En 2019, las temperaturas máximas extremas se

registraron durante febrero y de abril a junio, y las mínimas extremas aumentaron en abril por alrededor de los 10°C (Figura 11).

La temporada de lluvias en el año 2018 inició en el mes de abril y termina en noviembre (Figura 11), lo cual coincidió con los periodos de fructificación de *E. chiotilla*, al igual que en el año 2008 (Figura 10). Los niveles de precipitación del año 2018 fueron menores que los registrados en el 2008 (por debajo de los 100 mm); el mes de junio se registró como el más lluvioso (por arriba de los 200 mm). En el año 2019, el inicio de la temporada de lluvias se registró en abril, lo cual coincidió con el periodo de fructificación, al igual que en los años 2008 y 2018, aunque no se registraron lluvias durante el mes de mayo (Figura 11).

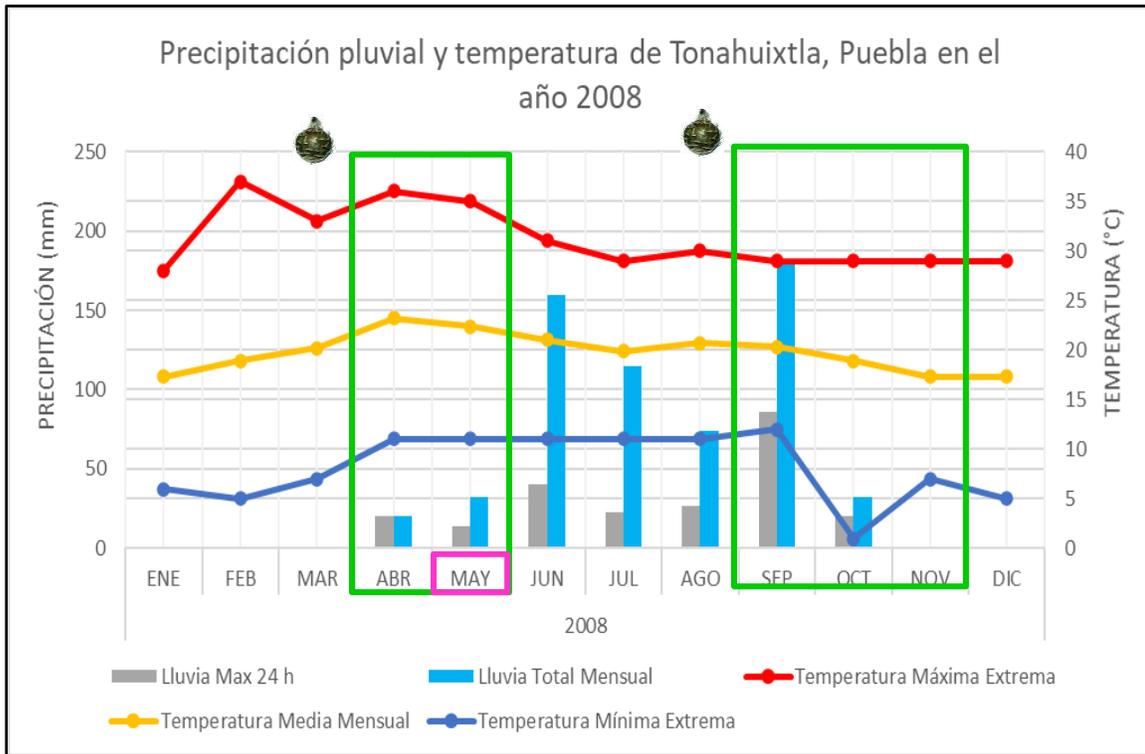
La temporada de lluvias del año 2008 (de abril a octubre; Figura 10) fue similar a la del 2018, aunque en este último año se prolongó hasta noviembre (Figura 11). En 2008, los meses con más lluvias (> 150 mm) fueron junio y septiembre (Figura 10), a diferencia del año 2018 donde sólo se registraron lluvias mayores a 200 mm en junio, y mayores a 100 mm para el año 2019 (Figura 11). Durante la mayor parte de la temporada de lluvias del 2008, se registraron precipitaciones mayores a los 70 mm (de junio a septiembre; Figura 10); mientras que para el año 2018, se registraron lluvias menores a 100 mm durante casi toda la temporada (Figura 11).

Los niveles de precipitación fueron mayores en el año 2008 que los registrados en los años 2018 y 2019. La temporada de lluvias en el año 2008 comenzó desde el mes de abril y terminó en octubre; la mayor precipitación se registró de junio a septiembre (>50 mm; Figura 10). En el año 2018, las lluvias comenzaron en abril, pero se prolongaron

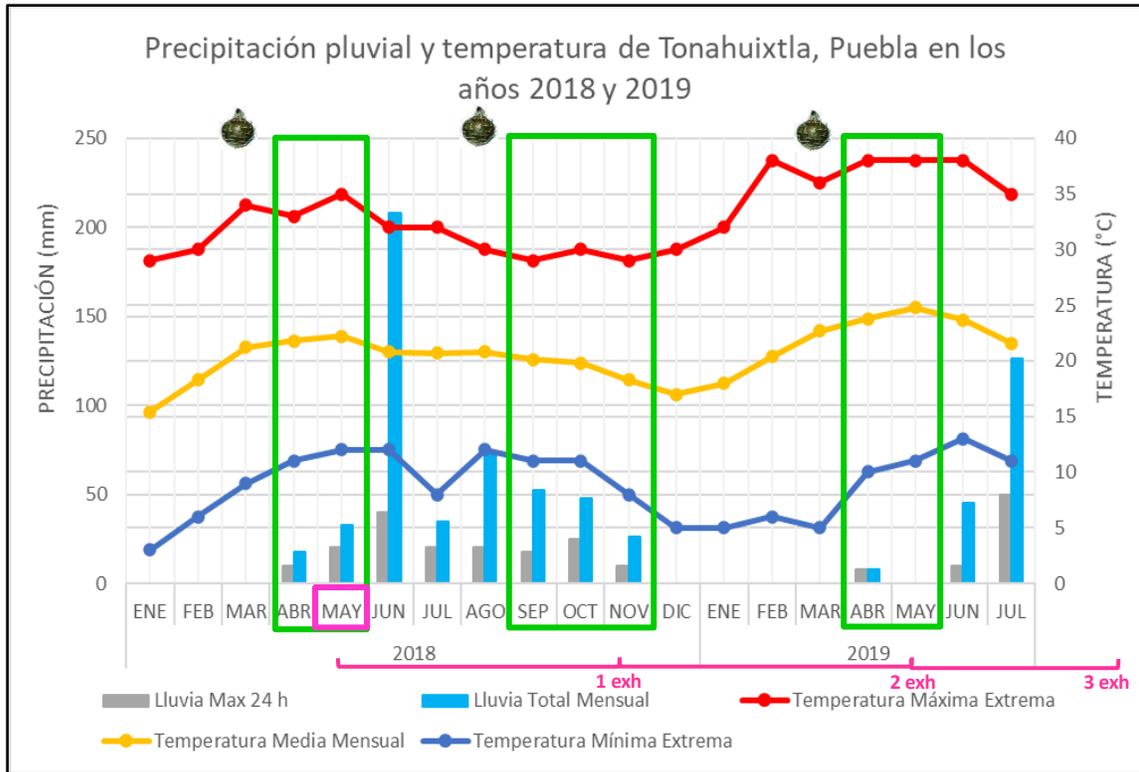
hasta el mes de noviembre (Figura 11); la precipitación durante estos meses fue menor en el 2018 (de 18 a 74 mm) que la registrada en el 2008 (de 74 a 180 mm). Para el año 2019, se observó que la temporada de lluvias también comienza en abril, igual que los años 2008 y 2018 (Figura 11). Aunque en el mes de mayo del 2019 no se registraron lluvias, julio presentó una mayor precipitación (126 mm) que en julio del 2018 (35 mm; Figura 11). El mes de junio presentó variaciones en la precipitación de los años 2008, 2018 y 2019; en el año 2018, junio presentó mayor precipitación (208 mm), que los registrados en junio del 2008 (160 mm) y en junio del 2019 (45 mm).

Las temperaturas máximas extremas en el año 2008 se mantuvieron alrededor de los 30°C en la mayor parte del año (de junio a diciembre; Figura 10). En cambio, en el 2018 se registró un aumento en las temperaturas máximas extremas (de 29 a 35°C), y un incremento para el año 2019 (de 32 a 38°C; Figura 11).

Los registros de las temperaturas mínimas extremas fueron menores en el año 2008, de 1 a 12°C (Figura 10), que las registradas para el 2018 (de 3 a 12°C) y 2019 (de 5 a 13°C; Figura 11).



**Figura 10.** Relación de la precipitación pluvial y la temperatura mensual en el año 2008 de la estación meteorológica Tonahuixtla (CONAGUA). Los recuadros verdes indican la temporada de fructificación de *E. chiotilla*. El recuadro rosa indica el mes en el que se adquirieron los frutos de *E. chiotilla*.



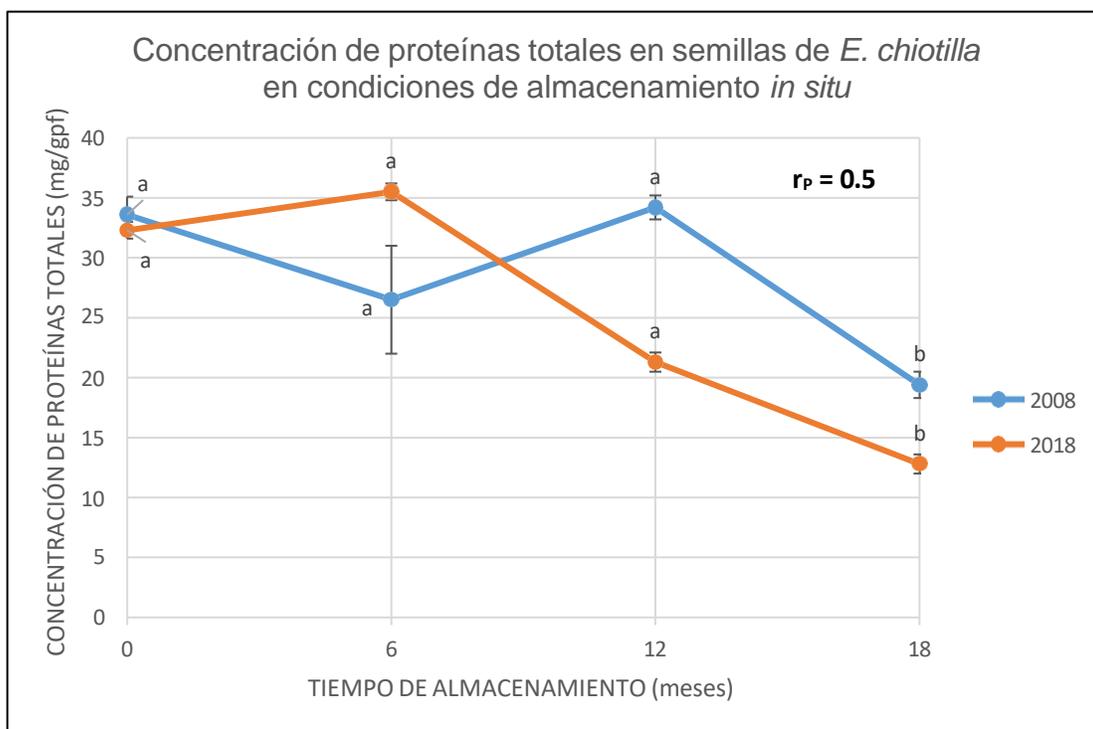
**Figura 11.** Relación de la precipitación pluvial y temperatura mensual en los años 2018 y 2019 de la estación meteorológica Tonahuixtla (CONAGUA). Los recuadros verdes indican la temporada de fructificación de *E. chiotilla*. El recuadro rosa indica el mes en el que se adquirieron los frutos de *E. chiotilla*. 1 *exh*, Primera exhumación (noviembre, 2018); 2 *exh*, Segunda exhumación (mayo, 2019); 3 *exh*, Tercera exhumación (noviembre, 2019).

### 7.3. Contenido de proteínas totales en semillas de *E. chiotilla*

**NOTA EXPERIMENTAL.** En el presente estudio sólo se trabajó con proteínas totales, las cuales fueron extraídas de las semillas de *E. chiotilla* y cuantificadas.

La concentración de las proteínas totales de las semillas de *E. chiotilla* de los años de cosecha 2008 y 2018 en el mes de almacenamiento 0 fue de  $33.6 \pm 1.5$  mg/gpf (gramo de peso fresco) y  $32.3 \pm 0.7$  mg/gpf, respectivamente, pero la concentración disminuyó después de los 18 meses tanto en almacenamiento *ex situ* (2008,  $9.6 \pm 0.3$  mg/gpf; 2018,  $21.3 \pm 1.3$  mg/gpf) como en almacenamiento *in situ* (2008,  $19.4 \pm 1.1$  mg/gpf; 2018,  $12.8 \pm 0.8$  mg/gpf; Figura 12, Cuadro 3).

