



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN EL
PROCESO DE HIDRATACIÓN-DESHIDRATACIÓN
EN *Ferocactus recurvus* y *Ferocactus peninsulæ***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JOSÉ ROBERTO ORTÍZ SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

MTRO. ALEJANDRO CRUZ MONSALVO REYES

LOS REYES IZTACALA EDO. DE MÉXICO, 2020





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

❖ **A mis padres:**

Gracias por todo su amor, trabajo, paciencia y esfuerzo que me ha permitido cumplir esta meta en mi vida. Gracias por acompañarme durante este arduo camino de estudio, por estar presentes en todo momento, sus consejos y palabras de aliento.

❖ **A mi hermana:**

Gracias por ser parte de mi vida, enseñarme el camino que debía seguir, por todos esos consejos y estar a mi lado cuando más lo necesite; me enseñaste lo lejos que puedo llegar si sigo mis sueños, eres una de las mayores inspiraciones en mi vida; a pesar de la distancia, siempre estuviste conmigo, te amo.

❖ **Erin:**

Gracias por todo el tiempo juntos, por el largo camino que hemos atravesado y todos esos proyectos y ambiciones que hemos realizado; especialmente quisiera agradecer por estar presente cuando más necesitaba apoyo, por ayudarme a desarrollarme tanto académica como personalmente, por permitirme ser yo mismo; te amo. Espero que cumplas todos los proyectos que tengas y llegues tan lejos como tu lo desees.

❖ **Eli e Ivan:**

Gracias por todos esos momentos que hemos pasado juntos, todos los consejos y pláticas que nunca acaban. Gracias por todo el apoyo, son de las personas más importantes en mi vida, espero puedan cumplir todo lo que se propongan. Eli a pesar de no vernos seguido, eres una de mis grandes amigas, se que a veces podras estar ocupada pero a pesar de ello siempre he contado contigo. Ivan gracias por siempre darme tu opinión y ayudarme a ser mejor persona, por todas esas aventuras y horas de juego, eres una gran persona que siempre da todo por los que quiere.

❖ **A mis sinodales y compañeros de laboratorio:**

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio de Bioquímica Molecular y a mis sinodales, que fueron parte de este trabajo. Gracias por todos sus consejos, enseñanzas y tiempo.

Quisiera brindar un agradecimiento en especial a mi asesor el Mtro. Alejandro Monsalvo por estar presente durante toda mi estancia en la universidad, por todos los consejos brindados y todo el tiempo que dedico a este trabajo, y a mi enseñanza en distintos ámbitos escolares y personales, es una parte importante de mi vida.

❖ **A la UNAM.**

Me encuentro sumamente agradecido con mi alma mater por todas las oportunidades que me han brindado y el forjarme como Biólogo, por todas esas horas transcurridas en sus aulas desde el comienzo de mi camino como universitario en CCH Azcapotzalco hasta su conclusión como Biólogo en FES-Iztacala. Agradezco a todos los profesores que han sido parte de mi formación y me han ayudado a ser el egresado que hoy en día soy.

Me encuentro orgulloso de que esta sea mi segunda casa; por que siempre seré de sangre azul y piel dorada, por mi raza hablara el Espiritu.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a todos los que han sido parte de este proceso. Que este estudio sea el primero de muchos que pueda realizar.

¡Gracias por todo!

A la cima no se llega superando a los demás sino superándote a ti mismo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	5
Cactáceas	5
Semillas	5
Principales factores para la propagación de semillas	6
Genes respuesta al estrés hídrico	8
ANTECEDENTES	9
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS PARTICULARES	12
MATERIALES Y MÉTODO	13
Diseño experimental	13
Tratamiento de semillas	13
Colecta de muestras	13
Extracción de RNA total, síntesis y corroboración de cDNA	14
Expresión Diferencial	15
Análisis de Numérico	15
RESULTADOS	16
Ensayo de Germinación	16
Tiempo medio de Germinación	16
Expresión Diferencial	17
Análisis de componentes principales	19
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIÓN	23
LITERATURA CITADA	24
ANEXOS	28

RESUMEN

En plantas el proceso de germinación es una etapa crucial para su desarrollo en especial para aquellas especies endémicas pertenecientes a zonas áridas como *Ferocactus recurvus* en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán localizada en el sureste de México, que atraviesa por períodos discontinuos de hidratación de manera natural; se ha reportado que semillas de *F. peninsulae* responden a eventos humedad discontinuos, acortando el tiempo de germinación después de este período comparado con aquellas en condiciones constantes de hidratación (memoria de hidratación). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue identificar el efecto de un ciclo de hidratación-deshidratación (HD) en semillas de *F. recurvus* con relación a *F. peninsulae*, así como su efecto en la expresión diferencial de genes. Se germinaron semillas de éstas especies; el grupo control se mantuvo en condiciones constantes y el tratamiento recibió la aplicación de un ciclo HD (4 días hidratación y 3 días deshidratación), posteriormente se colectaron muestras a los días 0, 4, 7 y al germinar, las cuales por medio de RTq-PCR fueron utilizadas para dilucidar la presencia del proceso con las regiones codificantes de los genes *ble3_orysi*, *rha2a_arath*, *seep rapsa* y *trx1*. Al igual que *F. peninsulae*, las semillas de *F. recurvus* son capaces de expresar el proceso de memoria de hidratación, dado que el tiempo medio de germinación se redujo y la expresión de los genes evaluados muestra una regulación sincronizada debido al efecto de la Hidratación-Deshidratación, en ambas especies, lo cual afirma la presencia de memoria de hidratación.

ABSTRACT

In plants, germination process is a crucial stage for their development, in special for those endemic species from arid zones as *Ferocactus recurvus* in the reserve of the biosphere Tehuacán - Cuicatlan in the southeast of México. *F. recurvus* cross for a discontinue period of natural hydration, the same time other authors have reported that *F. recurvus*' seeds respond to events of hydration agreed the time of germination after this period in relation those seeds in moisture constant (memories of hydration). Therefore, the aim of this study is identify the effect of one cycle of hydration - dehydration in seeds of *F. recurvus* with relation to *F. peninsulae*, as well as the effect in the gene's expression differential. I've germinated seeds of these species, the control group always stayed in germination conditions and the experimental group had a cycle of hydration (4 days of hydration and 3 days of hydration), subsequently the sample was collect st days 0,4,7 and in germination. This samples used for know the presence of memory by means of RTq-PCR was used to clarify the presence of hydration memory with the codigin regions for the genes *ble3_orysi*, *rha2a_arath*, *seep rapsa* and *trx1*. *F. peninsulae* seeds as express hydration memory as *F. recurvus* because in both species the time of germination is less in relation with the control group and the expression in the evaluated genes have a synchronized regulation due to the effect of hydration-dehydration, wherewith we may affirm that *F. recurvus* have memories of hydration.

INTRODUCCIÓN

Se conoce que las semillas de algunas cactáceas responden a eventos de humedad discontinuos (“memoria de hidratación”) como una forma de adaptación, debido a que en algunas especies se acorta el tiempo de germinación después de tratamientos de deshidratación comparado con tratamientos de humedad constante (Dubrovsky, 1996; Contreras *et al.*, 2015; Contreras *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2018; López *et al.*, 2014; Loza *et al.*, 2018; Ren y Tao, 2003; Ruttanaruangboworn *et al.*, 2017; Santini *et al.*, 2017; Yan, 2015). Las semillas que se someten a ciclos de Hidratación-Deshidratación (HD) (Figura 1) que mantienen un alta supervivencia durante la desecación, demuestran que pueden presentar memoria de hidratación, preservando los cambios fisiológicos como la expresión diferencial de proteínas inducida por la hidratación de las semillas, además el establecimiento y desarrollo de la plántula puede verse beneficiado por ciclos HD (Lima, 2018). En contraste se conoce el proceso de “priming” que consiste en humedecer parcialmente las semillas hasta un contenido de agua cercano, pero por debajo del que permita el inicio de la división celular, es decir la germinación (Heydecker & Coolbear, 1977; Fercha *et al.*, 2014), siendo de tal forma cualquier metodología de hidratación previa a la siembra, sin discriminar dónde y cómo son embebidas las semillas.



Figura 1. Ciclo de Hidratación-Deshidratación: Humedecer las semillas durante 4 días para posteriormente atravesar una etapa de estrés al ser deshidratada la semilla al ser traspasada a una caja seca y cubierta con papel aluminio, finalmente se regresan las semillas a condiciones de germinación el tiempo necesario para que este proceso se lleve a cabo.

La propagación por semillas es un método de reproducción con importancia ecológica ya que sustenta la diversidad genética y el mantenimiento en poblaciones (Mihalte, 2011; Dubrovsky, 1998). La semilla es una unidad reproductiva compleja, debido a que debe tener ciertas características morfológicas, ecológicas y fisiológicas específicas para que se mantengan viables en distintas condiciones y puedan germinar (Bowers, 2000); este proceso incorpora eventos que se inician con la absorción de agua por la semilla seca y termina con la elongación del eje embrionario; este proceso es un estado crucial para las semillas sobretodo en especies de crecimiento lento como las cactáceas (Godínez, *et al.*, 2003), por tal motivo es fundamental establecer la duración de los ciclos HD para identificar las fases de la cinética de absorción de agua, ya que solo son tolerantes las semillas a la desecación durante la fase I y II e intolerantes en la fase III de la germinación (Castañares, 2010).

En un trabajo previo se buscó la descripción de eventos a nivel molecular que mejoran la germinación después de ciclos HD (López *et al.*, 2014), dilucidando la posible participación algunos genes cuya importancia radica en su expresión durante eventos de estrés hídrico sufridos mediante un proceso de hidratación-deshidratación, como es el caso de *trx1 yeast*, *seep rapsa*, *rha2a_arath* y *ble3_orysi* (Figura 2), cuya expresión puede verse afectada cuando la semilla se encuentra en hidratación discontinua, por lo tanto, es posible evidenciar la presencia de esta adaptación en *F. recurvus*, que es una de las especies endémicas con mayor importancia en el valle de Tehuacán-Cuicatlán en Puebla y Oaxaca debido a posee múltiples usos en las comunidades entre los que se destacan el comestible, ceremonial y ornamental, por lo que es cultivada en abundancia por sus habitantes (Ballesteros-Barrera *et al.*, 2017; Martínez, 2017).

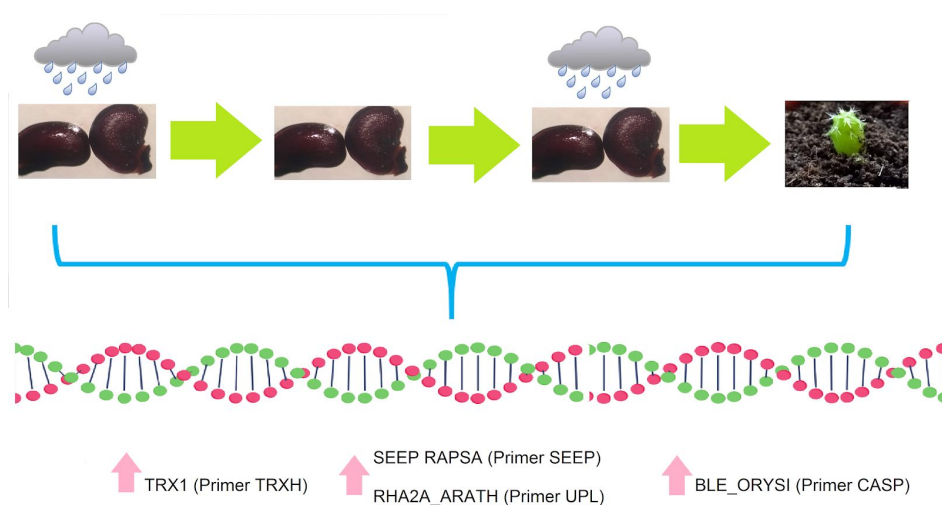


Figura 2. Momentos de mayor expresión teórica para los genes TRX1, SEEP RAPSA, RHA2A_ARATH y BLE_ORYSI durante el proceso de hidratación-deshidratación.