La concentración de las proteínas totales en semillas de las cosechas 2008 y 2018 enterradas durante 6 meses fue de  $26.5 \pm 4.5$  mg/gpf y  $35.5 \pm 0.7$  mg/gpf, respectivamente. Después de 12 meses de enterramiento, las concentraciones fueron de  $34.2 \pm 1$  mg/gpf en las semillas de la cosecha 2008, y de  $21.3 \pm 0.8$  mg/gpf en las de la cosecha 2018 (Figura 12, Cuadro 3).



**Figura 12.** Contenido de proteínas totales en semillas de *E. chiotilla* de las cosechas 2008 y 2018 (almacenadas *ex situ* durante 10 y 0 años, respectivamente) almacenadas *in situ* durante 0, 6, 12 y 18 meses (Comparación de medias por Tukey).

**Cuadro 3.** Promedios (n=3) de las concentraciones de proteínas totales y Tiempo Medio de Germinación (TMG) de semillas de *E. chiotilla* de las cosechas 2008 y 2018 a diferentes tiempos de almacenamiento *in situ* (ANOVA).

ALMACENAMIENTO <i>in situ</i> Y AÑO DE COSECHA	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO* (meses)	$\bar{x}$ CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES (mg/gpf)	$\bar{x}$ TMG (días)
2008	0	33.6 ± 1.5	10.04 ± 0.6
	6	26.5 ± 4.5	6.2 ± 0.3
	12	34.2 ± 1	10.1 ± 1.3
	18	19.4 ± 1.1	5.9 ± 1.9
2018	0	32.3 ± 0.7	6.6 ± 0.5
	6	35.5 ± 0.7	8.3 ± 0.1
	12	21.3 ± 0.8	7.8 ± 0.5
	18	12.8 ± 0.8	9.1 ± 1.1

\*Promedios de las concentraciones de las proteínas totales (n=2); Promedios de los TMG, (n=3); las exhumaciones se realizaron a los 6, 12 y 18 meses.

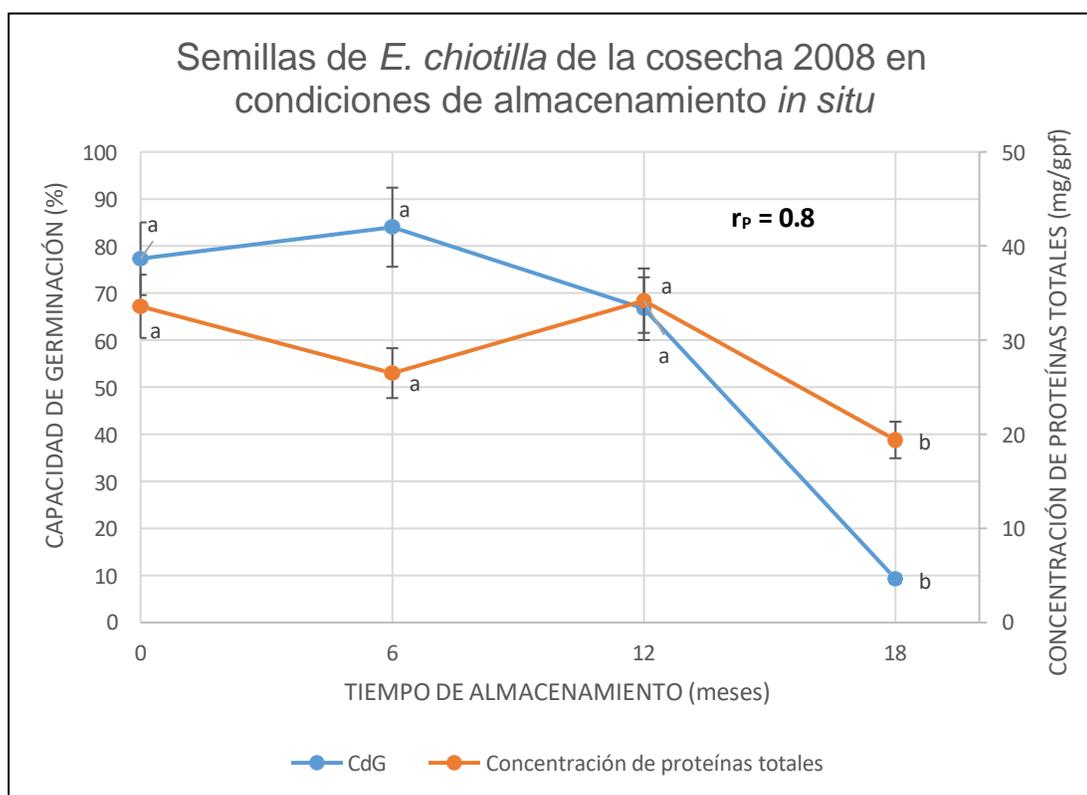
#### 7.4. Correlación entre los niveles de proteínas totales y la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla* almacenadas en condiciones *in situ*

Para determinar la correlación entre la viabilidad de las semillas y la concentración de proteínas totales para los años de cosecha 2008 y 2018, se realizó una prueba de

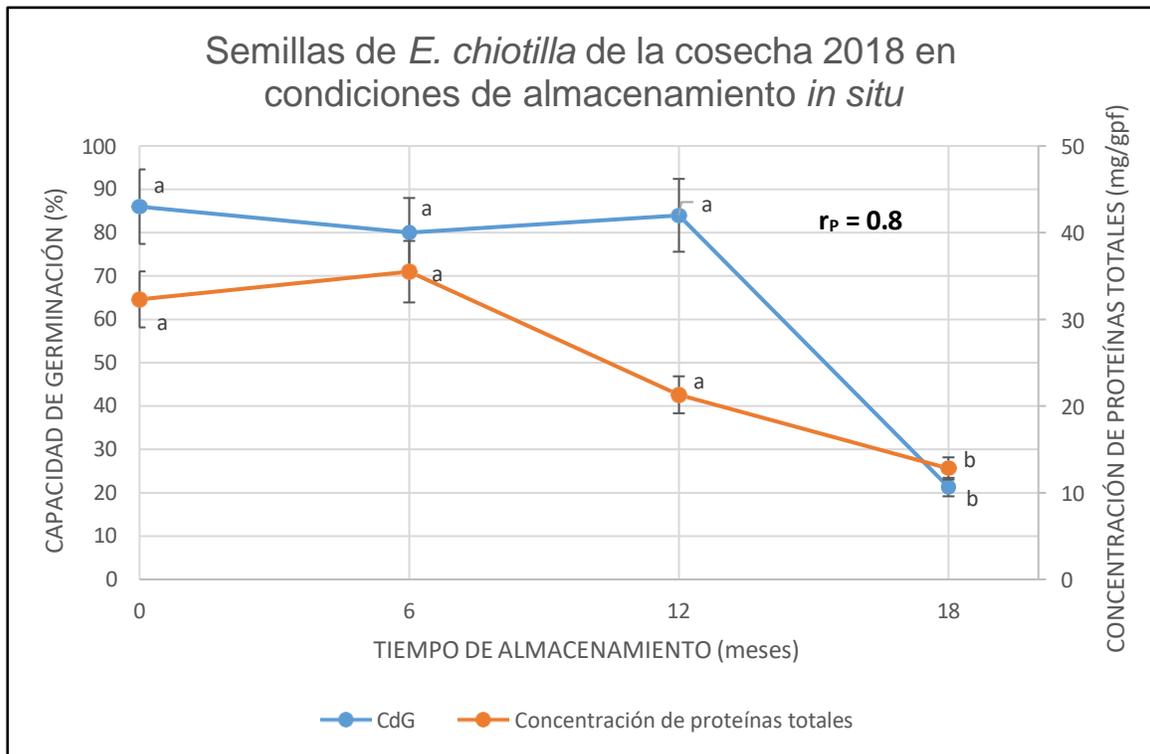
Pearson para el almacenamiento *in situ*, empleando el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) con un valor de significancia del 0.05.

Las semillas que fueron almacenadas *in situ* de las cosechas 2008 y 2018 presentaron una  $r = 0.8$  (Figura 13 y 14), lo que indica una alta correlación entre la viabilidad y la concentración de las proteínas totales.

Las semillas de ambos años de cosecha (2008 y 2018) presentaron una tendencia a la disminución de los niveles de proteínas totales y la CdG en el mes 18 durante el almacenamiento *in situ*.

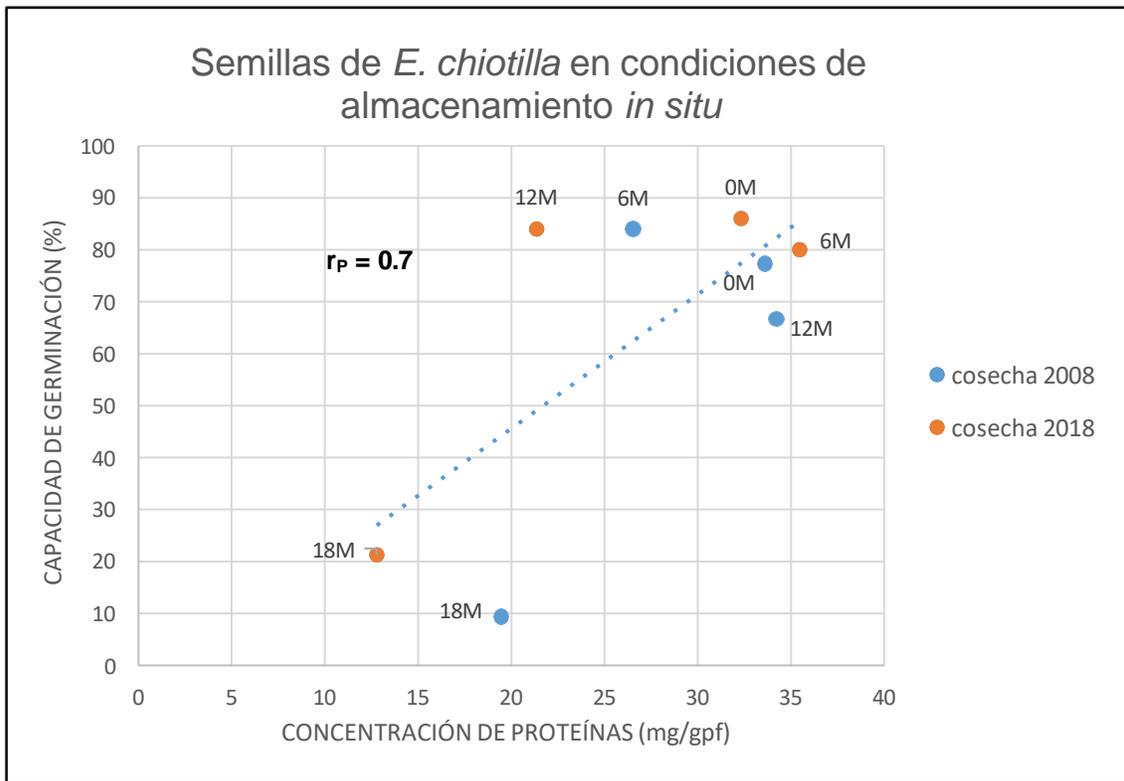


**Figura 13.** Correlación entre los promedios de la capacidad de germinación ( $n=3$ ) y los promedios de la concentración de proteínas totales ( $n=2$ ) de las semillas de *E. chiotilla* del año de cosecha 2008 almacenadas *in situ* durante 0, 6, 12 y 18 meses;  $r_p$  = coeficiente de correlación de Pearson con una significancia del 0.05.



**Figura 14.** Correlación entre los promedios de la capacidad de germinación (n=3) y los promedios de la concentración de proteínas totales (n=2) de las semillas de *E. chiotilla* del año de cosecha 2018 almacenadas *in situ* durante 0, 6, 12 y 18 meses;  $r_p$  = coeficiente de correlación de Pearson con una significancia del 0.05.

Se encontró una asociación lineal estadísticamente significativa, moderada y directamente proporcional entre la capacidad de germinación y la concentración de proteínas totales de las semillas de *E. chiotilla* almacenadas *in situ* de las cosechas 2008 y 2018 ( $r_p = 0.7$ ,  $p < 0.05$ ; Figura 15).



**Figura 15.** Correlación entre los promedios de la capacidad de germinación ( $n=3$ ) y los promedios de la concentración de proteínas totales ( $n=2$ ) de las semillas de *E. chiotilla* de los años de cosecha 2008 y 2018 almacenadas *in situ*. 0m, 0 meses de almacenamiento; 6M, 6 meses de almacenamiento; 12M, 12 meses de almacenamiento; 18M, 18 meses de almacenamiento;  $r_P = 0.7$  = coeficiente de correlación de Pearson con una significancia del 0.05.

## 7.5. Secuencias y análisis filogenético de los genes LEA reportados para especies de la familia Cactaceae

**NOTA.** Las secuencias nucleotídicas de los genes LEA de las especies de cactáceas que fueron empleadas y analizadas en el presente estudio, se obtuvieron a partir de la información reportada en la literatura. Debido a los motivos de la pandemia, anteriormente explicados, no se presentan las secuencias nucleotídicas para *E. chiotilla*.