MARCO TEÓRICO

Cactáceas

Las plantas son una parte vital de la biodiversidad convirtiéndose en un recurso esencial del planeta, teniendo suma importancia económica, cultural, alimenticia, medicinal, etc., a nivel mundial, debido a esto han tenido un desarrollo antropocéntrico (SCDB, 2009). México es un país megadiverso, en el que 60% de su territorio es árido o semi desértico, permitiendo así, el desarrollo de un gran número de cactáceas, entre la diversidad presente de la familia Cactaceae podemos destacar los cactus columnares (viejitos y ttechos); los cactus candelabriformes (cardones, órganos y pitayas); las biznagas y biznaguillas (chilitos); algunas trepadoras como los nopalillos (*Heliocereus* spp.); las pitahayas (*Hylocereus* spp.), y una gran variedad de nopales, entre otras, refiriéndonos a la zona del valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla (Jiménez, 2011). Esta región se considera uno de los principales puntos de distribución de cactáceas, albergando por lo menos a 81 especies, de las cuales el 25% son endémicas de la zona; siendo así una de las tres zonas semiáridas en México con mayor número de elementos endémicos (Talonía 2014).

La familia Cactaceae es originaria del continente americano (Anderson, 2001), con aproximadamente 2000 especies (Jimenez, 2011). Sin embargo, presenta su máxima diversidad en el territorio mexicano (Hernández y Godínez, 1994; Talonía 2014) con alrededor de 68 géneros y 670 especies, de las cuales cerca del 80% son endémicas del país (Guzmán, 2009), por lo que posee un elevado índice de endemismos (Guzmán *et al.*, 2007). De los 275 taxones de cactáceas que incluye la NOM-059-SEMARNAT-2010, 10 corresponden al género *Ferocactus*, muchas de sus especies se encuentran amenazadas y son extraídas ilegalmente para ser comercializadas (Semarnat, 2016).

Semillas

La formación, dispersión y germinación de semillas, son eventos fundamentales en el ciclo de vida de las plantas gimnospermas y angiospermas; fungiendo con la función de multiplicar y perpetuar la especie, por lo tanto, es el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores (Figura 3; Doria, 2010). La semilla es una unidad reproductiva compleja, que se forma a partir del óvulo vegetal, generalmente después de la

fertilización, que específicamente en las angiospermas los óvulos se desarrollan dentro de un ovario. Las reservas energéticas de la semilla son: grasas, carbohidratos y a veces proteínas, que sostendrán a la futura planta durante sus primeras etapas de vida. Estas reservas, pueden encontrarse en diferentes tejidos o en el embrión mismo, de acuerdo a Suárez y Melgarejo en 2010 las semillas presentan los siguientes componentes:

- El embrión, que es el producto de la fusión entre el óvulo con el núcleo espermático.
- El endospermo que provee de nutrientes al embrión para el desarrollo y el crecimiento de la plántula.
- La testa de la semilla formada externamente por los integumentos que representan los tejidos maternos del óvulo.



Figura 3. Fotografía representativa de una semilla de *F. recurvus*.

Principales factores para la propagación de semillas

La materia prima más importante para la propagación en este género es el agua, debido a esto cuentan con diversas adaptaciones a zonas áridas como poseer un metabolismo crasuláceo (CAM) caracterizado por mayor aprovechamiento del factor limitante en el establecimiento de especies desérticas (Nobel, 2002).

La disponibilidad del agua presente determina el tiempo de imbibición y comienzo de la germinación, sin embargo, existen variaciones entre especies que responden a periodos de hidratación. En 2010 Castañares dividió el proceso de germinación en 3 fases (Figura 4): Fase 1, ocurre la imbibición, que consiste en la absorción del agua necesaria para la

hidratación de proteínas y organelos celulares, así como para el transporte y reacciones hidrolíticas. Fase 2, se produce la activación del metabolismo, síntesis de ácidos nucleicos y proteínas; así mismo se incrementan las actividades enzimáticas, como la degradación inicial de las reservas. Finalmente, en la Fase 3 se tiene la emergencia radicular, concluyendo el proceso germinativo, ya que el crecimiento subsecuente se considera un proceso separado.

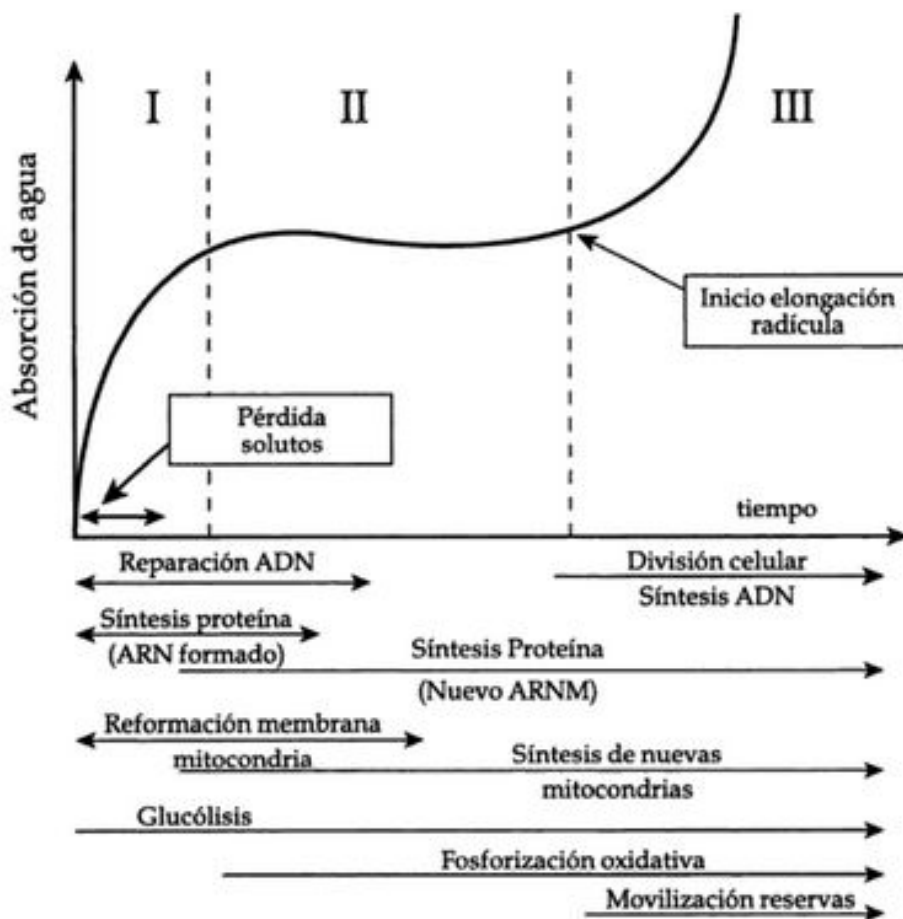


Figura 4. Proceso de germinación: (I) Imbibición, etapa de absorción del agua necesaria para la hidratación reparación de DNA, síntesis de proteínas, reparación de membrana y otros organelos celulares, glucólisis. (II) Activación del metabolismo, síntesis de ácidos nucleicos y proteínas; mayor actividad enzimática, y degradación de reservas. (III) Emergencia radicular, concluyendo así el proceso de germinación (Tomado de Castañares, 2010).

Además del agua, la temperatura es un factor importante para la germinación de semillas del género *Ferocactus*, observando la optimización a 35°C para *F. recurvus* y *F. peninsulae*, sin embargo para *F. clausen* y *F. pilosus* se presenta un porcentaje de germinación mayor a 25°C (Monsalvo *et al.*, 2019); estas variaciones en la temperatura han sido observadas por distintos autores como Castillo en 1986 al reportar que *F. hystrix* aumenta el porcentaje de germinación a 25°C; mientras que Flores *et al.* en 2017 y Pérez *et al.* en 2011 para la misma

especie observaron que a 30°C. Las variaciones existentes permiten afirmar que las semillas de *Ferocactus* son sensibles a cambios en la temperatura, aumentando el tiempo de germinación al no estar en condiciones óptimas.

Genes respuesta al estrés hídrico

En 2010 López *et al.* dilucidaron la posible participación algunos genes que expresan durante eventos de estrés hídrico sufridos mediante un proceso de hidratación-deshidratación, como es el caso de *trx1 yeast* (Thioredoxin-1) cuya proteína participa evitando la oxidación e involucrándose en múltiples procesos celulares reduciendo el estrés hídrico al facilitar que entre el agua en las vacuolas, es importante resaltar que el daño oxidativo causado por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno es de los mayores problemas en las plantas al ser expuestas a estrés (Yan 2011); *seep rapsa* (Late seed maturation protein P8B6) gen involucrado en la supervivencia de la semilla manteniendo un nivel mínimo de hidratación lo cual previene la desnaturalización de los componentes citoplasmáticos, ésta familia de proteínas ha sido observada en el proceso de priming que se lleva a cabo de manera industrial en semillas de cultivos con importancia agrícola, para que de esta manera ese cultivo se desarrolle más rápidamente y de manera uniforme para que sea más eficiente dicho cultivo y la cosecha; causando así la iniciación del proceso de germinación. Los promotores de síntesis de Late embryonic abundance proteins (LEA), incrementan la tolerancia a la desecación y cambios en plántulas (Raynal, 1989); *rha2a_arath* (E3 Ubiquitin-Protein Ligase RHA2A) que se involucra en la regulación positiva del ABA señalizado y respondiendo a cambios salinos y estrés osmótico durante la germinación y desarrollo temprano de la plántula, Bregman y Gravena (1997) reportan la presencia de complejos de proteínas que se desarrollan en la cutícula de la semilla, con gran capacidad de absorber agua. ABA y AS son hormonas de plantas, que estimulan la proliferación celular a bajas dosis y la estimulación en el sistema de resistencia de la planta, pero a altas dosis las células en la planta mueren (Clark *et al.*, 2001) bloqueando totalmente la germinación; *Ble3_orysi* (CASP-like protein BLE3) involucrado en la elongación celular.

ANTECEDENTES

En 1996, Dubrovsky acuñó el término “memoria de hidratación” al observar que semillas de cactáceas al encontrarse en la superficie del suelo en el desierto están sujetas a períodos de sequía pueden durar hasta meses, por lo tanto, están típicamente bajo hidratación discontinua o deshidratación discontinua. Estas semillas aparentemente, son capaces de tolerar períodos de deshidratación después de eventos de hidratación únicos o múltiples y posteriormente germinan de acuerdo con la anterior “experiencia de hidratación”; esto lo verificó con las siguientes especies de cactus del desierto de Sonora: *Stenocereus thurberi*, *Pachycereus pecten-aboriginum* y *Ferocactus peninsulæ*. Sus resultados muestran una disminución de entre 1.4-2 veces en el tiempo medio de germinación en relación a aquellas semillas no tratadas; estos resultados sugirieron un fenómeno de "memoria de hidratación de semillas", denominando la capacidad de las semillas para retener durante los períodos de deshidratación aquellos cambios fisiológicos que resultan de la hidratación de la semilla, lo que condujo a una mayor acumulación de biomasa y por lo tanto a una mayor supervivencia en plántulas de semillas tratadas que de semillas no tratadas.

En 2014, López *et al.* dilucidaron múltiples genes que participan durante el evento de memoria de hidratación en *F. peninsulæ*, con el objetivo de proporcionar una aproximación inicial a los mecanismos moleculares que subyacen en la memoria de hidratación. Este fenómeno lo reprodujeron con ensayos de hidratación-deshidratación con distinta duración para observar el efecto que tenía el tiempo en las semillas. Además, por medio de electroforesis bidimensional (2D) compararon patrones de expresión de proteínas involucradas en la maduración de semillas y plántulas sometidas al tratamiento de hidratación-deshidratación; encontrado expresión diferencial de varias proteínas posiblemente involucradas en el metabolismo primario, vía de ubiquitinación y regulación de disponibilidad de proteínas de reserva en semillas. Finalmente, los autores concluyen que la memoria de hidratación presenta un gran potencial biotecnológico, debido a que puede permitir realizar predicciones sobre si la semilla puede soportar la hidratación discontinua; y a largo plazo, el conocimiento sobre su regulación podría conducir a la inducción de esta resistencia.