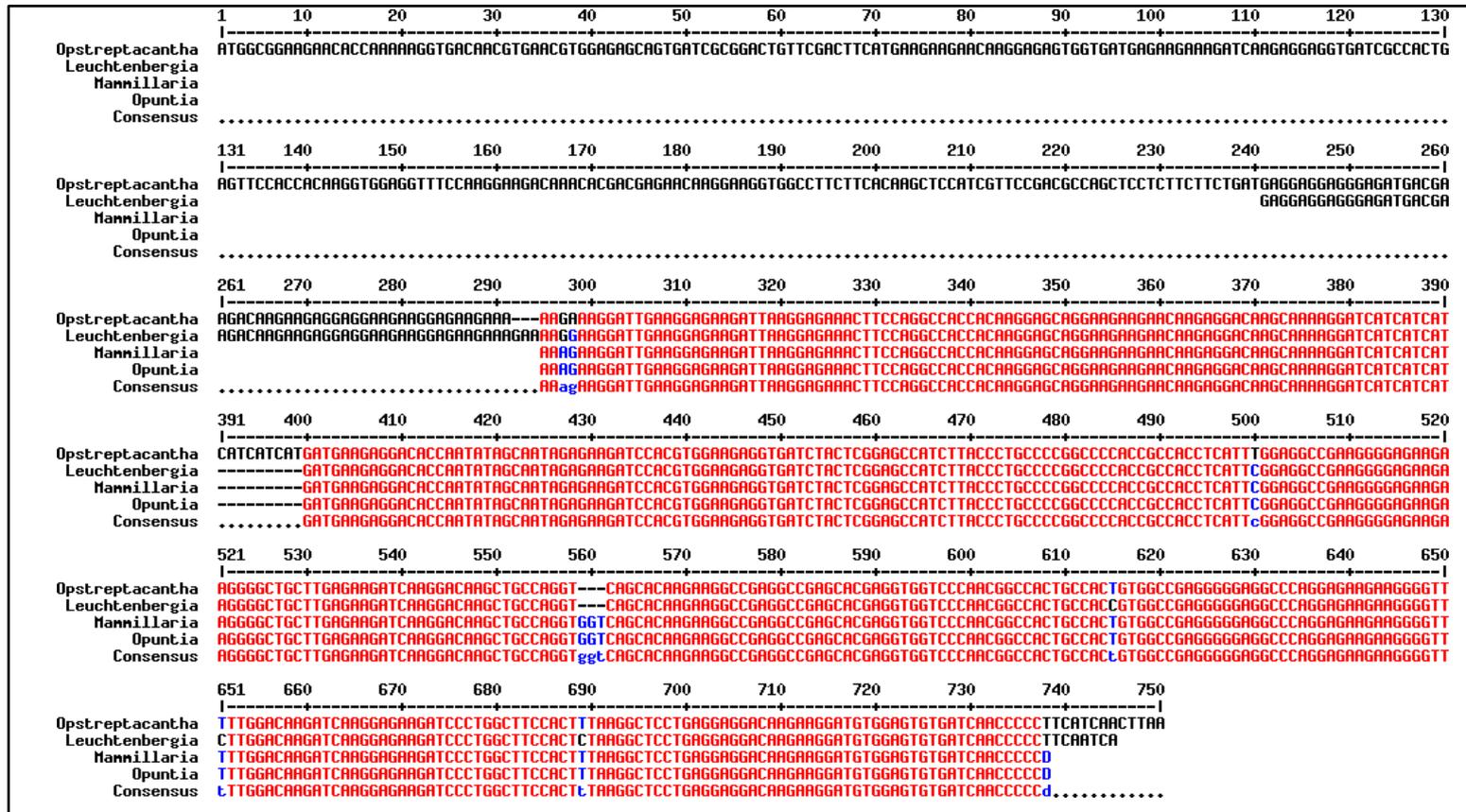
Son pocos los estudios de caracterización y participación de los genes y proteínas LEA en cactáceas. En este sentido, Silva Ortega (2008), Ochoa Alfaro (2011) y Hernández-Camacho (2016) aislaron y caracterizaron genes LEA en plántulas de diferentes especies de cactáceas (*Opuntia streptacantha*, *Leuchtenbergia principis*, *Mammillaria bombycina* y *Opuntia ficus-indica*). Como se mencionó en el apartado de Material y Métodos, se realizaron alineamientos nucleotídicos y se obtuvo la secuencia consenso (Figura 16).

Entre las cuatro especies de cactáceas se identificaron secuencias conservadas. A partir del nucleótido 295 y hasta el 737 (letras rojas, Figura 16), los nucleótidos son compartidos entre las cuatro especies, lo cual indica regiones conservadas de los genes LEA.

Posteriormente, a partir de la secuencia consenso, se realizó una búsqueda de genes mediante el programa BLAST®. El rango de porcentaje de identidad entre las especies de cactáceas *Leuchtenbergia principis*, *Opuntia streptacantha*, *Mammillaria bombycina*

y *Opuntia ficus-indica* fue entre 94.02 y 98.67% de identidad (Cuadro 4). *L. principis* presenta una mayor relación de identidad (98.67%) con respecto a *O. streptacantha*, *M. bombycina* y *O. ficus-indica*, el programa BLAST la ubicó como ancestro común en el árbol filogenético (Figura 17), mientras que *Opuntia ficus-indica* mostró un menor grado de similitud con respecto a las otras especies de cactáceas y es identificada como el taxón actual. Cabe resaltar que el programa BLAST identificó una especie externa (*Suaeda salsa* (L.) Pall.) al grupo de estudio con un porcentaje de identidad <90.41% con respecto a los cuatro taxa de cactáceas (Cuadro 4).

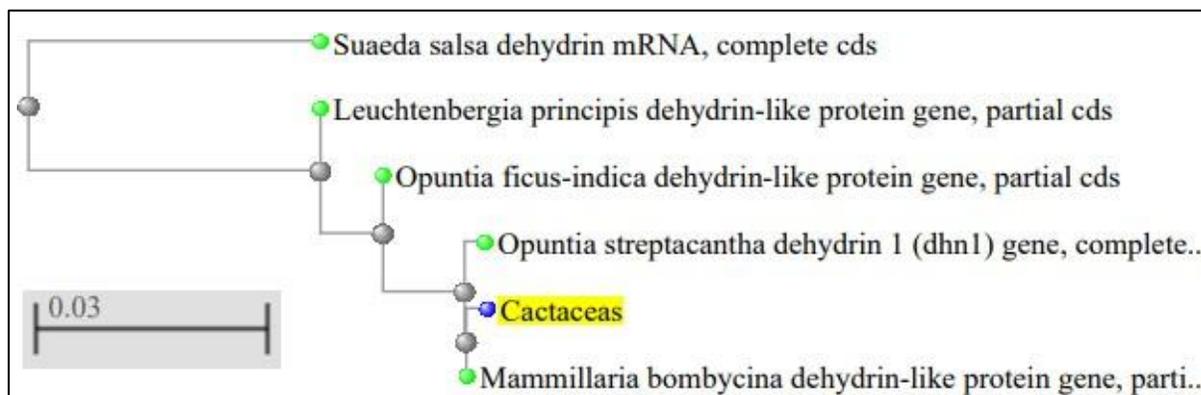
Algunos autores clasifican a *Suaeda salsa* dentro de la Familia Amaranthaceae, y otros dentro de la Familia Chenopodiaceae. Es una hierba halofítica de hojas suculentas con alta tolerancia a la salinidad. Las especies halófitas pueden diluir la sal dentro de sus hojas suculentas o tallos, lo cual permite la alta tolerancia a ese tipo de estrés (Song y Wang, 2015).



**Figura 16.** Alineamientos nucleotídicos de genes LEA de cuatro especies de cactáceas, *Opuntia streptacantha*, *Leuchtenbergia principis*, *Mammillaria bombycina*, *Opuntia ficus-indica*. **LETRAS ROJAS**, nucleótidos que comparten todas las especies; **LETRAS AZULES**, 1 o 2 nucleótidos que comparten algunas especies; **LETRAS NEGRAS**, nucleótidos presentes en 1 o 2 especies (Generado mediante el programa MultAlin).

**Cuadro 4.** Porcentajes de identidad entre las secuencias nucleotídicas de cuatro especies de cactáceas (*Opuntia streptacantha*, *Leuchtenbergia principis*, *Mammillaria bombycina*, *Opuntia ficus-indica*) y *Suaeda salsa*. Generados mediante el programa BLAST.

DESCRIPCIÓN	% IDENTIDAD	NÚMERO DE ACCESO
<i>Leuchtenbergia principis</i> dehydrin-like protein gene, partial cds	98.67	KP720562.1
<i>Mammillaria bombycina</i> dehydrin-like protein gene, partial cds	98.67	KP720560.1
<i>Opuntia streptacantha</i> dehydrin 1 (dhn1) gene, complete cds	94.44	HM581971.1
<i>Opuntia ficus-indica</i> dehydrin-like protein gene, partial cds	94.02	KP720561.1
<i>Suaeda salsa</i> dehydrin mRNA, complete cds	90.41	KC013239.1



**Figura 17.** Árbol filogenético generado por el programa CLUSTAL Omega (CLUSTER Aligning W) mediante del programa bioinformático BLAST de cuatro especies de cactáceas (*Opuntia streptacantha*, *Leuchtenbergia principis*, *Mammillaria bombycina*, *Opuntia ficus-indica*) mostrando el parentesco entre ellas y comparando con una especie externa más relacionada (*Suaeda salsa*) a partir de las secuencias de nucleótidos.

## 7.6. Proteínas y moléculas implicadas en procesos de viabilidad y longevidad en semillas de cactáceas y familias relacionadas

Durante la fase de maduración de la semilla, se activan mecanismos para prevenir y reparar el daño generado durante la desecación, ya que estas dependen de la capacidad para reparar las moléculas dañadas durante la imbibición, como la reparación de las proteínas dañadas cuando el metabolismo es reactivado (Chatelain *et al.*, 2013). La participación de diversas biomoléculas en mecanismos de reparación o protección, como proteínas LEA, HSP, proteínas de unión a ARN que conservan el ARN mensajero en las semillas secas y azúcares no reductores (sacarosa y oligosacáridos) que previenen la desnaturalización de las proteínas, protegen a las membranas y participan en la formación de un estado vítreo (Zinsmeister *et al.*, 2020).

Los estudios sobre viabilidad y longevidad de semillas han sido realizados, en su mayoría, sobre especies de las Familias Brassicaceae, Fabaceae y Poaceae.

Ogé y colaboradores (2008) reportan la actividad de la proteína L-Isoaspartil Metiltransferasa (PIMT) en semillas de *Arabidopsis* involucrada en la longevidad de las semillas, la cual es una enzima reparadora cuya función es limitar el daño inducido por la acumulación de residuos anormales de isoaspartilo (isoAsp) como resultado de la degradación de asparaginil (Asn) y residuos de aspartilo (Asp). Wei y colaboradores (2015) aislaron 2 genes de PIMT en arroz (*Oryza sativa* L.) a los cuales denominaron OsPIMT1 y OsPIMT2, que se expresan de forma similar bajo condiciones de estrés oxidante, por salinidad y frío.

Rajjou y colaboradores (2008) sugieren que los cambios en la regulación de la síntesis de las proteínas, las modificaciones postraduccionales y el recambio de proteínas son

determinantes para el mantenimiento de la semilla. Se ha identificado la presencia de la proteína RAB18 (proteínas que participa en la respuesta a ABA18), una dehidrina que pertenece a la familia de las proteínas LEA, al analizar el proteoma de semillas de *Arabidopsis*. La alta expresión de RAB18 en semillas maduras podría relacionarse con la adquisición de la tolerancia a la desecación y la tolerancia al estrés. El aumento de la oxidación de las proteínas, debido principalmente a las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), podría inducir una pérdida de las propiedades funcionales de las enzimas y aumentar la susceptibilidad a la proteólisis, por lo que son importantes los sistemas antioxidantes.

Se ha sugerido que los procesos principales relacionados con el envejecimiento de la semilla son el estrés oxidante, la lipoperoxidación y la respiración. La lipoperoxidación y la respiración dan como resultado la generación de aldehídos reactivos, tales como malondialdehído (MDA) y acetaldehído, los cuales reaccionan con aminoácidos y proteínas. Los aldehídos intervienen en varias rutas metabólicas fundamentales de carbohidratos, vitaminas, esteroides, aminoácidos y lípidos, y son generados en respuesta al estrés por salinidad, deshidratación, frío y cambios en la temperatura, alterando el metabolismo. En semillas de arroz (*O. sativa*), el aldehído deshidrogenasa7 (OsALDH7) es importante para el mantenimiento de la viabilidad, ya que reduce la formación de MDA generados por el estrés oxidante durante la deshidratación y la lipoperoxidación (Shin *et al.*, 2009).

Wu y colaboradores (2011) también demostraron que en semillas de maíz (*Z. mays*) con altos niveles de viabilidad, existen bajas concentraciones de MDA, por lo que sugieren que la pérdida de la viabilidad podría relacionarse con la lipoperoxidación, relacionando también la presencia de la proteína LEA del tipo dehidrina EMB564.

Destacan la importancia de diversas biomoléculas que participan en la viabilidad de las semillas, como: las HSP, las cuales se adhieren a las proteínas desnaturalizadas y estabilizan su conformación, debido a que interactúan con otras proteínas (función de chaperonas); y las enzimas antioxidantes glioxalasa, tioredoxina peroxidasa, superóxido dismutasa y glutatión S-transferasa, que protegen a las células del daño oxidante.

Sathish y colaboradores (2015) identificaron la presencia de 16 proteínas involucradas en la viabilidad de las semillas de frijol (*V. mungo*) y las agruparon en ocho categorías de acuerdo con su función: estructura celular, destino y almacenamiento de proteínas, síntesis de proteínas, transportadores, transcripción, metabolismo, enfermedad/defensa, y poco claro o no caracterizado. La función de estas proteínas es importante para el mantenimiento de la integridad de la membrana celular durante el almacenamiento y mantenimiento de la viabilidad.

El envejecimiento de la semilla produce la pérdida de la viabilidad durante el almacenamiento y se ha relacionado con el daño del ADN causado principalmente por la presencia de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs). Existen vías de reparación que estabilizan el genoma y el proteoma de la semilla que desempeñan un papel en la mejora de la longevidad. Ha sido demostrada la importancia de las ADN ligasas en *Arabidopsis*, como la AtLIG4 (participando en la reparación del genoma durante la imbibición) y AtLIG6 (la cual codifica una proteína con una estructura de dominio exclusiva de las especies vegetales), reparando el daño del ADN en semillas bajo estrés, extendiendo así su longevidad (Waterworth *et al.*, 2010).

La reparación de los residuos de aspartato/asparagina en las proteínas es necesaria para la longevidad de las semillas. Se ha sugerido que la enzima Metionina Sulfóxido

Reductasa (MSR), la cual repara la Metionina Sulfóxido, contribuye a la longevidad de la semilla. Empleando semillas de *M. truncatula* y *Arabidopsis*, se identificaron y analizaron las secuencias de MSR (Chatelain *et al.*, 2013).

Los estudios sobre las biomoléculas que participan en la viabilidad de semillas aún son escasos, especialmente dentro de la Familia Cactaceae; la viabilidad está relacionada principalmente con las condiciones de almacenamiento y los diferentes tipos de estrés a los que estas puedan estar sometidas. La relación que guardan las semillas de las especies anteriormente mencionadas con la especie de estudio es su alta tolerancia a la desecación (semillas ortodoxas), por lo que se infiere que dichos procesos, así como la participación de estas biomoléculas, también intervengan en la viabilidad y longevidad de las semillas de *E. chiotilla*.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Viabilidad de las semillas de *Escontria chiotilla*

#### 8.1.1. Almacenamiento *ex situ*

Las semillas de *E. chiotilla* almacenadas en condiciones *ex situ* durante 0 y 10 años (cosechas 2018 y 2008, respectivamente) mantuvieron porcentajes de germinación elevados, semejante a lo reportado por Guzmán-Hernández (2018), quien indica que la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla* es elevada (>85% de germinación) en almacenamiento *ex situ* durante, al menos, 8 años. Guillén Trujillo y colaboradores (2014) indican que el tiempo de almacenamiento *ex situ* podría no afectar la viabilidad de las semillas de *Ferocactus townsendianus* Britton & Rose (Cactaceae) cuando son almacenadas en condiciones de laboratorio a temperatura ambiente, obteniendo germinaciones del 74% para semillas con 10 años de almacenamiento. Nobel (1988) indica que la temperatura favorable para mantener la viabilidad es entre 17 y 34°C con un valor óptimo de 25°C reportado para 19 especies de cactáceas como *Cereus peruvianus* (L.) Mill., *Echinocactus grusonii* Hildm., *Mammillaria zeilmanniana* Boed., *Opuntia phaeacantha* Engelm., *Stenocereus thurberi* (Engelm.) Buxb. y en Agavaceae, *Agave deserti* Engelm.

Aunque los porcentajes registrados de Capacidad de Germinación (CdG) de semillas de *E. chiotilla* fueron elevados (> 75%) para ambos años de cosecha (2008 y 2018), existieron diferencias estadísticamente significativas en el almacenamiento *ex situ* indicando rangos variables de porcentajes de CdG para las semillas de la cosecha 2018. Dichas diferencias de los datos de CdG entre cosechas pudieron deberse a la cantidad de lotes de germinación y semillas empleadas para el registro de los datos;

es decir, es probable que los rangos de los valores de los porcentajes de CdG de las semillas se redujeran para cada año de cosecha si se aumentara el número de repeticiones.

Estudios en semillas de cactáceas han demostrado que la edad genera una respuesta germinativa muy variable; para algunas especies como *Ferocactus wislizeni* (Engelm.) Britton & Rose, *Opuntia* spp., *Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Riccob., *S. queretaroensis* (F.A.C. Weber ex Mathes.) Buxb. y *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Backeb.) Glass & R.A. Foster, los porcentajes de germinación incrementan conforme aumenta la longevidad (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000; Flores *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2014), La información sobre las condiciones de almacenamiento en las que se mantuvieron las semillas de dichas especies no es mencionada por los autores, pero esta información podría compararse con las semillas de *E. chiotilla* en donde los niveles de viabilidad son altos bajo condiciones de almacenamiento *ex situ*, aún después de 10 años. Es decir, es posible que la longevidad potencial esté determinada por las condiciones controladas de humedad, temperatura y luz, que favorecen al mantenimiento de la viabilidad durante largos periodos de tiempo.

El Tiempo Medio de Germinación (TMG), es decir, los días transcurridos y la cantidad de semillas germinadas por día, varió para cada año de cosecha, como se mostró en el Cuadro 3, lo cual podría indicar que el tiempo de almacenamiento *ex situ* afecta la velocidad en la que germinan las semillas de *E. chiotilla* por día, ya que las semillas de reciente cosecha (2018) tardaron menos días en germinar, aún después de los 18 meses de almacenamiento, en comparación con las de 10 años de almacenamiento (2008). Es importante resaltar que dichos resultados podrían deberse al número de repeticiones de las germinaciones (3 lotes de 50 semillas).

Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes (2000) indican que la mayoría de las semillas de cactáceas presentan un comportamiento del tipo ortodoxo; es decir, las semillas mantienen la viabilidad por varios años en condiciones controladas de almacenamiento (*ex situ*), aunque esto también depende de factores como la temperatura, estado de madurez o, incluso, de las infecciones por hongos o bacterias.

Se ha reportado que en las semillas de cactáceas almacenadas bajo condiciones de laboratorio (conservación *ex situ*) la pérdida de la viabilidad puede variar entre las diferentes especies; mientras que en algunas la viabilidad disminuye en un año, otras pueden mantenerla por más de 5 años (Cuadro 5; Vázquez-Yanes y Toledo, 1989; Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000; Rojas-Aréchiga y Batis, 2001). Por ejemplo, Navarro y colaboradores (2014) reportaron que las semillas de *Echinocactus platyacanthus* forma *grandis* (Rose) Bravo pueden ser almacenadas hasta por seis años, similar a lo obtenido en el presente trabajo donde se observa que la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla* es elevada en condiciones de almacenamiento *ex situ* por más de 10 años.

**Cuadro 5.** Longevidad reportada por diferentes autores para semillas de especies de cactáceas almacenadas en condiciones *ex situ* (obtenido de Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

AUTOR	CACTÁCEA	LONGEVIDAD (años)
Zimmer (1970)	<i>Haageocereus turbidus</i> Rauh & Backeb, <i>Oreocereus erectocylindrica</i> (Rauh & Backeb.)	4 años después de ser enterradas
Alcorn & Martin (1974)	<i>Carnegiea gigantea</i> (Engelm.) Britton & Rose	10 años (en laboratorio)
Zimmer & Schultz (1975)	<i>Oreocereus erectocylindrica</i>	3
	<i>Eulychnia castanea</i> Phil.	4
Fearn (1977)	<i>Coryphantha odorata</i> Boed.	7
	<i>Ferocactus herrerae</i> J.G.Ortega, <i>F. emoryi</i> (Engelm.) Orcutt	10
	Especies del género <i>Brasilicactus</i>	< 4
Del Castillo (1986)	<i>Ferocactus histrix</i> (DC.) G.E.Linds.	2
	<i>Melocactus</i> sp.	> 5
	<i>Matucana</i> sp.	4 – 5
Anon (1997a,b,c)	<i>Parodia</i> sp.	Aproximadamente, 9

\* Las condiciones de preservación no son mencionadas por los autores.

En comparación con otras especies diferentes a las cactáceas, Singh y Richa (2016) reportan que las semillas de *Dendrocalamus hamiltonii* Nees & Arn. ex Munro (Poaceae) pierden la viabilidad después de los 12 meses de almacenamiento en

laboratorio, diferente a lo obtenido en los niveles de viabilidad para las semillas de *E. chiotilla* analizadas en el presente trabajo.

Las causas de la pérdida de la viabilidad de las semillas durante el almacenamiento son variables, y diversos estudios la relacionan con perturbaciones bioenergéticas, daño a los ácidos nucleicos, pérdida de vitaminas y hormonas, y el deterioro de las membranas (Singh y Richa, 2016).

La información sobre la viabilidad en semillas de *E. chiotilla* obtenida en este estudio, resaltan la importancia de las condiciones de almacenamiento *ex situ* para favorecer la viabilidad de las semillas y asegurar la conservación de esta especie de cactácea.

#### 8.1.2. Almacenamiento *in situ*

Las semillas de las cosechas 2008 y 2018 que fueron almacenadas en condiciones *in situ*, presentaron una tendencia a la reducción notable de la viabilidad en el mes 18 de almacenamiento, similar a lo reportado por Guzmán-Hernández (2018), quien mostró que cuando las semillas de *E. chiotilla* son enterradas en el suelo enterradas en el suelo, mantienen la viabilidad durante más de un año, pero menos de dos, esto indica que existe un efecto de las condiciones ambientales en el almacenamiento que afecta la viabilidad. Se ha demostrado que los factores ambientales como la luz, la temperatura, la humedad del suelo y, en general la estacionalidad, afectan la germinación y la viabilidad de la semilla (Enríquez-Peña *et al.* 2004, Guillén Trujillo *et al.*, 2014). Como se ha mencionado, la viabilidad es diferente aún entre especies de cactáceas, como es el caso de semillas de *Ferocactus wislizeni*, las cuales germinaron en un 87.5 % después de haber estado enterradas durante 17 meses (Bowers, 2000).

Algunos estudios concluyen que los porcentajes de germinación de las semillas de algunas especies disminuyen cuando éstas son más longevas, como *Brasilicactus* spp., *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff., *Cleistocactus straussii* (Heese) Backeb., *Echinocereus reichenbachii* (Terscheck) J.N.Haage, *Escobaria tuberculosa* (Engelm.) Britton & Rose, *Ferocactus acanthodes* (Lem.) Britton & Rose, *Melocactus peruvianus* Vaupel, *Notocactus scopa* (Spreng.) Backeb., *Pseudolobivia kermesina* Krainz y *Samaipaticereus corroanus* Cárdenas (Navarro *et al.*, 2014), pero las condiciones de almacenamiento en las que se mantuvieron las semillas de dichas especies no son claras. Lo anterior coincide con lo encontrado en la CdG de las semillas de *E. chiotilla*; la viabilidad de las semillas almacenadas en condiciones *in situ* disminuye a partir de los 12 meses, probablemente debido a las condiciones ambientales a las que fueron sometidas. Así se podría referir a la longevidad ecológica cuando los niveles de viabilidad de las semillas disminuyen en las diferentes especies de cactáceas, como en *E. chiotilla*, debido a los cambios en la temperatura y las condiciones de humedad por los factores ambientales.

Existen diversas razones por las cuales las semillas pierden la viabilidad en el suelo, una de ellas son las características propias de cada semilla. Vázquez-Yanes y colaboradores (1997) indicaron que la germinación en el suelo puede depender de diversos factores como las características morfofisiológicas propias de las semillas de cada especie (permeabilidad de las cubiertas, composición química de las reservas, tamaño de la semilla y contenido de humedad), las condiciones ambientales (humedad del suelo y la temperatura), así como la estacionalidad durante la producción de flores y frutos de la planta madre. Por otro lado, Romo-Campos y colaboradores (2010) asociaron la dureza de la testa con una baja germinación en

especies del género *Opuntia* (Cactaceae), lo que podría estar relacionado con un tipo de estrategia germinativa para asegurar la protección del embrión y así lograr su establecimiento. Mientras que Bowers y Pearson (2001) compararon el tamaño de las semillas de *Carnegiea gigantea* (Engelm.) Britton & Rose (1.5 mm, 1.3 mg) y *Ferocactus wislizeni* (2.4 mm, 3 mg) (Cactaceae), y sugieren que el tamaño más grande, en las semillas de la primera especie puede conferir mayor tolerancia a la sequía ya que podría permitirles almacenar una mayor cantidad de humedad. Por el contrario, aunque son pocos los estudios sobre semillas de *E. chiotilla*, Sánchez y colaboradores (2015) señalan que el tamaño pequeño de las semillas en especies de ambientes áridos permite a las especies una mejor dispersión y garantiza una rápida germinación. En general, las especies que producen semillas pequeñas, como las semillas de *Stenocereus queretaroensis* (F.A.C. Weber ex Mathes.) Buxb. de 2.6 mm y las de *Astrophytum myriostigma* Lem. de 2.9 mm, aproximadamente, se distribuyen en hábitats soleados y secos (De la Barrera, 1997; Sánchez-Salas *et al.*, 2015).