En 2019, Monsalvo *et al.* trabajaron con distintas especies de Cactáceas con el objetivo de dilucidar la presencia de memoria de hidratación en alguna de ellas, de las 5 plantas empleadas en su estudio únicamente *F. recurvus* evidenció dicho fenómeno al expresar curvas de germinación similares a *F. peninsulae*, planta que en el 2014 fue confirmada la presencia de este proceso. Además, observaron el efecto que presenta la temperatura y el agua, al someter

a las especies a distintas variaciones de estos factores, estableciendo que las condiciones óptimas de estos factores para la germinación de estas especies se encuentra en los 35° C y 6 ml de agua por unidad de estudio. En un estudio posterior, estos autores estandarizaron las condiciones óptimas para el uso de la técnica de RTq-PCR para la expresión diferencial de genes durante la germinación de *F. peninsulae* y *F. recurvus* con tiempos de hidratación-deshidratación; así como la síntesis de primers para los genes *rha2a_arath*, *trxh1_arath*, *seep_rapsa*, *ble3_orysi*, *ssg2_avesa*, *lea1_orysi* y *actina* para Cactáceas, sus resultados con esta técnica les permitieron reconocer diferencias de expresión entre cada tiempo, gen y especie (Anexo 1 y 2).

HIPÓTESIS

Ferocactus recurvus presenta memoria de hidratación y expresión diferencial de genes como respuesta al estrés hídrico durante la germinación en ambientes semiáridos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar el efecto en la germinación de un ciclo de hidratación-deshidratación previo a la hidratación en semillas de *Ferocactus recurvus*, así como su efecto en la expresión diferencial de genes.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto de un ciclo de hidratación-deshidratación previo a la germinación en *F. recurvus* comparando tiempos medios de germinación de *F. peninsulae*.
2. Comparar la variación en la expresión de genes a distintos tiempos del proceso de germinación de *F. recurvus* y *F. peninsulae*.

MATERIALES Y MÉTODO

Diseño experimental

Se germinaron semillas de *F. peninsulae* colectadas en Baja California durante el 2014, como grupo control y de *F. recurvus* colectadas en Puebla durante el 2018, como grupo experimental; con fotoperiodo controlado (12 horas día/noche) a una temperatura de 30°C y humedad relativa constante del 60-65%. Se extrajeron 50 semillas de su fruto, separándolas de la pulpa para realizarles un lavado, escurificándolas con solución de NaClO (Hipoclorito de Sodio) al 30% por 15 minutos y posteriormente se enjuagaron con agua destilada hasta retirar por completo la solución; por especie se utilizaron dos cajas, una correspondiente al tratamiento de hidratación-deshidratación (HD) y otra al control que permaneció en condiciones constantes de germinación con 25 semillas cada una, la caja petri fue revestida previamente con una capa de papel filtro humedecido con 6ml de agua destilada, colocadas las semillas en las cajas, fueron selladas con plástico adherible para evitar la pérdida de humedad.

Tratamiento de semillas

El tratamiento se basó en un solo ciclo de hidratación-deshidratación que consiste en incubarlas bajo condiciones de germinación durante 3 días, posteriormente se someten a un periodo de desecación (pérdida de condiciones de germinación) por 4 días en oscuridad total al envolver la caja petri con aluminio y finalmente se colocaron nuevamente en condiciones de germinación. Las semillas correspondientes al tratamiento control siempre mantuvieron las condiciones de germinación.

El tiempo medio de germinación fue calculado con la fórmula $\frac{\sum G_i i}{\sum G_i}$, donde i es el día uno de germinación y G_i es el número de semillas germinadas en el día i (Dubrovsky, 1996).

Colecta de muestras

Las muestras se colocaron en tubos eppendorf y congeladas hasta la extracción de RNA total de acuerdo con los siguientes tiempos:

- A. 0 días: Después de ser escurificadas las semillas (T0)

- B. 4 días: Cuando el tratamiento se retiró de condiciones de germinación (TD)
- C. 7 días: El tratamiento fue colocado en condiciones de germinación (TH)
- D. Germinación: La radícula mide medio centímetro (TG)

Extracción de RNA total, síntesis y corroboración de cDNA

El RNA total se extrajo de las muestras utilizando el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus de la marca ZYMO RESEARCH con 50-100 mg de semillas, siguiendo el protocolo del fabricante. Finalizada la extracción se realizó la síntesis de cDNA con el kit Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase siguiendo de igual manera el protocolo del fabricante.

Se llevaron a cabo reacciones de PCR punto final para probar el correcto diseño de los primers sintetizados por Monsalvo *et al.* 2019 en un estudio previo (Tabla 1) y la calidad del cDNA, utilizando el Kit MyTaq DNA polymerase con un volumen final de 10µl, la reacción se realizó con el siguiente programa en el termociclador T100 BIO-RAD: un minuto a 95°C, seguido de 40 ciclos compuestos por 30 segundos a 94°, 20 segundos a 57° y 30 segundos a 74°C, finalmente 8 minutos a 74°. Los amplicones fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 1X y teñido con Midori Green Advance en una cámara de electroforesis corriendo durante 20 minutos a 70V.

Tabla 1. Primers sintetizados para regiones codificantes de respuesta al estrés hídrico

Gen	Primer	Dirección	Pb	Secuencia
<i>trxh1_arath</i>	TRXH	Fw	20	TTGAAGTCGGTGGCAAGTGA
		Rv	21	AGCTCATCTTTCTTGGCTCCA
<i>seep_rapsa</i>	SEEP	Fw	20	ATGAGAGGGCAAAGAAGGGC
		Rv	20	TCCTTTTCGAGTTTGCCCTCC
<i>rha2a_arath</i>	UPL	Fw	20	GCCGTCTTCATCAACCATCT
		Rv	20	TTGGCTAGTCCCGATGCTAT
<i>ble3_orysi</i>	CASP	Fw	20	ATACACGCCTACTGCAACCA
		Rv	20	GACATCGGTGACAATGTGGA

Expresión Diferencial

Obtenidos los geles de agarosa con los amplicones esperados se realizó RTq-PCR por triplicado utilizando el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix con reacciones de 10µl con 0.5µl de cDNA por reacción, en un termociclador StepOne™ Real-Time PCR System con el siguiente programa: ciclo inicial de 95°C durante 10 minutos, seguido por 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 95°C durante 15 segundos; finalizada la reacción fueron calculados los niveles de expresión de los transcritos de cada gen, se utilizó la fórmula: $E = Peff^{(-\Delta Ct)}$, en donde Peff es la eficiencia del PCR, calculada mediante el programa LinRegPCR, posteriormente se determinaron las unidades de expresión relativa (UER) para cada gen.

Análisis de Numérico

Los datos obtenidos por cada gen fueron contrastados con gráficos radiales y heatmaps para observar de esta manera la expresión diferencial a distintos tiempos y regiones; se establecerá la existencia de diferencias significativas mediante un análisis de componentes principales.

RESULTADOS

Ensayo de Germinación

Se observó la reducción en el tiempo de germinación posterior a la aplicación del tratamiento de hidratación-deshidratación en *F. recurvus* y *F. peninsulæ* de 4 días; lo cual corrobora la presencia de memoria de hidratación en *F. recurvus* (Figura 5). Sin embargo el porcentaje de germinación en *F. peninsulæ* se ve afectado el 50% en ambos grupos, por lo que esta disminución no es generada por la deshidratación de las semillas, mientras que *F. recurvus* presenta de manera constante el 100% de germinación en los dos grupos empleados, por lo que la aplicación de un ciclo HD no disminuye el porcentaje de germinación en la especie.

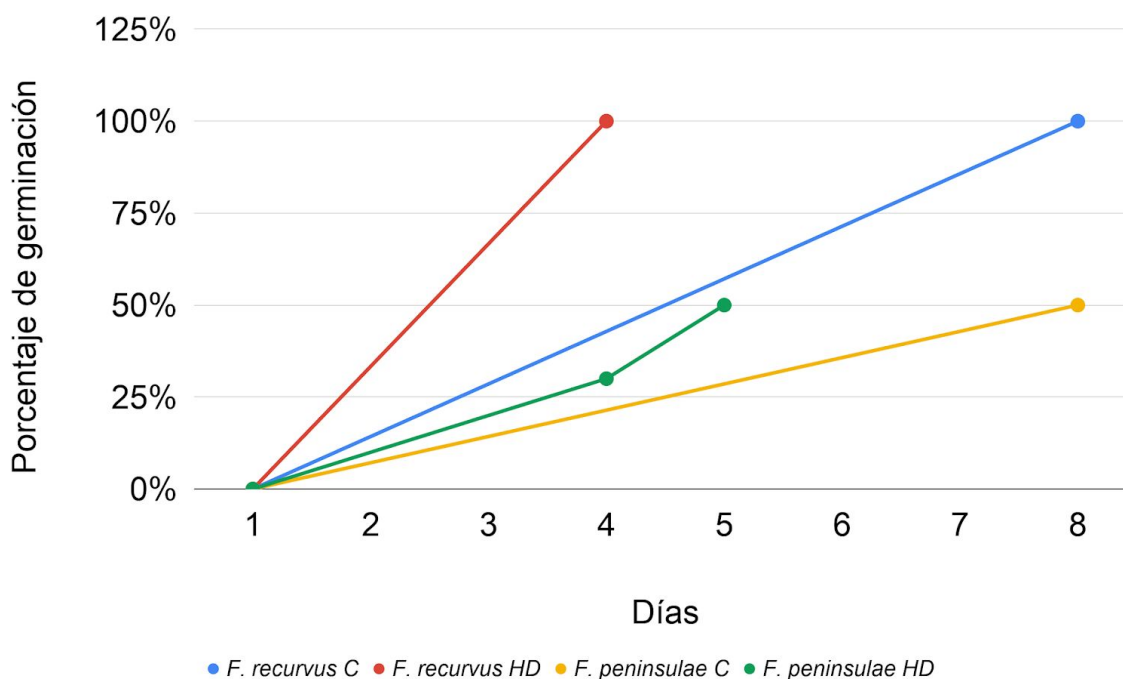


Figura 5. Curvas de germinación comparativas de *F. recurvus* y *F. peninsulæ*.

Tiempo medio de Germinación

Con los datos obtenidos se calculó el tiempo medio de germinación (Figura 6), donde *F. recurvus* al igual que *F. peninsulæ* presentaron una disminución en el tiempo medio de germinación (4 días con respecto al grupo control), por lo que de esta manera es posible observar un efecto en las semillas al aplicar un ciclo HD.

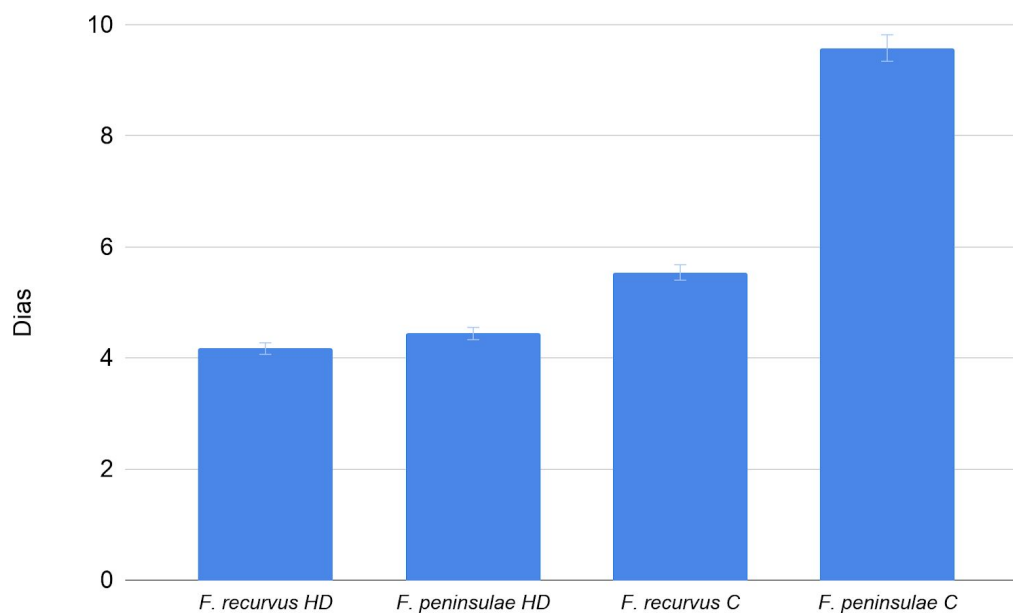


Figura 6. Tiempo medio de germinación expresado en días para *F. recurvus* y *F. peninsulae*, para los grupos control (C) y tratamiento (HD).