La capacidad de la semilla de mantener la viabilidad y la longevidad puede depender de las características propias de la semilla (contenido de agua, la presencia de algunos compuestos de la cubierta de la semilla que limitan la difusión del oxígeno al embrión, proteínas de estrés como las HSP, proteínas LEA y las proteínas de unión al ARN); éstas difieren entre especies (Castellón, 2008; Zensmeister *et al.*, 2020).

Priestley (1986) indica que en climas húmedos donde las semillas absorben y pierden agua, la persistencia en el suelo depende de los mecanismos de reparación, así como lo reportado por González-Zertuche y colaboradores (2001) quienes asocian una intensa síntesis proteica en semillas enterradas de *Wigandia urens* (Ruíz & Pavón) H. B. K. (Hydrophyllaceae) asociados a factores de luz y temperatura.

La presencia de las EROs también es un factor relacionado con el deterioro a nivel celular durante el almacenamiento de las semillas (Bailly y Kranner, 2011), particularmente en el deterioro de las membranas; en las semillas, las EROs se asocian con el envejecimiento y la pérdida de la viabilidad a causa de la lipoperoxidación, como consecuencia de una mayor cantidad de radicales libres de oxígeno (Hendry, 1993; Wu *et al.*, 2011; Zensmeister *et al.*, 2020). Los daños producidos por EROs pueden ser revertidos durante el metabolismo pre-germinativo durante la reparación y síntesis *de novo* de ácidos nucleicos y proteínas (Castellión, 2008). En el presente trabajo no se realizaron estudios de EROs, pero se sugiere la necesidad de estudiar estas biomoléculas para conocer su efecto en la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla* en almacenamiento *in situ* y *ex situ*.

## 8.2. Efecto de la temperatura y la precipitación pluvial en la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla*

Las semillas más longevas (cosecha 2008), así como las semillas de cosecha reciente (2018), registraron una notable disminución en la viabilidad durante el almacenamiento *in situ*. Durante el mes 6 y 12 de almacenamiento *in situ*, se presenta la primera temporada de secas y un aumento en la temperatura máxima extrema (>35°C), lo que probablemente afectó su viabilidad tanto a las semillas más longevas (cosecha 2008) como a las semillas de cosecha reciente (2018), ya que se registra una notable disminución en la viabilidad. Considero que la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla* disminuye cuando estas son almacenadas *in situ*, independientemente del tiempo de almacenamiento *ex situ* (0 y 10 años).

La viabilidad y longevidad de las semillas están relacionadas principalmente con la temperatura y el contenido de humedad. Hudson y Dale (1980) indican que las condiciones de almacenamiento que mantienen la viabilidad de las semillas son aquellas que reducen la actividad metabólica sin dañar al embrión como una reducción en el contenido de humedad de la semilla.

Mondoni y colaboradores (2014) indican que la influencia materna transmitida genéticamente permite que las plantas que se desarrollan en ambientes cálidos produzcan semillas de vida más larga debido a que estas tienen que soportar condiciones más difíciles para mantener la viabilidad después de la dispersión en comparación con las plantas que crecen en ambientes más fríos. Las semillas de cactáceas responden de forma diferente ante los cambios de temperatura y humedad dependiendo de cada especie. Por ejemplo, De la Barrera (1997) indica que en *Stenocereus queretaroensis*, la germinación aumenta cuando las semillas son expuestas a un bajo potencial hídrico (0 y -0.01 MPa) y a temperaturas entre 15 y 25°C; así como lo reportado por Bauk y colaboradores (2015) en semillas de *Gymnocalycium monvillei* (Lem.) Pfeiff. ex Britton & Rose, donde la germinación también es mayor cuando existe bajo potencial hídrico (0 y -0.2 MPa) y una temperatura de 25°C.

Ruíz y colaboradores (2015) indican que el periodo de cosecha de jiotillas se realiza aproximadamente después de 12 semanas del periodo de floración (antesis), es decir, entre mayo y junio, que es el periodo que coincide con el inicio de la temporada de lluvias y durante el cual se registran temperaturas medias mensuales alrededor de 21 y 23°C durante los años 2008, 2018 y 2019, lo que indicaría una mayor cantidad de humedad para el banco de semillas. Es posible que la mayor disponibilidad de agua

debido a las temporadas donde se presentaron más lluvias afecte el estado metabólico de las semillas ocasionando que estas reactiven el metabolismo durante la imbibición y, nuevamente, se reduzca al no existir las condiciones favorables para germinar. Los periodos de imbibición podrían reflejar un decremento en la viabilidad de las semillas. La temporada de lluvias en verano, debido al tipo de clima presente en la zona de estudio (cálido y templado con lluvias en verano), pudo tener un efecto negativo en la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla*, provocando una disminución notable en los niveles de CdG en el mes 18 de almacenamiento *in situ*.

Se sugiere que en la familia Cactaceae la germinación de las semillas está más asociada a la heterogeneidad ambiental que a aspectos relacionados con la filogenia (Navarro *et al.*, 2014). Debido a esto, son diversos los factores que podrían estar asociados con la viabilidad de las semillas cuando éstas son almacenadas *in situ*.

### 8.3. Proteínas totales y su relación con la viabilidad en semillas de *E. chiotilla*

Los niveles de proteínas totales de las semillas de *E. chiotilla* de los años de cosecha 2008 y 2018 disminuyen durante el almacenamiento *in situ*. El contenido de proteínas totales disminuye con el tiempo; se registraron los niveles más bajos a los 18 meses de almacenamiento.

Existen estudios en los que se reporta que el deterioro de las semillas está relacionado con algunas proteínas. Rajjou y colaboradores (2008) mencionan que en semillas de *Arabidopsis* la abundancia de algunas proteínas son variables dependiendo del nivel de deterioro en el que se encuentra la semilla; por ejemplo, observaron que disminuye la abundancia de la cadena de tubulinas  $\beta 2$   $\beta 3$ , la dehidrina RAB18 y

fosfoglucomutasas en semillas maduras deshidratadas. También se ha sugerido que la respiración podría ser la causa principal de la descomposición de los carbohidratos, grasas y proteínas (Kugbei, 2019).

Por otra parte, López-Urrutia y colaboradores (2014) indican que los contenidos de las proteínas totales de semillas de cactáceas pueden variar según la especie bajo tratamientos de hidratación-deshidratación, ya que en semillas de *Ferocactus peninsulae* (A.A. Weber) Britton & Rose, la expresión de proteínas totales fue más alto en comparación a las semillas de *Pachycereus* ssp. después de un tratamiento de hidratación-deshidratación.

Algunos factores, como el almacenamiento prolongado y el estrés ambiental, pueden producir un deterioro en las semillas. Rajjou y colaboradores (2008) indican que el almacenamiento prolongado de las semillas conlleva a un estrés oxidante y que, posiblemente, un incremento en la oxidación de las proteínas provocaría una pérdida en sus propiedades funcionales. Mientras que Kugbei (2019) indica que las condiciones ambientales podrían hacer más susceptibles a las semillas al deterioro debido, por ejemplo, a las altas temperaturas.

Es probable que las condiciones ambientales tengan un efecto a nivel proteómico en las semillas de *E. chiotilla* cuando son almacenadas *in situ* ya que la tendencia es a la disminución de los niveles de proteínas totales en este almacenamiento.

### 8.3.1. Correlación entre los niveles de proteínas totales y la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla* almacenadas en condiciones *in situ*

Los niveles de viabilidad y la concentración de las proteínas disminuyeron con el aumento del periodo de almacenamiento *in situ* para las semillas de ambos años de cosecha (2008 y 2018). Los niveles más bajos de viabilidad y proteínas totales se registraron para el mes 18 de almacenamiento *in situ*

Se ha sugerido la importancia de la presencia de la proteína EMB, que pertenece al grupo 1 de las proteínas LEA, participando en el mantenimiento de la viabilidad de las semillas durante la maduración y su almacenamiento, actuando como citoprotector debido a que es una proteína altamente hidrofílica y su estructura es desordenada (Wu *et al.*, 2011). En otras especies como el maíz, la proteína EMB564, que participa en la protección contra la desecación, podría tener un papel de biomarcador en la viabilidad de las semillas; en frijol, la PvLEA se acumula durante el desarrollo de la semilla, en respuesta al ABA, durante el déficit hídrico; en arroz, la aldehído 7-deshidrogenasa mantiene la viabilidad desintoxicando los aldehídos generados por la lipoperoxidación; y la actividad de la enzima L-isoaspartil metiltransferasa repara el daño de la proteínas dañadas contribuyendo al mantenimiento de la viabilidad y longevidad, así como la participación del grupo 2 de las proteínas LEA (DHN) relacionadas con los diferentes tipos de estrés en las semillas de *Arabidopsis* (Brassicaceae) (Ogé *et al.*, 2008; Rajjou *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2015).

#### 8.4. Alineamientos y análisis filogenético de secuencias nucleotídicas de genes LEA reportados para la familia Cactaceae

Como se ha mencionado, aún son pocos los estudios realizados sobre la identificación y la participación de las proteínas LEA en cactáceas. Hernández-Camacho y colaboradores (2017) identificaron secuencias homólogas de genes de tipo dehidrina en especies de cactáceas *Opuntia ficus-indica*, *Mammillaria bombycina* y *Leuchtenbergia principis*, los cuales comparten entre 96 – 97% de identidad con el gen del tipo dehidrina 1 de *Opuntia streptacantha* (OpsDHN1).

En el presente trabajo, las secuencias nucleotídicas de genes LEA reportadas por Hernández-Camacho (2016) fueron comparadas, y se obtuvo un porcentaje de similitud (>90%) con *Suaeda salsa* que, aunque no refleja relación cercana con la familia Cactaceae, pertenece al orden Caryophyllales.

Hernández-Camacho y colaboradores (2017) estudiaron la relación evolutiva de secuencias de genes parciales del grupo de las DHN (grupo 2 de las proteínas LEA) e identificaron que existen genes fuertemente relacionados con las especies de cactáceas, *Opuntia streptacantha*, *Leuchtenbergia principis*, *Mammillaria bombycina*, *Opuntia ficus-indica*; así como *Suaeda glauca* DHN (Amaranthaceae), *Atriplex halimus* L. DHN (Amaranthaceae), y *Tamarix hispida* Willd. DHN (Tamaricaceae), lo cual indica que el género *Suaeda* genéticamente, guarda una estrecha relación con la familia Cactaceae, como lo reflejan los datos obtenidos mediante el programa BLAST.

El grupo 2 de las proteínas LEA (DHN) ha sido el más estudiado. Battaglia y colaboradores (2008) analizaron la estructura de 4 proteínas LEA, del tipo DHN, presentes en diferentes especies (*Craterostigma plantagineum* Hochst.

(Linderniaceae), *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Leguminosae), *Glycine max* (L.) Merr. (Leguminosae) y *Arabidopsis*), e indicaron que estas proteínas se encuentran en una conformación en gran parte hidratada; ni la temperatura, ni las sales estabilizadoras promueven estructuras ordenadas; López-Urrutia y colaboradores (2014) reportan la presencia de un inhibidor de la alfa-amilasa que pertenece al grupo 2 de las proteínas LEA (LEA2\_PHAVU, inhibidor 2 de la alfa-amilasa) bajo tratamientos de hidratación-deshidratación.

Particularmente, la acumulación de las proteínas LEA se relaciona con la adquisición de la tolerancia a la desecación y pueden estar relacionadas con el estrés biótico y abiótico; pero cada grupo de proteínas LEA tiene diferente eficacia de protección sobre otras moléculas según diferentes niveles de déficit hídrico y la edad de maduración de la semillas. Se ha visto que proteínas del tipo dehidrina, como la sensible a ABA18 (RAB18), se degradan progresivamente bajo tratamientos de deterioro controlados (Rajjou *et al.*, 2008; Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011).

Aunque se podría sugerir que las diferentes concentraciones de proteínas a diferentes tiempos de almacenamiento para ambos años de colecta se deben a la presencia de diferentes grupos de proteínas LEA (Mercado Díaz de León, 2018), González-Zertuche y colaboradores (2001) señalan que los diversos factores del suelo, como la salinidad y la humedad, pueden ser importantes para determinar la expresión de las proteínas en las semillas enterradas. La separación de proteínas por peso molecular a través de análisis electroforéticos permitiría conocer los niveles de proteínas en las diferentes condiciones (*in situ* y *ex situ*) y tiempos de almacenamiento (0, 6, 12 y 18

meses), así como observar los cambios en el contenido de proteínas totales en las semillas.

Aunque todavía es escasa la información sobre proteínas en semillas de cactáceas, especialmente para *E. chiotilla*, los datos reportados por Silva Ortega (2008), Ochoa Alfaro (2011) y Hernández-Camacho (2016), permitieron analizar la relación entre las especies *L. principis*, *O. streptacantha*, *M. bombycina* y *O. ficus-indica* mediante secuencias conservadas y porcentajes de similitud (>98%) generados por el programa BLAST. Las secuencias conservadas obtenidas, sugieren una mayor probabilidad de encontrar genes que codifiquen proteínas LEA, así como otras proteínas que puedan estar participando en mantener la viabilidad de las semillas de *E. chiotilla*, debido a la estrecha relación que mantienen las especies que integran a la Familia Cactaceae.

Battaglia y colaboradores (2008) señalan que las proteínas LEA se encuentran presentes en diferentes grupos de plantas, desde Briofitas hasta Angiospermas, sometidas a diferentes tipos de estrés, sugiriendo que este grupo de proteínas es conservado, por lo tanto, hay una alta probabilidad de encontrarlas presentes en las proteínas totales extraídas de las semillas de *E. chiotilla*.

#### 8.5. Proteínas y moléculas implicadas en procesos de viabilidad y longevidad en semillas de cactáceas y familias relacionadas

Como se ha mencionado, las semillas pasan por diferentes etapas durante su desarrollo y pueden presentar deterioros a nivel celular, provocando una disminución o pérdida de la viabilidad, pero los procesos y biomoléculas que podrían intervenir son diversos.

Se ha sugerido que el daño en las proteínas y a las membranas por lipoperoxidación en las semillas ocasiona la pérdida de la viabilidad, siendo las causas principales del envejecimiento. Generalmente, las proteínas dañadas pueden ser reemplazadas a través de la síntesis *de novo*. Por el contrario, algunos organismos deben reparar las proteínas dañadas debido a que el proceso de síntesis es limitado por la baja actividad metabólica, en el caso de las semillas (Rajjou *et al.*, 2008; Sathish *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2015).

A través de diferentes estudios, se ha señalado que la participación de algunas proteínas podría afectar la viabilidad de las semillas. Por ejemplo, en arroz (*Oryza sativa*) y *Arabidopsis* la acumulación de isoAsp en semillas envejecidas o debido al estrés, afecta la viabilidad; la actividad de la enzima L-isoaspartil metiltransferasa1 (PIMT) repara el daño ocasionado por isoAsp. Mientras que, Dobiezz y Piotrowicz-Cieslak (2017) identificaron que en semillas de lupino (*Lupinus albus*), la presencia de conglutinas (proteínas de almacenamiento) podrían ser determinantes para la viabilidad (Ogé *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2015).

Por otra parte, se ha estudiado la participación de algunas proteínas que son importantes para mantener la viabilidad. En arroz, la proteína aldehído deshidrogenasa7 desintoxica los aldehídos generados por la lipoperoxidación (Shin *et al.*, 2009); en semillas de maíz, han sido identificadas enzimas antioxidantes (como la catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa) que protegen a las células del daño oxidante, así como la importancia de la expresión de las HSP en la protección de las semillas durante la etapa de deshidratación (Wu *et al.*, 2011); en el caso del frijol, se ha observado que existe menor síntesis de alfa globulina en semillas envejecidas (Sathish *et al.*, 2015).

La información de semillas de cactáceas sobre la participación de biomoléculas, diferentes a las DHN, en relación con la viabilidad aún es escasa. La mayoría de los estudios sobre viabilidad son sobre semillas pertenecientes a las Familias como Brassicaceae (*Arabidopsis*), Fabaceae (lupino, frijol) y Poaceae (arroz, maíz). Por el contrario, la relación de estas especies con la de *E. chiotilla* es la alta tolerancia a la desecación, es decir, son semillas del tipo ortodoxo. Los estudios relacionados con la pérdida de la viabilidad sugieren que la etapa de desecación de la semilla desencadena procesos que pueden ser perjudiciales para la semilla y reflejarse en la pérdida de la viabilidad y su envejecimiento. Es por tal motivo que, como se mencionó anteriormente, es importante realizar estudios a nivel molecular para identificar la participación de las biomoléculas en la viabilidad de semillas de *E. chiotilla*.

## 9. CONCLUSIONES

- Las condiciones de almacenamiento *ex situ* (condiciones de laboratorio; obscuridad,  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) mantuvieron los niveles de viabilidad elevados en las semillas de *Escontria chiotilla* por al menos 10 años, lo que favoreció su conservación. La viabilidad durante el almacenamiento *in situ* disminuyó al mes 18, por lo que se sugiere que las semillas de *E. chiotilla* forman bancos persistentes a corto plazo.
- Los factores ambientales, como la humedad y las variaciones en las temperaturas durante el almacenamiento *in situ*, tuvieron un efecto en la viabilidad de las semillas, independientemente de la edad (cosechas 2008, almacenadas *ex situ* por 10 años; y 2018, sin almacenamiento *ex situ*), ya que presentaron una tendencia a la disminución de la viabilidad en el tiempo.
- Los niveles de proteínas totales disminuyeron en semillas de *E. chiotilla* almacenadas *in situ*, en ambas cosechas (2008 y 2018), correlacionándolo con la disminución de la viabilidad.
- El alineamiento y análisis filogenético de las secuencias de genes LEA para cactáceas reportados en la literatura demostró que las secuencias nucleotídicas son altamente conservadas en la familia y que existe una especie externa (*Suaeda salsa*), lo que sugiere que es necesario realizar estudios de expresión génica en *E. chiotilla* para conocer su relación con miembros de la familia.

- Los factores que intervienen en la viabilidad de las semillas son variables y dependen de las condiciones de almacenamiento *ex situ* (temperatura y humedad controladas) o *in situ* (factores climáticos), así como de las características propias de la semilla en donde intervienen las diversas biomoléculas que dan protección y reparan el daño, principalmente, durante la etapa de desecación de la semilla.
  
- *Escontria chiotilla* (Cactaceae) es una especie endémica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán por lo que es importante realizar estudios sobre el funcionamiento y el papel que tienen las proteínas LEA y otras biomoléculas para continuar generando información sobre los procesos metabólicos que participan en el mantenimiento de la viabilidad de las semillas.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Barajas, B. y Trujillo Hernández, A. (2009). Asimilación de Na, K, P y N, en *Escontria chiotilla* (Weber ex Schum.) Rose (Cactaceae), durante sus estados fenológicos, en Venta Salada, Coxcatlán, Puebla. Sociedad Mexicana de Cactología A. C. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 54(1):4-16.
- Arellano, E. y Casas, A. (2003). Morphological variation and domestication of *Escontria chiotilla* (Cactaceae) under silvicultural management in the Tehuacan Valley, Central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50:439-453
- Arias, S., Gama-López, S., Guzmán-Cruz, L. U. y Vázquez-Benítez, B. (2012). Cactaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 95:1-235.
- Arias Toledo, A. A., Valverde Valdés, M. T. y Reyes Santiago, J. (2000). *Las Plantas de la Región de Zapotitlán Salinas, Puebla*. Instituto Nacional de Ecología Red para el Desarrollo Sostenible, A. C. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México. PP. 80.
- Bailly, C. y Kranner, I. (2011). Methods for analyses of reactive oxygen species and antioxidants in relation to seed longevity and germination. *Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 773:343-367.
- Bareke, T. (2018). Biology of seed development and germination physiology. *Advances in Plants and Agriculture Research*, 8(4):336-346.
- Baskin, C. C. y Baskin, J. M. (1998). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, E.U.A. PP. 666.

- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F. and Covarrubias, A. (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*, 148:6–24.
- Battaglia, M. y Covarrubias, A. A. (2013). Late embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Plant Genetics and Genomics*, 4(190):1-11.
- Bauk, K., Sánchez, R., Zeballos, S. R., Las Peñas, M. L., Flores, J. y Gurvich, D. E. (2015). Are seed mass and seedling size and shape related to altitude? Evidence in *Gymnocalycium monvillei* (Cactaceae). *Botany*, 93:529-533.
- Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E., Love, K., Goodman H., Dean, C., Bergkamp, R., Dirkse, W., Van Staveren, M., Stiekema, W. *et al.* (1998). Analysis of 19 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 391:485-488.
- Berjak, P. y Pammenter, N. W. (2010). Semillas ortodoxas y recalcitrantes. En Vozzo, J. O. (Ed), Manual de semillas de árboles tropicales. *Departamento de Agricultura de los Estados Unidos*, E.U.A. PP. 143-155.
- Bies-Ethève, N., Comella, P. G., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., Cooke, R. y Delseny, M. (2008). Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 67:107-124.
- Boudet, J., Buitink, J., Hoekstra, F. A., Rogniaux, H., Larré, C., Satour, P. y Leprince, O. (2006). Comparative Analysis of the Heat Stable Proteome of Radicles of *Medicago truncatula* Seeds during Germination Identifies Late Embryogenesis

- Abundant Proteins Associated with Desiccation Tolerance. American Society of Plant Biologists. *Plant Physiology*, 140:1418-1436.
- Bowers, J. E. (2000). Does *Ferocactus wislizeni* (Cactaceae) have a between year seed bank? *Journal of Arid Environments*, 45:197-205.
- Bowers, J. E. y Pierson, E. A. (2001) Implications of seed size for seedling survival in *Carnegiea gigantea* and *Ferocactus wislizeni* (cactaceae). *The Southwestern Naturalist*, 46:272-281.
- Bradford, M. M. (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. (1978). *Las Cactáceas de México*. Vol 1. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México. PP. 755.
- Brockington, S. F., Alexandre, R., Ramdial, J., Moore, M. J., Crawley, S., Dhingra, A., Hilu, K., Soltis, D. E. y Soltis P.S. (2009). Phylogeny of the Caryophyllales sensu lato: Revisiting hypotheses on pollination biology and perianth differentiation in the core Caryophyllales. *International Journal of Plant Sciences*, 170(5):627-643.
- Casas, A., Otero-Arnaiz, A., Pérez-Negrón, E. y Valiente-Banuet, A. (2007). *In situ* management and domestication of plants in Mesoamerica. *Annals of Botany*, 100:1101-1115.
- Castellón, M. L. (2008). Procesos de deterioro y mecanismos de protección y reparación involucrados en la pérdida diferencial de la viabilidad durante el

almacenamiento en semillas de *Chenopodium quinoa* Willd (Tesis de Doctorado). Universidad de Buenos Aires, Argentina. PP. 118.

Chatelain, E., Hundertmark, M., Leprince, O., Le Gall, S., Satour, P., Deligny-Penninck, S., Rogniaux, H. y Buitink, J. (2012). Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. *Plant, Cell and Environment*, 35:1440-1455.

Chatelain, E., Satour, P., Laugier, E., L.y Vu, B., Payet, N., Rey, P. y Montrichard, F. (2013). Evidence for participation of the methionine sulfoxide reductase repair system in plant seed longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9):3633-3638.

CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). (2021). Coordinación General del Servicio Meteorológico Nacional, Proyecto de bases de datos climatológicos. Recuperado el 12 de febrero de 2021 de <https://smn.conagua.gob.mx/tools/RESOURCES/Mensuales/pue/00021083.TX>

## I

Cuénoud, P., Savolainen, V., Chatrou, L. W., Powell, M., Grayer, R. J. y Chase, M. W. (2002). Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *American Journal of Botany*, 89(1):132-144.

Cuevas-Velázquez, C. L. y Covarrubias-Robles, A. A. (2011). Las proteínas desordenadas y su función: una nueva forma de ver la estructura de las proteínas

y la respuesta de las plantas al estrés. TIP. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 14(2):97-105.

Dávila, P., Arizmendi, M. C., Valiente-Banuet, A., Villaseñor, J. L., Casas, A. y Lira, R. (2002). Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Biodiversity and Conservation*, 11:421- 442.

De la Barrera Montppellier, E. (1997). Adaptaciones reproductivas y fisiológicas a la aridez en cactáceas (Tesis de Licenciatura). Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México. PP. 67.

Delgado-Sánchez, P., Flores-Rivas, J. y Jiménez Bremont, J. F. (2019) ¿Cómo responden las plantas de nopal (*Opuntia streptacanta*) a los factores ambientales? Avances en el estudio de sus genes. En: *La biodiversidad en San Luis Potosí*. Estudio de Estado. Vol. II. CONABIO, México. PP. 126-128.

Díaz García, D. A. (2018). Transformación genética de Gloxinia (*Sinningia speciosa* Lodd.) con fragmentos de genes LEA tipo Dehidrina provenientes de cactáceas (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. PP. 83.

Díaz Pontones, D. M. y Corona Carrillo, J. I. (2018). Aspectos Moleculares del Desarrollo de las Angiospermas: Embriogénesis y origen de los Sistemas Tisulares. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. *Publicaciones, Ciencias Biológicas y de la Salud*. PP. 116.