Expresión Diferencial

La técnica de RTq-PCR permitió caracterizar el desarrollo de germinación con una alta sensibilidad y especificidad; observando la expresión diferencial de genes durante el proceso de hidratación-deshidratación para *F. recurvus* entre el grupo control y tratamiento HD (Figura 7), la expresión de los genes presentó gran variación durante el T0 que corresponde al stock de semillas por lo que a pesar de encontrarse en un estado de latencia basal, cada organismo se encuentra realizando distintos procesos biológicos, de igual manera el grupo control no muestra relación alguna entre la expresión de los distintos genes (Figura 7a), pero al aplicar un ciclo HD (Figura 7b) se observa el aumento de la expresión en los genes *trxh1_arath*, *seep_rapsa*, *rha2a_arath* generado por el proceso de memoria de hidratación al tener una mayor actividad durante los tiempos de hidratación y deshidratación.

Por otro lado, el gen *ble3_orysi* no presenta un comportamiento similar al esperado teóricamente debido a que se observa un aumento en la expresión durante las etapas iniciales del proceso de germinación en la semilla, mientras que los niveles de los transcritos de *trxh1_arath*, *seep_rapsa* y *rha2a_arath* concuerdan con la expresión reportada de manera experimental.

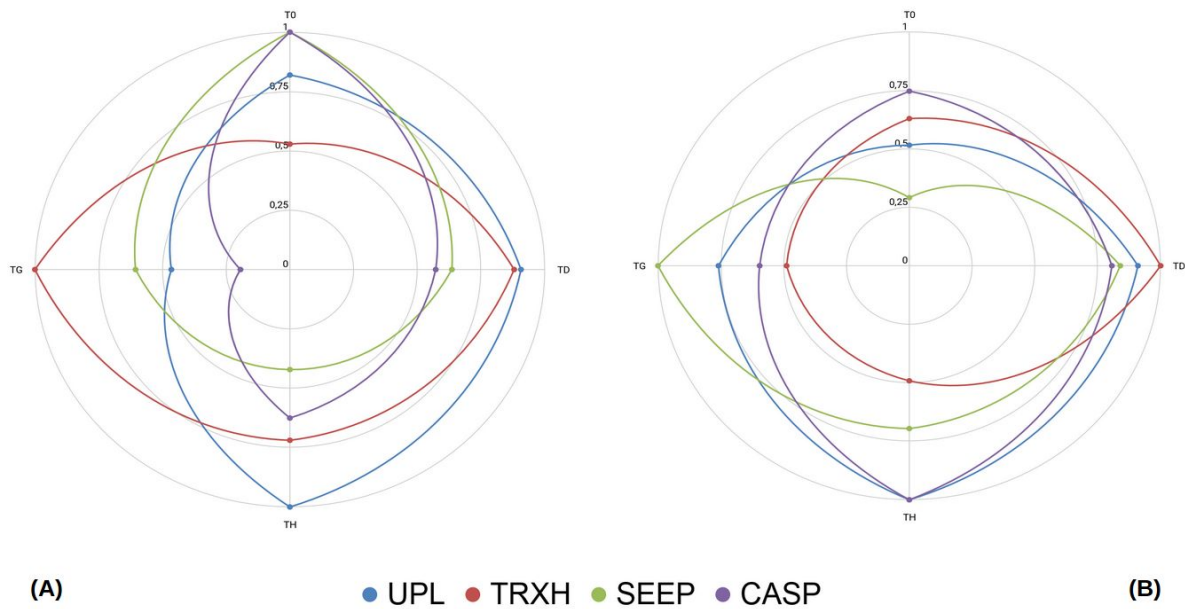


Figura 7. Gráficos radiales donde se muestra la expresión relativa respecto a un gen de expresión constitutiva de *F. recurvus* control (A) y tratamiento HD (B); en azul UPL (*rha2a_arath*), rojo TRXH (*trxh1_arath*), verde SEEP (*seep_rapsa*) y morado CASP (*ble3_orysi*).

F. peninsulae al igual que *F. recurvus* presenta una modificación en los niveles de expresión posterior a la aplicación de un ciclo HD en relación a aquellas semillas que mantienen humedad constante, aumentando la expresión genética durante la deshidratación en relación al tiempo de germinación (Figura 8), respondiendo de esta manera al estrés hídrico. Para el gen *trxh1_arath* se observa una disminución en la expresión posterior a la ausencia de agua por lo que se ve afectado con la deshidratación pero al hidratarse nuevamente la semilla recupera sus niveles de expresión.

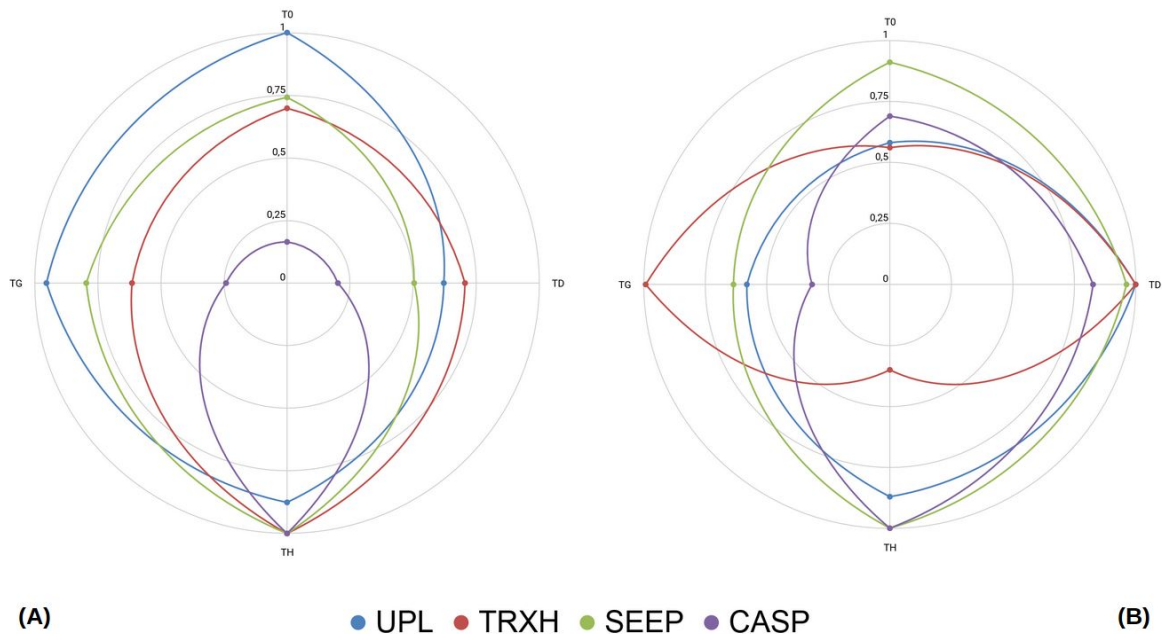


Figura 8. Gráficos radiales donde se muestra la expresión relativa respecto a un gen de expresión constitutiva de *F. peninsulae* control (A) y tratamiento HD (B); en azul UPL (*rha2a_arath*), rojo TRXH (*trxh1_arath*), verde SEEP (*seep_rapsa*) y morado CASP (*ble3_orysi*).

Así mismo se observa expresión diferencial entre ambas especies, a pesar de que las dos pertenecen a zonas áridas y presentan respuesta al estrés hídrico. En el caso de *F. recurvus* se observa un aumento en la expresión durante la imbibición de la semilla, mientras que para *F. peninsulae* se tiene la mayor expresión durante etapa final del proceso de germinación, por lo que a pesar de ser una respuesta al estrés hídrico cada especie responde de manera distinta adaptándose a las condiciones ambientales específicas que presentan cada una de ellas.

Análisis de componentes principales

Por medio de un análisis de componentes principales se buscó la detección de los genes más representativos para cada organismo. Se observa la distinción de dos grupos conformados por cada una de las especies, así como la distribución por tratamiento HD y aquellas en hidratación constante; los genes más representativos para *F. peninsulae* corresponden a los primers CASP y TRXH en sus distintos tiempos, mientras que para *F. recurvus* SEEP y UPL tienen mayor actividad, posterior a la aplicación de un ciclo HD los genes con una mayor actividad son TRXH en T0 para *F. peninsulae*, UPL en Th y SEEP en Tg para *F. recurvus* (Figura 9).

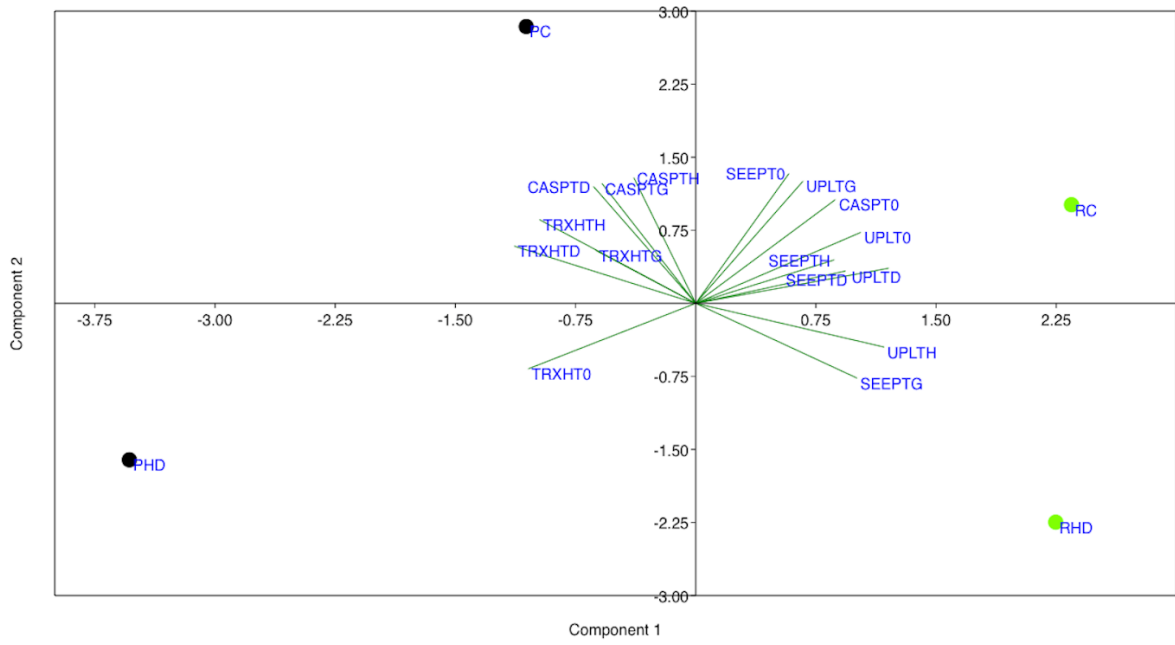


Figura 9. Análisis de componentes principales, en negro *F. peninsulae* y verde *F. recurvus*.

DISCUSIÓN

La aplicación de ciclos HD en cactáceas permite evidenciar el efecto que tiene la memoria de hidratación, siendo una adaptación que se presenta de manera natural para lograr sobrevivir a las condiciones adversas del ambiente, ya que la disponibilidad del agua en zonas desérticas es uno de los factores limitantes para el crecimiento; lo anterior es corroborado por Contreras *et al.* en 2005 al someter semillas de plantas no cactáceas a ciclos *in vitro*, observando que no hubo mejora en la germinación. Además este proceso tiene gran importancia para plantas cactáceas como lo observa Armador *et al.* en 2013 al comparar el efecto que tiene en relación a distintos reguladores del crecimiento como AIA, ANA y AG; determinando que el mejor desarrollo se observa en semillas que sufren ciclos HD.