Dobiesz, M, y Piotrowicz-Cieslak, A. I. (2017). Proteins in Relation to Vigor and Viability of White Lupin (*Lupinus albus* L.) Seed Stored for 26 Years. Universidad de Warmia y Mazury en Olsztyn, Poland. *Frontiers in Plant Science*, 1392(8):1-11.

- Dure, L. (1993). A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal*, 3(3):363-369.
- Ellis, R. H. y Roberts, E. H. (1981). The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Science and Technology*, 9(2):373-410.
- Enríquez-Peña, E. G., Suzán-Azpiri, H. y Malda-Barrera, G. (2004). Viabilidad y germinación de semillas de *Taxodium mucronatum* (Ten.) en el estado de Querétaro, México. *Agrociencia*, 38(3):375-381.
- Flores, E. M. (2010). Biología de las semillas. En Vozzo, J. O. (Ed), Manual de semillas de árboles tropicales. EUA. *Departamento de Agricultura de los Estados Unidos*. PP. 9-120.
- Flores, E. M. y Engleman, E. M. (1976). Apuntes sobre anatomía y morfología de las semillas de cactáceas. I. Desarrollo y estructura. *Revista de Biología Tropical*, 24:199-227.
- Flores, J., Arredondo, A. y E. Jurado. (2005). Comparative seed germination in species of *Turbinicarpus*: An endangered cacti genus. *Natural Areas Journal*, 25(2):183-187.
- Flores, J., Jurado, E., Chapa-Vargas, L., Ceroni-Stuve, A., Davila-Aranda, P., Galíndez, G., Gurvich, D., León-Lóbos, P., Ordoñez, C., Ortega-Báez, P., Ramírez-Bullón, N., Sandoval A., Seal, C. E., Ullian, T. y Pritchard, H. W. (2011). Seeds photoblastism and its relationship with some plant traits in 136 cacti taxa. *Environmental and Experimental Botany*, 71:79- 88.

- Franco-Martínez, I. S. (1995). Conservación *in-situ* y *ex-situ* de las agaváceas y nolináceas mexicanas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 57:27-36.
- García, E. (1998). Cartas de climas de México. Hoja Oaxaca y México, CONABIO, México.
- Godínez-Álvarez, H. (2017). Las plantas y los endófitos: cómo sobrevivir en las regiones áridas y semiáridas. *Elementos*, 105:39-43.
- González-Arno, M. T. y Engelmann, F. (2013). Introducción a la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales. En: *Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Costa Rica. PP. 25 – 35.
- González, H. O. (2013). Germinación y longevidad de semillas de genotipos de pitahaya (*Hylocereus* spp.) y pitaya (*Stenocereus* spp) (Tesis de Maestría). Colegio de Posgraduados. México. PP. 94.
- González Medrano, F. (2012). *Las zonas áridas y semiáridas de México y su vegetación*. México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. PP.194.
- González-Zertuche, L., Vazquez-Yanes, C. y Gamboa, A. (2001). Natural priming of *Wigandia urens* seeds during burial: effects on germination, growth and protein expression. *Seed Science Research*, 11:27-34.
- Google. (s.f.). Polígono del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Recuperado el 25 de febrero de 2021 de <https://earth.google.com/web/@18.19129365,-97.68250871,1724.38607395a,6715.65786751d,35y,0h,0t,0r>

- Grajales Muñiz, O. (2005). Unidad II, Proteínas. En: *Apuntes de bioquímica vegetal, Bases para su aplicación fisiológica*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México. PP. 33, 34.
- Guillén Trujillo, A., Espinoza, J. L., Ortega Pérez, R., Ávila Serrano, N. Y. y Palacios Espinosa, A. (2014). Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla en la germinación y sobrevivencia de *Ferocactus townsendianus* Britt & Rose. *Interciencia*, 39(10):732-735.
- Guzmán-Hernández, D. A. (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 de Maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, México. PP. 90.
- Hara, M., Fujinaga, M. y Kuboi, T. (2005). Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *Journal Experimental Botany*, 56(420):2695-2703.
- Hendry, G. A. F. (1993). Oxygen, free radical process and seed longevity. *Seed Science Research*, 3:141-153.
- Hendry, G. A. F., Thompson, K., Moss, C. J., Edwards, E. y Thorpe, P. C. (1994). Seed persistence: a correlation between seed longevity in the soil and *ortho*-dihydroxyphenol concentration. *Functional Ecology*, 8:658-664.
- Hernández, M. H. (2006). La vida en los desiertos mexicanos. Colección: La ciencia para todos 213. *Fondo de Cultura Económica*. México. PP. 188.
- Hernández-Camacho, S. (2016). Aislamiento y caracterización de un gen tipo dehidrina en cactáceas y estudio de su expresión en *Mammillaria bombycina*

(Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. PP. 169.

Hernández-Camacho, S., Pérez-Molphe-Balch, E., Alpuche-Solís, A. y Morales Domínguez, J. F. (2017). Identification and evolutionary relationships of partial gene sequences from dehydrin group in three species of cacti. *International Journal of Experimental Botany*, 86:151-162.

Hernández Sánchez, I. E. (2013). Interacción Dehidrina-Dehidrina: el caso de la OpsDHN1 de *Opuntia streptacantha* (Tesis de Maestría). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. México. PP. 29.

Hernández Sánchez, I. E., Maruri López, I., Ferrando, A., Carbonell, J., Graether, S. P. y Jiménez-Bremont, J. F. (2015). Nuclear localization of the dehydrin *OpsDHN1* is determined by histidine-rich motif. *Frontiers in Plant Science*, 6(702):1-8.

Hong-Bo, S., Zong-Suo, L. y Ming-An, S. (2005). LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45:131-135.

Hudson, H. y Dale, E. (1980). Propagación de Plantas: Principios y Prácticas. *Continental S.A.* México. PP. 794.

Hundertmark, M. e Hinch, D. K. (2008). LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9:118-140.

INAFED (Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal). (2010). Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México, Santiago Chuazumba.

Recuperado el 12 de febrero de 2021 en <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM20oaxaca/municipios/20459a.html>

Jordán, M. y Casaretto, J. (2006). Capítulo XVI, Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. En: Squeo, F.A. y Cardemil, L. (Ed.), *Fisiología Vegetal*. La Serena, Chile. Ediciones Universidad de La Serena. PP. 1-28.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A. y Stevens, P. F. (1999). *Plant Systematics, A Phylogenetic Approach*. (2 ed.). Sinauer Associates.

Kaur, H., Petla, B. P. y Majee, M. (2016). Chapter 1, Small heat shock proteins: Roles in development, desiccation tolerance and seed longevity. En: *Heat Shock Proteins and Plants*; Asea, A.A.A., Kaur, P. y Calderwood, S.K. (Eds). Springer International Publishing. PP. 3-18.

Kranner, I. y Birtic, S. (2005). A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 734-740.

Krishnan, H. B. y Coe, E. B., Jr. (2001). Seed storage proteins. En: *Encyclopedia of Genetics*; Science Direct: Amsterdam. PP. 1782-1787.

Kugbei, S. (2019). Materiales para capacitación en semillas, Módulo 6: Almacenamiento de semillas. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)*. Roma. PP. 102.

Leprince, O., Pellizzaro, A., Berriri, S. y Buitink, J. (2017). Late seed maturation: drying without dying. *Journal of Experimental Botany*, 68(4):827-841.

- Long, R. L., Gorecki, M. J., Renton, M., Scott, J. K., Colville, L., Goggin, D. E., Commander, L. E., Westcott, D. A., Cherry, H. y Finch-Savage, W. E. (2014). The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise. *Biological Reviews*, 90:31-59.
- López Bilbao, M. G. (1996). Estudio de la expresión génica durante la embriogénesis somática en *Saccharum officinarum* y su relación con el ácido abscísico y la sequía (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España. PP. 138.
- López-Gómez, R., Díaz-Pérez, J. C. y Flores-Martínez, G. (2000). Vegetative propagation of three species of cacti: pitaya (*Stenocereus griseus*), tunillo (*Stenocereus stellatus*) and jiotilla (*Escontria chiotilla*). *Afrociencia*, 34:363-367.
- López-Urrutia, E., Martínez-García, M., Monsalvo-Reyes, A., Salazar-Rojas, V., Montoya, R. y Campos, J. E. (2014). Differential RNA- and protein-expression profiles of cactus seeds capable of hydration memory. *Seed Science Research*, 24:91-99.
- Luna Morales, C. (2006). Clasificación y ordenación morfológica del fruto de variantes cultivadas de pitaya (*Stenocereus pruinosus*) (Otto) Buxb.) en la Mixteca Baja, México. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 12(2):245-250.
- Lustre Sánchez, H. y Manzanero Medina, G. I. (2012). Germinación y latencia comparativa de especies del género *Mammillaria* (Cactaceae) del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 57:4-15.
- Magnitskiy, S. V. y Plaza, G. A. (2007). Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales. *Agronomía Colombiana*, 25(1):96-103.

- Matilla, A. J. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. En: Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (Ed.) (2013), *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. España: McGRAW-HILL - Interamericana de España. PP. 537 – 558.
- McCarty, J. P. (2001). Ecological consequences of recent climate change. *Conservation Biology*, 15:320-331.
- McDonald, M. B. (1999). Seed Deterioration: Physiology Repair and Assessment. *Seed Science and Technology*, 27(1):177-237.
- Megías, M., Molist, P. y Pombal, M. A. (2018). Órganos vegetales, semilla. En: *Atlas de Histología Vegetal*. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. PP. 6.
- Méndez Ferreira, G. D., Covarrubias Robles, A. y Beltrán Peña, E. (2013). Procesos moleculares involucrados en la protección de las semillas a la desecación. *Biológicas*, 15(2):42-48.
- Mercado Díaz de León, L. (2018). Análisis de expresión de un gen tipo dehidrina en *Mammillaria bombycina*, inducido por fitohormonas (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Aguascalientes. PP. 90.
- Miernyk, J. A. y Hajduch, M. (2011). Seed proteomics. *Journal of Proteomics*, 74:389-400.
- Miguel-Talonia, C. M., Téllez-Valdés, O. y 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.

- Mondoni, A., Orsenigo, S., Doà, M., Balestrazzi, A., Probert, R. J., Hay, F. R., Petraglia, A. y Abeli, T. (2014). Environmentally induced transgenerational changes in seed longevity: maternal and genetic influence. *Annals of Botany*, 113:1257-1263.
- Montenegro, A. L., Ávila Parra Y., Mendivelso H.A. y Vargas O. (2006). Potencial del banco de semillas en la regeneración de la vegetación del humedal Jaboque, Bogotá, Colombia. *Ecología*, 28(2):285-306.
- Montiel, S. y Montaña, C. (2003). Seed bank dynamics of the desert cactus *Opuntia rastrera* in two habitats from the Chihuahuan Desert. *Plant Ecology*, 166:241-248.
- Muñoz Sánchez, M. T. (2015). *Manejo y mantenimiento de equipos de siembra y plantación*. España. 5ª edición. Elearning. PP. 422.
- Navarro, M., Tzompa, R. y González, E. (2014). Propagación de *Echinocactus platyacanthus*: efectos del sustrato, viabilidad y escarificación de semillas. *Zonas áridas*, 15(1):31-47.
- Nobel, P. S. (1988). *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. New York, Cambridge University Press. PP. 280.
- Nyffeler, R. y Eggli, U. (2010). A farewell to dated ideas and concepts: molecular phylogenetics and a revised suprageneric classification of the family Cactaceae. *Schumannia*, 6:109-149.
- Ochoa Alfaro, A. E. (2011). Caracterización funcional de una dehidrina SK3 aislada de una biblioteca de cDNA de *Opuntia streptacantha*. (Tesis de Doctorado). Instituto Potosino De Investigación Científica y Tecnológica, A.C., San Luis Potosí, México. PP. 154.

- Ogé, L., Bourdais, G., Bove, J., Collet, B., Godin, B., Granier, F., Boutin, J. P., Job, D., Jullien, M. y Grappin, P. (2008). Protein Repair L-Isoaspartyl Methyltransferase1 Is Involved in Both Seed Longevity and Germination Vigor in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20:3022-3037.
- Ohto, M., Stone, S. L. y Harada, J. J. (2007). Genetic control of seed development and seed mass. En: Bradford, K. J. y Nonogaki, H. (Eds.). *Seed development, dormancy and germination*. Blackwell Publishing PP.1-24.
- Oliveira Marinho, M. A., Souza, G., Felix, L. P. y De Carvalho, R. (2019). Comparative cytogenetics of the ACPT clade (Anacampserotaceae, Cactaceae, Portulacaceae, and Talinaceae): a very diverse group of the suborder Cactineae, Caryophyllales. *Protoplasma*, 256:805-814.
- Pezoa, A. (2001). *Capítulo 18: Estrategias de Conservación de la Diversidad Biológica*. En: Squeo, F. A., Arancio, G. y Gutiérrez, J. R. (Eds). *Libro Rojo de la Flora Nativa y de los Sitios Prioritarios para su Conservación: Región de Coquimbo*. Ediciones Universidad de La Serena, Chile. 18:273-280.
- Priestley, D. A. (1986). Seed aging. Implications for seed storage and persistence in the soil. *Comstock Associates*. PP. 304.
- Qiu, H., Zhang, L., Liu, C., He, L., Wang, A., Liu, H. L. y Zhu, J. B. (2014). Cloning and characterization of a novel dehydrin gene, SiDhn2, from *Saussurea involucrate* Kar. et Kir. *Plant Molecular Biology*, 84:707-718.
- Radhika, V. y Hari Rao, V. S. (2014). Computational approaches for the classification of seed storage proteins. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7):4246-4255.