F. recurvus presentó un comportamiento similar a *F. peninsulae* en presencia de estrés hídrico, por lo que es posible afirmar que presenta memoria de hidratación, este hallazgo tiene el potencial de permitir su propagación por semilla más eficiente y destacar la importancia de dicha especie que de acuerdo con Martínez *et al.* en 2017 tiene múltiples usos en comunidades de Oaxaca, entre los que se destaca el uso comestible, ceremonial y ornamental, siendo cultivada por sus habitantes y el uso de este tipo de tratamientos (ciclos HD) permitirá mejorar su producción, así como el reducir la cantidad de agua necesaria para su germinación y desarrollo; pero es necesario realizar estudios posteriores para conocer más sobre la biología de esta especie.

Como se mencionó previamente, el evento de memoria de hidratación en cactáceas tiene un efecto mayor para el crecimiento que la aplicación de distintos reguladores (Armador *et al.* en 2003), esto se debe a que se ve involucrada con la inducción de hormonas o mejoradores del crecimiento vegetal como ocurre con los genes *ble3_orysi* y *rha2a_arath* que al expresarse incrementan la síntesis de hormonas como respuesta a la deshidratación inducida. Se utilizaron 4 genes involucrados directamente con el estrés hídrico que fueron descritos por López *et al.* en 2014; *ble3_orysi* se encuentra relacionado directamente con el aumento en brasinoesteroides involucrados en un amplio rango de procesos de crecimiento y desarrollo en la planta, en meristemos y tejido vascular junto con auxinas (Yang *et al.*, 2006), por lo que involucra promotores del desarrollo vegetal, haciendo referencia de esta

manera a la respuesta observada en ambas plantas aumentar la síntesis de este gen durante el ciclo HD lo cual adelantó la germinación respecto a aquellas semillas que permanecen en humedad constante, a pesar de ello no es representativo en el ciclo HD de ninguna de las dos especies de acuerdo a los resultados obtenidos, el gen por otro lado se encuentra ligado principalmente a la hidratación constante pero si se observa un efecto en la expresión.

La proteína sintetizada por el gen *trx1* no ha presentado investigaciones en relación a su actividad en alguna ruta metabólica, pero se conoce una proteína homóloga a la sintetizada por *trx1* denominada Yap1, actúa como un factor de transcripción regulador de hidroxidrogenasas, que se activa por oxidación cuando los niveles de hidrógeno peróxido aumentan (Delaunay, 2002); esta actividad concuerda con la escasa información reportada por Yang *et al.* en 2006 sobre el gen *trx1* al observar su participación al permitir la entrada de componentes citoplasmáticos a la vacuola celular, disminuyendo las formas reactivas de oxígeno durante el estrés hídrico; ajustándose así con la expresión obtenida al momento de aplicar la deshidratación respecto con las semillas control, sin embargo es necesario realizar más trabajos con este gen para conocer la actividad que realiza durante el proceso de memoria de hidratación debido a que es representativo de *F. peninsulae*.

Otro de los genes estudiados en el presente trabajo es *rha2a_arath*, que participa como uno de los principales reguladores del ABA, siendo una de las principales hormonas reguladoras del crecimiento vegetal durante la germinación en condiciones no favorables, pero en altas dosis puede inhibir el establecimiento de las semillas, regulando este gen la respuesta al estrés hídrico (Bu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2019), concordando con lo observado en *F. recurvus* al tener mayor significancia en el tratamiento HD durante la etapa hidratación, que en las semillas control, corroborando además este resultado en las plántulas al momento de germinar teniendo un alargamiento radicular mayor. Finalmente el gen *seep rapsa* forma parte de la familia proteica LEA que han sido descrita durante el proceso de priming y de igual manera se asocia con la expresión de ABA (Raynal *et al.*, 1989), presentándose diferencialmente entre especies como se ha observado en los otros genes utilizados en el estudio, teniendo mayor expresión en *F. recurvus* y siendo representativo durante el tratamiento al momento de la germinación, estos resultados demuestran que la expresión de ciertos genes depende del contenido de agua en las plantas y que ABA puede actuar como una señal en esa respuesta.

CONCLUSIÓN

Los ciclos de hidratación-deshidratación mejoran la germinación de semillas de *F. peninsulae* y *F. recurvus* al expresar el proceso de memoria de hidratación, dado que el tiempo medio de germinación se reduce y la expresión de los genes evaluados muestra una regulación sincronizada debido al efecto de la Hidratación-Deshidratación, para ambas especies.

En *F. peninsulae* se observa principalmente la expresión de *trx1* y *ble3_orysi*, genes involucrados principalmente en el ingreso de agua a la célula, favoreciendo así a las plántulas presentando mayor turgencia respecto a su control. Por otra parte, *F. recurvus* expresa principalmente genes especializados a la elongación celular como lo son *rha2a_arath* y *seep rapsa*, observando morfológicamente plántulas con crecimiento radicular mayor que aquellas en humedad constante, por lo que es posible observar una relación entre la expresión de estos genes con sus características observadas.

LITERATURA CITADA

1. Amador-Alfárez, K. A., Díaz-González, J., Loza-Cornejo, S., & Bivián-Castro, E. Y. (2013). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica*, (35), 109-131.
2. Anderson, E.F. (2001). *The Cactus Family*. Timber Press, Inc., Portland, USA.
3. Ballesteros-Barrera, C., Aguilar-Romero, O., Zarate-Hernández, R., & Ballesteros-Tapia, L. (2017). Distribución Geográfica y Conservación de nueve especies del género *Ferocactus* (Cactaceae) en México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(2), 131-140.
4. Bregman, R. and P. Graven (1997). Subcuticular secretion by cactus seeds improves germination by means of rapid uptake and distribution of water. *Annals of Botany*, 80: 525-531.
5. Bowers, J. E. (2000). Does *Ferocactus wislizeni* (Cactaceae) have a between-year seed bank?. *Journal of Arid Environments*, 45(3), 197-205.
6. Bu, Q., Li, H., Zhao, Q., Jiang, H., Zhai, Q., Zhang, J., ... & Li, C. (2009). The Arabidopsis RING finger E3 ligase RHA2a is a novel positive regulator of abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *Plant physiology*, 150(1), 463-481.
7. Castañares, J. L. (2010). El priming de semillas y sus aplicaciones en cultivos hortícolas. *Universidad del Litoral, Facultad de Ciencias agrarias*.
8. Castillo, R. F. (1986). Semillas, germinación y establecimiento de *Ferocactus histrix*. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 31(1), 5-11.
9. Cervantes, L., & Martínez, P. (2000). Ensayos de germinación en semillas de *Fouquieria purpusii* Brandegees. *Revista Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 45.
10. Contreras Quiroz, M., & Pando Moreno, M., & Jurado, E. (2015). Seed germination of plant species from semiarid zones after hydration–dehydration treatments. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, XIV (1), 41-50.
11. Contreras-Quiroz, M., Pando-Moreno, M., Jurado, E., Flores, J., Bauk, K., & Gurvich, D. E. (2016). Is seed hydration memory dependent on climate? Testing this hypothesis with Mexican and Argentinian cacti species. *Journal of Arid Environments*, 130, 94-97.

12. Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., & Toledano, M. B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*, 111(4), 471-481.
13. Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos tropicales*, 31(1), 74-85.
14. Dubrovsky, J.G. (1996). Seed hydration memory in Sonoran desert cacti and its ecological implication. *American Journal of Botany* 83, 624–632.
15. Dubrovsky, J.G. (1998). Discontinuous hydration as a facultative requirement for seed germination in two cactus specie of the Sonoran Desert. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 33-39.
16. Evenari, M. (1985). Adaptations of plants and animals to the desert environment. In M. Evenari, I. Noy-Meir & D. W. Goodall (Eds.), *Ecosystems of the world: Hot deserts and arid shrublands* (pp. 79-92). Amsterdam.
17. Fercha, A., Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Samperi, R., Stampachiachchiere, S., & Laganà, A. (2014). Comparative analysis of metabolic proteome variation in ascorbate-primed and unprimed wheat seeds during germination under salt stress. *Journal of proteomics*, 108, 238-257.
18. Flores, J., Pérez-Sánchez, R. M., & Jurado, E. (2017). The combined effect of water stress and temperature on seed germination of Chihuahuan Desert species. *Journal of arid environments*, 146, 95-98.
19. Godínez-Álvarez T. Valverde and P. Ortega-Baes Bot H. Godínez-Álvarez, (2003). Demographic trends in the Cactaceae., *Rev.*, 69 (2003), pp. 173-201.
20. Guzmán, L. U. (2009). Cactáceas mexicanas. Tesis, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 136 p.
21. Guzmán, L. U., S. Arias y P. Dávila. (2007). Catálogo de cactáceas mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F. 315 p.
22. Hernández, H. M. y H. Godínez. (1994). Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26:33-52.
23. Heydecker, W.; Coolbear, P. (1977). Seed treatments for improved performance survey and attempted prognosis. *Seed Science Technology*, 5: 353-425.
24. Jiménez Sierra Cecilia L. (2011). Las cactaceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*. UNAM

25. Li, H., Jiang, H., Bu, Q., Zhao, Q., Sun, J., Xie, Q., & Li, C. (2011). The Arabidopsis RING finger E3 ligase RHA2b acts additively with RHA2a in regulating abscisic acid signaling and drought response. *Plant physiology*, 156(2), 550-563.
26. Lima, A. T., & Meiado, M. V. (2018). Effect of hydration and dehydration cycles on *Mimosa tenuiflora* seeds during germination and initial development. *South African Journal of Botany*, 116, 164-167.
27. López-Urrutia, E., Martínez-García, M., Monsalvo-Reyes, A., Salazar-Rojas, V., Montoya, R., & Campos, J. E. (2014). Differential RNA-and protein-expression profiles of cactus seeds capable of hydration memory. *Seed Science Research*, 24(2), 91-99.
28. Loza-Cornejo, S., López-Mata, L., & Terrazas, T. (2008). Morphological seed traits and germination of six species of *Pachycereus* (Cactaceae). *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 10(0), 71-84.
29. Martínez-Cortés, M., Manzanero-Medina, G. I., & Lustre-Sánchez, H. (2017). Las plantas suculentas útiles de Santo Domingo Tonalá, Huajuapán, Oaxaca, México. *Polibotánica*, (43), 321-348.
30. Mihalte, L., Sestras, R. E., & Feszt, G. (2011). Methods to improve seed germination of Cactaceae species. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17(3), 288-295.
31. Monsalvo-Reyes C. A., Ortiz-Sanchez J. R., Martinez-Garcia m., Salazar Rojas V.M., Campos Contreras J.E. (2019). Efecto de ciclos hidratación-deshidratación durante la germinación en semillas del género *Ferocactus*. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química* 2019. Universidad Autónoma de México, 5 (5), 166-171.
32. Monsalvo-Reyes C. A., Ortiz-Sanchez J. R., Martinez-Garcia m., Salazar Rojas V.M., Campos Contreras J.E. (2019). Estandarización de RT-PCR durante la expresión diferencial de genes en el proceso de hidratación-deshidratación de *Ferocactus peninsulæ* y *Ferocactus recurvus*. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química* 2019. Universidad Autónoma de México, 5 (5), 628-634.
33. Nobel, P. S. (2002). *Cacti: biology and uses*. Univ of California Press.
34. Pérez-Sánchez, R. M., Jurado, E., Chapa-Vargas, L., & Flores, J. (2011). Seed germination of Southern Chihuahuan Desert plants in response to elevated temperatures. *Journal of Arid Environments*, 75(10), 978-980.
35. Raynal, M., Depigny, D., Cooke, R., & Delseny, M. (1989). Characterization of a radish nuclear gene expressed during late seed maturation. *Plant physiology*, 91(3), 829-836.

36. Ren, J., & Tao, L. (2003). Effect of hydration–dehydration cycles on germination of seven Calligonum species. *Journal of Arid Environments*, 55(1), 111-122.
37. Ruttanaruangboworn, A., Chanprasert, W., Tobunluepop, P., & Unwin, D. (2017). Effect of seed priming with different concentrations of potassium nitrate on the pattern of seed imbibition and germination of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of integrative agriculture*, 16(3), 605-613.
38. Semarnat (2016). Recopilado de:
<https://www.gob.mx/semarnat/articulos/cactaceas-riqueza-natural-de-mexico>
39. Santini, B. A., Rojas-Aréchiga, M., & Morales, E. G. (2017). Priming effect on seed germination: Is it always positive for cacti species?. *Journal of Arid Environments*, 147, 155-158.
40. Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica (SCDB), (2009). *Informe sobre la Conservación de las Especies Vegetales: Una revisión de los progresos realizados en la aplicación de la Estrategia Mundial para la Conservación de Plantas* (GSPC). pp 48.
41. Suárez, D., & Melgarejo, L. M. (2010). Biología y germinación de semillas. *Experimentos en fisiología vegetal*, 13-24.
42. Talonia M., C., Téllez-Valdés, O., & Murguía-Romero, M. (2014). Las cactáceas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México: estimación de la calidad del muestreo. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85(2), 436-444.
43. Yan, M. (2015). Seed priming stimulate germination and early seedling growth of Chinese cabbage under drought stress. *South African Journal of Botany*, 99, 88-92.
44. Yang, G., Nakamura, H., Ichikawa, H., Kitano, H., & Komatsu, S. (2006). OsBLE 3, a brassinolide-enhanced gene, is involved in the growth of rice. *Phytochemistry*, 67(14), 1442-1454.

ANEXOS

Efecto de ciclos hidratación-deshidratación durante la germinación en semillas del género *ferocactus*

C. Monsalvo-Reyes*, J. R. Ortiz-Sanchez., M Martinez-Garcia., V.M. Salazar Rojas., J.E. Campos Contreras.

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Unidad de Biología y Prototipos. Laboratorio de Bioquímica Molecular. Av de los Barrios No1. Los Reyes Iztacala. Tlalnepantla. Edo de Méx. C.P. 54090

*Autor para correspondencia: reyesac2001@gmail.com

Recibido:

16/julio/2019

Aceptado:

20/octubre/2019

Palabras clave:

Ferocactus recurvus,
Germinación, Memoria de
Hidratación.

Keywords:

Ferocactus recurvus,
Germination, Memory
Hydration.

RESUMEN

El proceso de germinación para la planta es una etapa arriesgada durante su ciclo de vida, en especial para aquellas pertenecientes a zonas áridas como ocurre con las cactáceas, que pasan por períodos discontinuos de hidratación, por lo que, la memoria de hidratación es un proceso vital y una adaptación natural para estas plantas. En el presente trabajo se utilizaron las semillas de *E. grusonii*, *F. clausen*, *F. peninsulae*, *F. pilosus*, *F. recurvus*; de las cuales únicamente la última de estas evidenció dicho fenómeno al expresar curvas de germinación similares a *F. peninsulae*, planta que en el 2014 fue confirmada la presencia de este proceso; la temperatura, además del agua, fue un factor de restricción en los ensayos, al someter a las especies a distintas temperaturas que afectaron en mayor medida la germinación conforme esta disminuyó.

ABSTRACT

The germination process for the plant is a risky stage during its life cycle, especially for those belonging to arid areas such as cacti, which go through discontinuous periods of hydration, so hydration memory is a process vital and a natural adaptation for these plants. In the present work the seeds of *E. grusonii*, *F. clausen*, *F. peninsulae*, *F. pilosus*, *F. recurvus* were used; of which only the last of these evidenced this phenomenon by expressing germination curves similar to *F. peninsulae*, a plant that in 2014 was confirmed the presence of this process; temperature, in addition to water, was a restriction factor in the tests, by subjecting the species to different temperatures that affected germination to a greater extent as it decreased.

Introducción

Las plantas son una parte vital de la biodiversidad convirtiéndose en un recurso esencial del planeta, teniendo suma importancia económica, cultural, alimenticia, medicinal, etc., a nivel mundial; debido a esto han tenido un desarrollo antropocéntrico (SCDB, 2009). México es un país megadiverso, en el que 60% de su territorio es árido o semi desértico, permitiendo así, el desarrollo de un gran número de cactáceas, por lo que posee más de la mitad de las casi 2,000 variedades de cactáceas y suculentas registradas ante la Red Mundial de Reservas de Biosfera de la Unesco y un alto índice de endemismo a nivel genérico (73%) y especie (78%) (Hernández y Godínez, 1994). Entre la diversidad presente de la familia cactaceae podemos destacar los cactus columnares (viejitos y tetechos); los cactus candelabroiformes (cardones, órganos y pitayas); las biznagas y biznaguitas (chilitos); algunas trepadoras como los nopalillos (*Helicocereus* spp.); las pitahayas (*Hylocereus* spp.), y una gran variedad de nopales, entre otras, refiriéndonos a la zona del valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla (Jiménez, 2011).

Las cactáceas al ser plantas angiospermas presentan la formación, dispersión y germinación de semillas, como eventos fundamentales en el ciclo de vida; fungiendo con la función de multiplicar y perpetuar la especie; por lo tanto, es el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores (Doria, 2010). La semilla es una unidad reproductiva compleja, que en especies de zonas áridas han desarrollado estrategias para germinar con poca humedad disponible y prolongadas sequías. Se ha reportado que semillas de algunas cactáceas pertenecientes al género *Ferocactus* responden a eventos de humedad discontinuos ("memoria de hidratación"), debido que en algunas especies se acorta el tiempo de germinación después de tratamientos de deshidratación comparado con tratamientos de humedad constante. Al ser el agua un factor limitante en los ambientes áridos, ésta juega un papel clave en la germinación de las plantas (Evenari, 1985) por lo que es un proceso de transición arriesgada para la semilla, sobre todo en este tipo de ambientes secos al no ser estables los periodos de humedad que se recibe (Dubrovsky, 1996; Cervantes y Martínez, 2000; López et al, 2014; Contreras et al, 2015).

Por otra parte, la propagación de plantas por medio de semillas es de gran importancia ecológica debido a que interviene en gran parte en el mantenimiento de la diversidad genética de las especies (Dubrovsky, 1998), por lo que, el presente trabajo tiene la finalidad de identificar el efecto de ciclos de hidratación-deshidratación en semillas del género *Ferocactus*.

Metodología

Se realizó la estandarización de técnicas para germinación en semillas de *E. grusonii* (Zacatecas, 2016), *F. clausen* (Zacatecas, 2018), *F. peninsulæ* (Baja California, 2014), *F. pilosus* (Zacatecas, 2017), *F. recurvus* (Puebla, 2018); estableciendo la elaboración de 3 ensayos: T=15°C con fotoperiodo controlado (12 horas día/noche), T=25°C con fotoperiodo del laboratorio y T=35°C con fotoperiodo controlado (12 horas día/noche); todos con una humedad relativa constante del 60-65%.

Para cada uno de los ensayos, fueron extraídas 50 semillas de su fruto, separándolas de la pulpa para realizar un lavado de ellas, escarificándolas con solución de hipoclorito de sodio al 30% por 15 minutos y después fueron enjuagadas con agua hasta retirar por completo la solución; por especie se utilizaron dos cajas (una correspondiente al tratamiento de hidratación-deshidratación (HD) y otra al Control) con 25 semillas cada una, la caja petri fue revestida previamente con una capa de papel filtro humedecido con 6ml de agua destilada, preparadas las cajas fueron selladas con epack para evitar la pérdida de humedad al interior.

Tratamiento de semillas

El tratamiento fue sujeto a un solo ciclo de HD (hidratación-deshidratación) que consiste en incubarlas bajo condiciones de germinación durante 3 días, desecación por 4 días en oscuridad total al envolver la caja petri con aluminio y finalmente se colocaron de nuevo en condiciones de germinación. Mientras que las semillas correspondientes al tratamiento control siempre mantuvieron las condiciones de germinación.

El tiempo medio de germinación fue calculado con $\frac{\sum G_i i}{\sum G_i}$, donde i es el día uno de germinación y G_i es el número de semillas germinadas en el día 1 (Dubrovsky, 1996).

Separación de muestras

Las muestras fueron colocadas en tubos eppendorf para ser congeladas hasta la extracción de RNA de acuerdo a los siguientes tiempos:

1. T. cero: Después de ser escarificadas las semillas
2. T. deshidratación: Cuando el tratamiento se retiró de condiciones de germinación
3. T. hidratación: El tratamiento fue colocado en condiciones de germinación
4. T. germinación: La radícula mide medio centímetro

Extracción de RNA

El RNA fue extraído de las muestras congeladas utilizando el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus de la marca ZYMO RESEARCH con 50 -100 mg de semillas, siguiendo el protocolo del fabricante. Finalizada la extracción las muestras fueron congeladas a -70° C.

Resultados y discusión

En el primer ensayo las semillas que se sometieron a baja temperatura (15°C) no generaron las condiciones óptimas para la germinación, causando un lento desarrollo y la proliferación de hongos en las semillas, afectando su desarrollo, tardando en germinar 3 semanas por lo que no fueron incluidas en los análisis posteriores. Por otra parte, el ensayo elaborado a una temperatura de 25° C presentó el mayor porcentaje de germinación (Figura 1), sin embargo, no se observó en los tratamientos de deshidratación una clara evidencia de memoria de hidratación al germinar en un rango mayor de tiempo al esperado (Tabla 1).

Tabla 1. Registro diario correspondiente al ensayo de 25°C; en color azul se indica el tiempo de hidratación, amarillo deshidratación, rosa germinación y verde el total de germinación. Para *F. pilosus* (1C y 1HD), *F. clausen* (2C y 2HD), *F. recurvus* (3C y 3HD), *F. peninsulae* (4C y 4HD) y *E. grusonii* (5C y 5HD).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Tg		
1C																					25	25	
1 HD																						8	8
2C																						25	25
2 HD																						5	12
3C																						11	25
3 HD																						5	15
4C																						2	20
4 HD																						1	6
5C																						5	13
5 HD																						6	6

Sin embargo, *F. recurvus* presentó la mejor curva patrón esperada en relación a *F. peninsulae* como se observa en la Figura 1a al germinar 4 días antes el tratamiento HD que las semillas control; *E. grusonii* fue la especie empleada como control negativo al no pertenecer al género *Ferocactus*, presentó los resultados esperados al verse afectada su germinación al deshidratarse (Figura 2a y 3a). Por otra parte *F. clausen* mantuvo el mismo tiempo de germinación con o sin deshidratación, pero se vio afectado un 50% el número de semillas germinadas en relación con su grupo control; mientras que *F. pilosus* tuvo una ligera disminución en el tiempo de germinación después de tener el tratamiento HD pero de igual manera que *F. clausen* su porcentaje de semillas germinadas se vio afectado (Figura 2a y 3a).

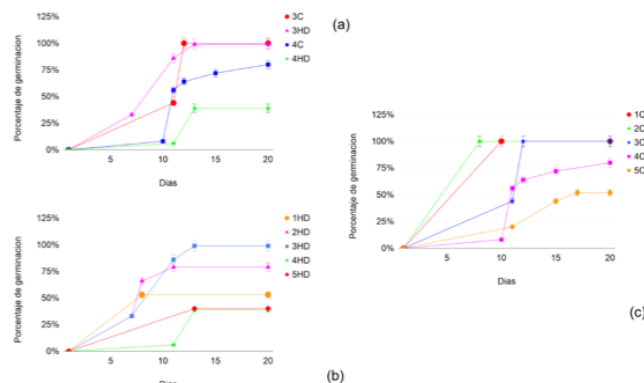


Figura 1. Efecto en la germinación en el ensayo de 25°C, (a) Curvas de germinación comparativas de *F. recurvus* (3C y 3HD) y *F. peninsulae* (4C y 4HD) para muestras Control y HD; en color naranja de observa *F. pilosus*, en rosa *F. clausen*, en azul *F. recurvus*, en verde *F. peninsulae* y en rojo *E. grusonii* (c) Curvas de germinación comparativas de todos los tratamientos control; en color rojo de observa *F. pilosus*, en verde *F. clausen*, en azul *F. recurvus*, en rosa *F. peninsulae* y en naranja *E. grusonii*

El ensayo llevado a cabo a 35°C mostró una disminución en el tiempo de germinación en relación a lo observado en pruebas anteriores (Tabla 1), lamentablemente se presentó el inconveniente de que la germinadora utilizada quemó las cajas por su proximidad a la resistencia que generaba calor, finalizando así el ensayo en su día 13.