- Rajjou, L., Lovigny, Y., Groot, S. P.C., Belghazi, M., Job, C. y Job, D. (2008). Proteome-Wide Characterization of Seed Aging in Arabidopsis: A Comparison between Artificial and Natural Aging Protocols. Francia. *Plant Physiology*, 148:620-641.
- Rangel-Fajardo, M. A., Córdova-Téllez, L. y Cárdenas-Soriano, E. (2014). Pérdida de tolerancia a la desecación durante la imbibición-germinación en semillas de maíz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(5):833-845.
- Roberts, B. E., Payne, P. I. and Osborne, D. J. (1973). Protein Synthesis and the Viability of Rye Grains. Agricultural Research Council Unit of Developmental Botany, U. K. *Biochemical Journal*, 131:275-286.
- Rojas-Aréchiga, M. y Batis, A. I. (2001). Las semillas de cactáceas.. ¿forman bancos en el suelo? *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 46(4):76-82.
- Rojas-Aréchiga, M. y Vázquez-Yanes, C. (2000). Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments*, 44:85-104.
- Romo-Campos, L., Flores-Flores, J. L., Flores, J. y Álvarez-Fuentes, G. (2010). Seed germination of *Opuntia* species from an aridity gradient in Central Mexico. *PACD*, 12:181-198.
- Ruíz Huerta, E. A., Guzmán, J. M., Zaldívar, C. P., Barbosa Martínez, C. y Ponce de León García, L. (2015). *Escontria chiotilla* (Cactaceae): fruit development, maturation and harvest index. *Fruits*, 70(4):201-212.

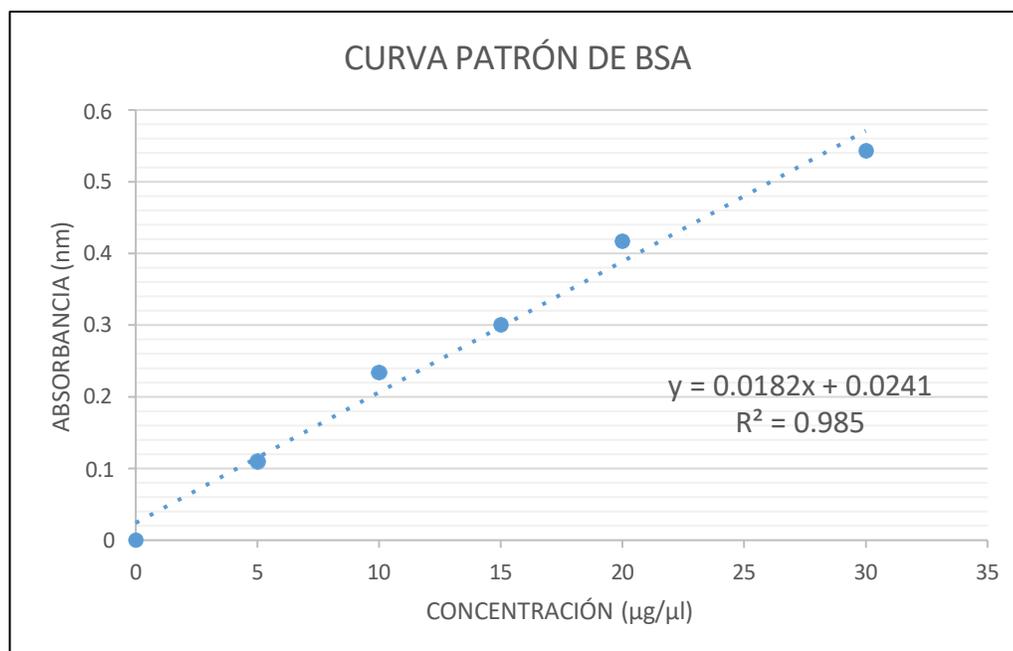
- Sánchez, J., Muro, G., Flores, J., Jurado, E. y Saenz-Mata, J. (2015). Los bancos de semillas y su germinación en ambientes semiáridos. *Ciencia UANL*, 18(73):70-76.
- Sánchez-Salas, J., Flores, J., Muro-Pérez, G., Arias-Montes, S. y Jurado, E. (2015). Morfometría de semillas en la cactácea amenazada de extinción *Astrophytum myriostigma* Lemaire. México. *Polibotánica*, 39:119-131.
- Sathish, S., Ahamed, R., Senthil, N., Arulkumar, N., Park, H. S., Kalaiselvi, S., Umarani, R., Raveendran, M., Bhaskaran, M. y Kim, G. S. (2015). Proteomic analysis of ageing in black gram (*Vigna mungo* L.) seeds and its relation to seed viability. *Plant Omics Journal*, 8(3): 201-211.
- Segura, J. (2008). Introducción al desarrollo, concepto de hormona vegetal. En Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (Ed.). (2013). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGRAW-HILL - Interamericana de España. PP. 351-376.
- Shin, J. H., Kim, S. y An, G. (2009). Rice Aldehyde Dehydrogenase7 Is Needed for Seed Maturation and Viability. University of Science and Technology, Republic of Korea. *Plant Physiology*, 149:905-915.
- Silva Ortega, C. O. (2008). Aislamiento e identificación de genes de *Opuntia streptacantha* inducidos en condiciones de estrés abiótico (Tesis Doctorado). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. San Luis Potosí, México.
- Singh, G. y Richa. (2016). Viability loss of *Dendrocalamus hamiltonii* seeds with storage associated with membrane phase behaviour and hormonal analysis. Research Article. *International Journal Life Sciences*, 4(4): 547 – 553.

- Song, J. y Wang, B. (2015). Using euhalophytes to understand salt tolerance and to develop saline agriculture: *Suaeda salsa* as a promising model. *Annals of Botany*, 115: 541 – 553.
- Suárez, D. y Melgarejo, L. M. (2010). Biología y germinación de semillas. *Experimentos en Fisiología Vegetal*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. PP. 13 – 24.
- Tenango Cabañas, E. (2004). Germinación de *Escontria chiotilla* (Rose) CACTACEAE (Informe de Servicio Social de Licenciatura). Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Thompson, D. y Grime J. P. (1979). Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *Journal of Ecology*, 67: 893 - 921.
- Thompson, K., Bakker J. P. y Bekker. R. M. (1997). The soil seed banks of North West Europe: methodology, density and longevity. Cambridge University Press, Cambridge.
- Torres, W., Méndez, M., Dorantes, A. y Durán, R. (2010). Estructura, composición y diversidad del matorral de duna costera en el litoral yucateco. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 86: 37 – 51.
- Trujillo-Hernández, A., López-Herrera, A. y Mandujano-Piña, M. (2017). Almacenamiento y germinación de las semillas de Jiotilla con diferente peso. *Revista Bio Ciencias*, 4(3): 153 – 163.
- Tunnacliffe, A. y Wise, M. J. (2007). The continuing conundrum of LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94: 791 – 812.

- Valiente-Banuet, A., Casas, A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Del Coro Arizmendi, M., Villaseñor, J. L. y Ortega Ramírez, J. (2000). La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 67:24-74.
- Valiente-Banuet, A., Solís, L., Dávila, P., Arizmendi, M. C. Pereyra, C. S., Ortega-Ramírez, J., Treviño Carreón, J., Rangel-Landa, S. y Casas, A. (2009). *Guía de la vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto Nacional de Antropología e Historia. PP. 206.
- Vázquez Yanes, C., Orozco, S. A., Rojas, A. M. y Sánchez, C. M. (1997). *La reproducción de las plantas: semillas y meristemas*. Fondo de Cultura Económica. México. PP. 167.
- Vázquez-Yanes, C. y Toledo, J. R. (1989). El almacenamiento de semillas en la conservación de especies vegetales, problemas y aplicaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 49:61-69.
- Villa-Hernández, J. M., Dinkova, T. D., Aguilar-Caballero, R., Rivera-Cabrera, F., Sánchez de Jiménez, E. y Pérez-Flores, L. J. (2013). Regulation of ribosome biogenesis in maize embryonic axes during germination. *Biochimie*, 95:1871 – 1879.
- Villanueva, R. M., Navarro, M del C. y Eliosa, H. R. (2016). Germinación de tres especies de cactáceas endémicas de México en condiciones asépticas. *Zonas Áridas*, 16(1): 1 – 16.
- Wakasa, Y. y Takaiwa, F. (2013). Seed storage proteins. Japón. National Institute of Agrobiological Sciences. *ELSEVIER*, 6(2): 346 – 348.

- Wang, H., Wu, Y., Yang, X., Guo, X. y Cao, X. (2016). SmLEA2, a gene for late embryogenesis abundant protein isolated from *Salvia miltiorrhiza*, confers tolerance to drought and salt stress in *Escherichia coli* and *S. miltiorrhiza*. *Protoplasma*, 254:685 – 696.
- Waterworth, W. M., Masnavi, G., Bhardwaj, R. M., Jiang, Q., Bray, C. M. y West, C. E. (2010). A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *The Plant Journal*, 63: 848 – 860.
- 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. SPRINGER. *Plant Molecular Biology*, 89: 475 – 492.
- Weisser, P. (1979). Morfología externa de las semillas de algunas cactáceas chilenas y su utilidad en taxonomía. *Anales de Museo de Historia Natural de Valparaiso*, 6: 27 – 40.
- Wu, X., Liu, H., Wang, W., Chen, S., Hu, X. y Li, C. (2011). Proteomic analysis of seed viability in maize. *Acta Fisiológica de Plantas*, 33: 181-191.
- Zinsmeister, J., Leprince, O. y Buitink, J. (2020). Molecular and environmental factors regulating seed longevity. *Biochemical Journal*, 477: 305 – 323.

## 11. APÉNDICE



**Figura 17.** Curva de BSA. Absorbancia obtenida por diferentes concentraciones de BSA, ecuación de la recta ( $y=mx+b$ ) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ )

**Cuadro 6.** Concentraciones de proteínas totales en semillas de *E. chiotilla* almacenadas *ex situ* e *in situ*.

Concentración de BSA (µg/µl)	Agua Destilada (µl)	Bradford (µl)	Volumen Final (mL)
0	800	200	1
5	795	200	1
10	790	200	1
15	785	200	1
20	780	200	1
30	770	200	1

**Cuadro 7.** Concentraciones de BSA para la determinación de la curva patrón.

Promedio de Absorbancias (nm)	Concentración de Albúmina ( $\mu\text{g}$ )
0.0	0
0.1096	5
0.2334	10
0.3003	15
0.41695	20
0.54275	30

**Cuadro 8.** Reactivos para preparar 50 ml de Buffer de extracción.

REACTIVO	CANTIDAD (mg)
HEPES	0.5985
Pirofosfato de Sodio	0.6645
Ortovanadato de Sodio	0.009195
Molibdato de Sodio	0.01205
Fluoruro de Sodio	0.04195
EDTA	0.05845
EGTA	0.38035
Manitol	1.822
¼ de pastilla de inhibidor de proteasa por cada 50 ml	

Los reactivos se agregan uno por uno en 20 ml de agua inyectable en el orden anterior en agitación constante. Al finalizar, aforar a 50 ml con un pH de 7.6. Por cada gramo de muestra, se agregan 10 ml de solución de Buffer de extracción.

**Cuadro 9.** Soluciones añadidas para medir las absorbancias de las muestras de *E. chiotilla* para ambos años de cosecha y diferentes tipos de almacenamiento.

<b>Volumen utilizado del extracto de proteínas de <i>E.</i> <i>chiotilla</i> (µl)</b>	<b>Agua Destilada (µl)</b>	<b>Bradford (µl)</b>	<b>Volumen Final (µl)</b>
5	795	200	1000

\* Las muestras de las proteínas totales se leyeron a una absorbancia de 590 nm en el espectrofotómetro para ambos tiempos (0 y 10 años) y tipos de almacenamiento (*in situ* y *ex situ*).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00208

Matrícula: 2192802218

Participación de las proteínas LEA en la viabilidad de semillas de *Escontria chiotilla* conservadas *in situ* y *ex situ*

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 1 del mes de abril del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. LAURA JOSEFINA PEREZ FLORES
- DRA. HILDA ARACELI ZAVALA MANCERA
- DRA. MARIA DOLORES GARCIA SUAREZ
- DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGÍA

DE: NANCY NOEMI DORANTES MEJIA

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

APROBAR

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

**CBS**



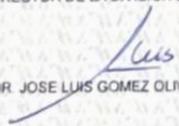

NANCY NOEMI DORANTES MEJIA  
ALUMNA

REVISÓ



MTRA. ROCALVA 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



DRA. HILDA ARACELI ZAVALA MANCERA

VOCAL



DRA. MARIA DOLORES GARCIA SUAREZ

SECRETARIA



DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