Tabla 2. Registro diario correspondiente al ensayo de 35°C; en color azul se indica el tiempo de hidratación, amarillo deshidratación, rosa germinación y verde el total de germinación. Para *F. pilosus* (1C y 1HD), *F. clausen* (2C y 2HD), *F. recurvus* (3C y 3HD), *F. peninsulae* (4C y 4HD) y *E. grusonii* (5C y 5HD).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	TG
1 C														11
1 HD														1
2 C														18
2 HD														5
3 C														11
3 HD														7
4 C														2
4 HD														5
5 C														2
5 HD														0

A esta temperatura se observó la mayor disminución en el tiempo de germinación, siendo más evidente para *F. recurvus* al germinar antes y 10% más que las semillas control (Figura 2b y 2c), por lo que el compararlas con *F. peninsulae* (Figura 2a) se observa presuntamente un proceso de memoria de hidratación, por lo tanto, debe ser corroborado por un análisis genómico.

Por otro lado, *F. pilosus* con esta temperatura tuvo una disminución drástica en el porcentaje de germinación para las semillas que fueron deshidratadas, así como la disminución de la misma (Figura 2b y 2c); *F. clausen* presentó una disminución en el tiempo de germinación, pero también se afectó su porcentaje de semillas germinadas en casi un 50% (Figura 2b y 2c), por lo que estas especies no serán consideradas para un análisis genómico posterior.

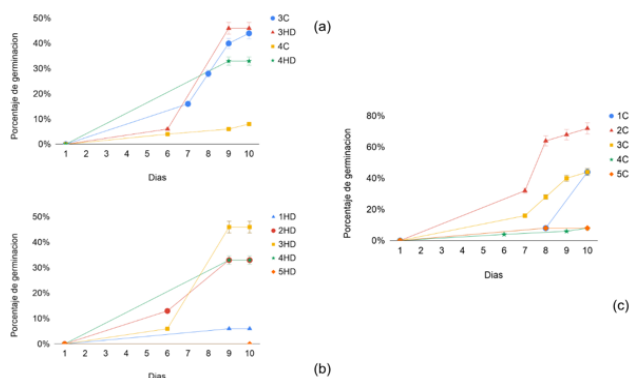


Figura 2. Efecto en la germinación en el ensayo de 35°C, (a) Curvas de germinación comparativas de *F. recurvus* (3C y 3HD) y *F. peninsulæ* (4C y 4HD) para muestras Control y HD. (b) Curvas de germinación comparativas de todos los tratamientos HD; en color azul de observa *F. pilosus*, en rojo *F. clausen*, en amarillo *F. recurvus*, en verde *F. peninsulæ* y en naranja *E. grusonii*. (c) Curvas de germinación comparativas de todos los tratamientos control; en color azul de observa *F. pilosus*, en rojo *F. clausen*, en amarillo *F. recurvus*, en verde *F. peninsulæ* y en naranja *E. grusonii*.

Finalmente, con los datos obtenidos se calculó el tiempo medio de germinación en el que *E. grusonii* obtuvo los valores mayores en comparación a las demás cactáceas; las semillas que tuvieron un menor tiempo medio de germinación fue *F. pilosus*, mientras que *F. recurvus* y *F. peninsulæ* presentaron datos intermedios (Figura 3).

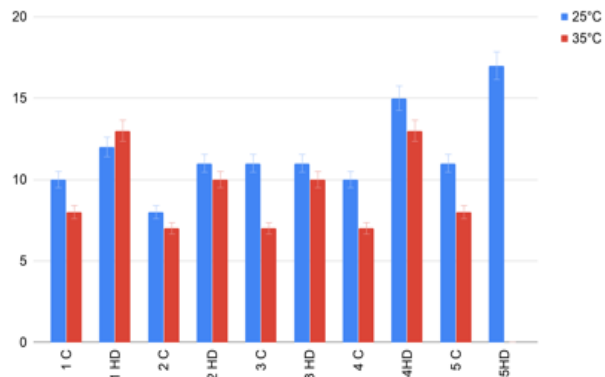


Figura 3. Tiempo medio de germinación expresado en días para *F. pilosus* (1C y 1HD), *F. clausen* (2C y 2HD), *F. recurvus* (3C y 3HD), *F. peninsulæ* (4C y 4HD) y *E. grusonii* (5C y 5HD).

Los ensayos a distinta temperatura mostraron una optimización a 35°C, pero de acuerdo a Castillo en 1986, *F. histrix* presenta una mejor germinación a 25°C; mientras que Flores *et al* en 2017 y Pérez *et al* en 2011 para la misma especie observaron que a 30°C aumenta el porcentaje de germinación, por lo que se puede observar con estas variaciones es que las semillas de *Ferocactus* son muy sensibles a cambios en la temperatura, aumentando el tiempo de germinación al no estar en condiciones óptimas, como se observó al someterlas a 15°C, aunado a esto una vez germinada la semilla si se mantienen temperaturas bajas la plántula se ve muy expuesta a la infección de hongos y al deterioro de la raíz a causa de los mismos.

La escarificación es un paso importante para la germinación *in vitro* de semillas, puesto que permite el ablandamiento de la testa y la permeabilidad a la hidratación y así permitir la activación del embrión presente en la semilla, estudios previos como el realizado por Barrera *et al* en 2014 y Lima-Meiado en 2018, resaltan la importancia de la escarificación, debido una vez realizada, las semillas mejoran la germinación y presenta mayor vigor la radícula en sus primeras etapas de crecimiento; además de esto una correcta escarificación retira de la semilla algunas bacterias y hongos que puedan afectar el desarrollo de la plántula en sus primeras etapas.

La escarificación empleada en este trabajo se encuentra mayormente enfocada a la esterilización del exterior de la semilla por lo que es necesario de igual manera el incorporar a la metodología técnicas que permitan una escarificación completa y que busque simular las condiciones naturales que enfrenta la semilla, como lo realizó Alvarez y Montaña en 1997 al someter a semillas de *F. latispinus* a una escarificación que simulaba la digestión ocurrida en el tracto digestivo de aves (escarificación química) y al arrastre natural que tendría la semilla cuando cae al suelo generada por el aire (escarificación mecánica).

Dubrovsky en 1996 con semillas de *Stenocereus* observó que algunas especies tienen la habilidad de conservar, durante una deshidratación temporal cambios fisiológicos como la expresión proteica, inducido por la hidratación de la semilla, este proceso se le conoce como memoria de hidratación y puede ser replicado *in vitro* al someter a la semilla a tratamientos o ciclos HD. En lo que respecta a estos tratamientos, López *et al* en 2014 estandarizaron ciclos de 4 días de hidratación y 3 días en constante deshidratación que fueron empleados en el presente trabajo, con la modificación de Dubrovsky en 1996 al estresar más las semillas al mantenerlas en oscuridad total durante la deshidratación, esto con la

finalidad hacer más notorio el efecto esperado, teniendo una media de germinación de 10 días, pero Santini *et al* en 2017 en semillas de *Ferocactus* muestran una media de 7 días al tener ciclos de 4 días de hidratación y 1 día de deshidratación, por lo que se es necesario realizar un trabajo posterior para conocer la conformación más óptima de los ciclos HD para semillas de *Ferocactus*.

La modificación de oscuridad realizada a los ciclos HD permite como ya se mencionó previamente, que el efecto de memoria de hidratación sea más evidente pero conforme mayor sea el tiempo en la oscuridad la semilla presenta mayores complicaciones para germinar.

Como lo explican Romero *et al* en 1992 al someter a *F. peninsulae* a distintas condiciones de estrés, la germinación se detiene por completo al dejar la semilla mucho tiempo en oscuridad, además de que también se reduce la germinación al dejar grandes cantidades de tiempo a la semilla sin agua (1 mes), por lo que es necesario tener cuidado al realizar los tratamientos.

De las 3 plantas problema empleadas en este trabajo solamente en *F. recurvus* se observó el patrón con mayor similitud a *F. peninsulae*, la cual en 2014 López *et al* determinaron que presenta el fenómeno de memoria de hidratación por lo que es sumamente probable que *F. recurvus* de igual manera lo presente, para lo que es necesario realizar un perfil de expresión genómica para corroborar estos resultados.

F. recurvus presenta especial importancia puesto que de acuerdo a Martínez *et al* en 2017 esta es una especie con múltiples usos en comunidades de Oaxaca, entre los que se destaca el uso comestible, ceremonial y ornamental, por lo que es cultivada por sus habitantes y este proceso de memoria de hidratación podría mejorar su producción, así como el reducir la cantidad de agua necesaria para su germinación y desarrollo.

El efecto de ciclos HD en plantas cactáceas permite que se presente el efecto de memoria de hidratación por lo que esta es una adaptación especial presentada de manera natural a estas plantas para lograr sobrevivir a las condiciones adversas presentes en sus ambientes; esto lo corrobora Contreras *et al* en 2005 al someter a estos ciclos *in vitro* a semillas de plantas no cactáceas, observando así que no mejora la germinación.

Además, este proceso tiene especial importancia para plantas cactáceas como lo observa Armador *et al* al comparar el efecto que tiene en relación a distintos reguladores del crecimiento como AIA, ANA y AG; determinando que el mejor desarrollo se observa en semillas que sufren ciclos HD.

Conclusiones

La temperatura es un factor de importancia para la germinación de las semillas, observando que la mejor germinación se encuentra entre 16 25°C y 30°C dependiendo de la especie a trabajar.

Los ciclos de HD si mejoran la germinación de ciertas semillas de *Ferocactus*, siendo un proceso natural en la semilla

F. pilosus y *F. clausen* no presentan el proceso de memoria de hidratación al no verse mejorada su germinación después de tener un ciclo HD en respecto al grupo control

F. recurvus presentó la mejor curva patrón esperada en base a *F. peninsulae* por lo que es necesario realizar trabajos posteriores para otorgar mayor confiabilidad a este resultado

Referencias

Aguirre M. G. A., Montaña C. (1997). Germinación y supervivencia de cinco especies de cactáceas del Valle de Tehuacán: implicaciones para su conservación. *Acta Botánica Mexicana*, (40), 43-58.

Amador-Alfárez K. A., Díaz-González J., Loza-Cornejo S., Bivián-Castro E. Y. (2013). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica*, (35), 109-131.

Barrera G., Hernandez-Sandoval L. (2014). Estudio de germinación y crecimiento en semillas de *Ferocactus histrix* (De Candolle).

Castillo R. F. (1986). Semillas, germinación y establecimiento de *Ferocactus histrix*. *Cactáceas y Suculentas mexicanas*, 31(1), 5-11.

Cervantes L., Martínez P. (2000). *Ensayos de germinación en semillas de Fouquieria purpusii Brandegeee*. *Revista Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 45.

Contreras Q. M., Pando M. M., Jurado E. (2015). *Seed germination of plant species from semiarid zones after hydration-dehydration treatments*. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, XIV (1), 41-50.

Doria, J. (2010). *Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento*. *Cultivos tropicales*, 31(1), 00-00.

Dubrovsky J.G. (1996). *Seed hydration memory in Sonoran Desert cacti and its ecological implication*. *American Journal of Botany* 83, 624-632.

- Dubrovsky J.G. (1998). *Discontinuous hydration as a facultative requirement for seed germination in two cactus species of the Sonoran Desert. Journal of the Torrey Botanical Society* 125, 33-39.
- Evenari M. (1985). Adaptations of plants and animals to the desert environment. In: M. Evenari, I. Noy-Meir & D. W. Goodall (Eds.), *Ecosystems of the world: Hot deserts and arid shrublands* (pp. 79-92). Amsterdam.
- Flores J., Pérez-Sánchez R. M., Jurado E. (2017). The combined effect of water stress and temperature on seed germination of Chihuahuan Desert species. *Journal of Arid Environments*, 146, 95-98.
- Hernandez H., Godinez H., (1994). *Contribución al conocimiento de cactáceas mexicanas amenazadas. Acta Botánica Mexicana*. Instituto de Biología. UNAM 26:33-52
- International Seed Testing Association. (1985). *International rules for seed testing 1985. Seed Science and Technology* 13, 299-355.
- Jiménez S. C. (2010). *Las cactáceas mexicanas y los riesgos que presentan*. Revista UNAM. México
- Lima A. T., Meiado M. V. (2018). Effect of hydration and dehydration cycles on *Mimosa tenuiflora* seeds during germination and initial development. *South African Journal of Botany*, 116, 164-167.
- López-Urrutia E., Martínez-García M., Monsalvo-Reyes A., Salazar-Rojas V. M., Montoya R., Campos J. E. (2014). *Differential RNA-and protein-expression profiles of cactus seeds capable of hydration memory. Seed Science Research*, 24(2), 91-99.
- Martínez-Cortés M., Manzanero-Medina G. I., Lustre-Sánchez H. (2017). Las plantas suculentas útiles de Santo Domingo Tonalá, Huajuapán, Oaxaca, México. *Polibotánica*, (43), 321-348.
- Martínez-Cortés M., Manzanero-Medina G. I., Lustre-Sánchez H. (2017). Las plantas suculentas útiles de Santo Domingo Tonalá, Huajuapán, Oaxaca, México. *Polibotánica*, (43), 321-348.
- Romero-Schmidt H. L., Vega-Villasante F., Nolasco H., Montaña C. (1992). The effect of darkness, freezing, acidity and salinity on seed germination of *Ferocactus peninsulæ* (Cactaceae). *Journal of Arid Environments*, 23(4), 389-395.
- Santini B. A., Rojas-Aréchiga M., Morales E. G. (2017). Priming effect on seed germination: Is it always positive for cacti species. *Journal of Arid Environments*, 147, 155-158.
- Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica (2009). *Informe sobre la Conservación de las Especies Vegetales: Una revisión de los progresos realizados en la aplicación de la Estrategia Mundial para la Conservación de Plantas* (GSPC). pp 48.



Estandarización de RT-PCR durante la expresión diferencial de genes en el proceso de hidratación-deshidratación de *Ferocactus peninsulæ* y *Ferocactus recurvus*

Monsalvo Reyes Alejandro Cruz, Ortiz-Sánchez José Roberto*, Martínez-García Martha, Salazar Rojas Víctor Manuel, Campos Contreras Jorge Eduardo

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Unidad de Biología y Prototipos. Laboratorio de Bioquímica Molecular. Av de los Barrios No1. Los Reyes Iztacala. Tlalnepantla. Edo. de Méx. C.P. 54090.

*Autor para correspondencia: r.ortz97@gmail.com

Recibido

21/agosto/2019

Aceptado

28/octubre/2019

Palabras clave:

Ferocactus, RT-PCR, Expresión diferencial.

Keywords:

Ferocactus, RT-PCR, Differential expression.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue estandarizar la técnica de RT-PCR para la expresión diferencial de genes durante la germinación de *F. peninsulæ* y *F. recurvus* con tiempos de hidratación-deshidratación. Se empleó cDNA obtenido previamente a distintos tiempos de germinación con un tratamiento de hidratación y deshidratación. Previo a la estandarización, se diseñaron los iniciadores a utilizar por medio del programa primer3 para posteriormente evaluar su calidad junto con la de cDNA, la RT-PCR se llevó a cabo con kits comerciales. Se amplificaron regiones de los genes CASP, ULP, SEEP, LEAP, FEER, TRXH, junto con ACTINA para cactáceas como testigo. Los resultados de la RT-PCR determinaron en relación a la expresión de actina y la técnica fue capaz de reconocer diferencias de expresión entre cada tiempo gen y especie.

ABSTRACT

The objective of this study was to standardize the RT-PCR technique for differential gene expression during germination of *F. peninsulæ* and *F. recurvus* with hydration dehydration times. CDNA previously obtained at different germination times was used with a hydration and dehydration treatment. Prior to standardization, the first ones to be used were designed through the primer program to subsequently evaluate their quality along with that of the cDNA. The RT-PCR was carried out with commercial kits. Regions of the CASP, ULP, SEEP, LEAP, FEER, TRXH genes were amplified, along with ACTINA for cacti as control. The results of the RT-PCR were determined in relation to actin expression and the technique was able to recognize differences in expression among each time, gene and species.

Introducción

Las cactáceas son una familia de plantas con flores que presentan un amplia variedad y distribución en México, teniendo la región de Tehuacán-Cuicatlán en Puebla y Oaxaca como uno de los principales puntos de distribución, albergando por lo menos a 81 especies, de las cuales el 25% son endémicas de la zona y muchas de ellas están amenazadas debido a que son extraídas ilegalmente para ser comercializados (Semarnat, 2016). Éstas al ser plantas angiospermas presentan formación y dispersión de semillas como eventos fundamentales de su ciclo de vida, con la función de multiplicar y perpetuar la especie; por lo tanto, es el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores (Doria, 2010) y con suma importancia ecológica al intervenir en gran parte del mantenimiento de la diversidad genética de las especies (Dubrovsky, 1998).

La semilla es una unidad reproductiva compleja, que en especies de zonas áridas ha desarrollado estrategias para germinar con poca humedad disponible y prolongadas sequías; al ser el agua un factor limitante en estos ambientes, juega un papel clave en la germinación de cactáceas en zonas áridas (Evenari, 1985), por lo que es un proceso de transición arriesgada para la semilla, sobre todo al no tener periodos estables de humedad (Cervantes y Martínez, 2000). Se ha reportado que semillas de algunas cactáceas pertenecientes al género *Ferocactus* responden a eventos de humedad discontinuos (“memoria de hidratación”) como una forma de adaptación, debido que en algunas especies se acorta el tiempo de germinación después de tratamientos de deshidratación comparado con tratamientos de humedad constante (Dubrovsky, 1996; Contreras et al., 2015; Contreras et al., 2016; Lima y Meiado, 2018; Ren y Tao, 2003; Ruttanaruangboworn et al., 2017; Santini et al., 2017; Yan, 2015).

Al representar esta importancia la memoria hidratación en un trabajo previo se buscó la descripción de eventos a nivel molecular que mejoran la germinación después de ciclos Hidratación-Deshidratación (López-Urrutia et al., 2014), dilucidando la posible participación algunos genes, como LEA1_ORYSI cuya función radica en la embriogénesis tardía y expresarse en momentos de estrés participando durante el proceso conocido como “priming” (Fercha et al., 2014), encontrándose presente el gen incluso en *Escherichia coli* en momentos de estrés hídrico (Rakhra et al., 2017) ; SSG2 AVESA 12S encargado del almacenamiento de nutrientes en la semilla; TRX1 evitando la oxidación, involucrándose en múltiples procesos celulares reduciendo el estrés hídrico al

facilitar el agua en las vacuolas (Welsh et al., 2002), sin embargo es necesario realizar más trabajos en este ámbito al no ser estudiados todos los genes participantes como RHA2A_ARATH, SEEP RAPS, FDX 3, BLE3_ORYSI, para los cuales únicamente se tiene información de su posible funcionamiento, como es el caso de SEEP RAPS (Late seed maturation protein P8B6) gen involucrado en la sobrevivencia de la semilla manteniendo un nivel mínimo de hidratación evitando la desnaturalización de los componentes citoplasmáticos; RHA2A_ARATH (E3 ubiquitin-protein ligase RHA2A) que se involucra en la regulación positiva del Ácido Abscísico (ABA) y respondiendo a cambios salinos y estrés osmótico durante la germinación y desarrollo temprano de la plántula; BLE3_ORYSI (CASP-like protein BLE3) involucrado en la elongación celular. Debido a que la actividad de estos genes se relaciona con el estrés hídrico y elongación celular, su expresión puede verse afectada cuando la semilla se encuentra en hidratación discontinua, por lo tanto es posible evidenciar de igual manera la presencia de esta adaptación en otras especies del mismo género.

Se conocen diversas técnicas para trabajar a nivel molecular pero la PCR de transcripción inversa o RT-PCR, permite el uso de RNAm como molde logrando observar la expresión que se tiene en cada gen a distintos tiempos. El RNAm se transcribe de forma inversa en DNA complementario (cDNA) utilizando una transcriptasa inversa siendo así este el iniciador paso de RT-PCR, además la transcriptasa inversa también tiene una función de RNasa H, que degrada la porción de RNA inicial; la eficiencia de la reacción de la iniciadora cadena puede afectar al proceso de amplificación. A partir de aquí, se utiliza el procedimiento de PCR cuantitativo o en tiempo real para amplificar el cDNA (Cortázar y Silvia, 2004; Neidler, 2017). Por lo que, el presente trabajo tiene la finalidad de estandarizar la técnica de RT-PCR para la expresión diferencial de genes durante la germinación de *F. peninsulæ* y *F. recurvus* con ciclos de hidratación-deshidratación.

Metodología

Obtención de muestras biológicas

Se germinaron semillas de *F. peninsulæ* (Baja California, 2014) como grupo testigo y de *F. recurvus* (Puebla, 2018) como grupo experimental; con fotoperiodo controlado (12 horas día/noche) a una temperatura de 30°C y humedad relativa constante del 60-65%. Se extrajeron 50 semillas de su fruto, separándolas de la pulpa para realizarles un lavado, escuriéndolas con solución de NaClO (Hipoclorito de Sodio) al 30% por 15 minutos y

después se enjuagaron con agua destilada hasta retirar por completo la solución; por especie se utilizaron dos cajas (una correspondiente al tratamiento de hidratación-deshidratación (HD) y otra al testigo que permaneció en condiciones constantes de germinación) con 25 semillas cada una, la caja petri fue revestida previamente con una capa de papel filtro humedecido con 6ml de agua destilada, colocadas las semillas en las cajas, fueron selladas con plástico adherible para evitar la pérdida de humedad al interior.

El tratamiento fue sujeto a un solo ciclo de hidratación-deshidratación que consiste en incubarlas bajo condiciones de germinación durante 3 días, desecación (pérdida de condiciones de germinación) por 4 días en oscuridad total al envolver la caja petri con aluminio y finalmente se colocaron nuevamente en condiciones de germinación. Las semillas correspondientes al tratamiento control siempre mantuvieron las condiciones de germinación.

Las muestras se colocaron en tubos eppendorf y congeladas hasta la extracción de RNA mensajero de acuerdo con los siguientes tiempos:

- 0 días: Después de ser escarificadas las semillas (T0)
- 4 días: Cuando el tratamiento se retiró de condiciones de germinación (TD)
- 7 días: El tratamiento fue colocado en condiciones de germinación (TH)
- Germinación: La radícula mide medio centímetro

Extracción de RNA mensajero y síntesis de cDNA

El RNA mensajero se extrajo de muestras de semillas de *F. recurvus* y *F. peninsulae* congeladas utilizando el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus de la marca ZYMO RESEARCH con 50 -100 mg de semillas, siguiendo el protocolo del fabricante.

Finalizada la extracción se realizó la síntesis de cDNA con el kit Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase siguiendo el protocolo del fabricante, las muestras fueron congeladas a -70° C.

Diseño de Iniciadores

Se realizó el diseño de iniciadores para las secuencias de los genes LEA1_ORYSI (iniciador LEAP), BLE3_ORYSI (iniciador CASP), SSG2_AVESA 12S (iniciador SSG), RHA2A_ARATH (iniciador UPL), SEEP RAPSA (iniciador SEEP), FDX 3 (iniciador FEER) y TRX1 (iniciador TRXH) por medio del *programa primer 3* en el cual se establecieron las siguientes condiciones para la

obtención de amplicones de 80-120 pb: Tm= 60°, GC%=50; se utilizó iniciador de Actina para cactáceas como testigo (housekeeping) en los ensayos.

PCR punto final

Se llevaron a cabo reacciones de PCR punto final para ensayar el diseño de los iniciadores y la calidad del cDNA obtenido en un trabajo previo, utilizando el Kit MyTaq DNA polymerase con un volumen final de 10ul, siendo aforado con agua grado molecular, la reacción se realizó con el siguiente programa en el termociclador T100 BIO-RAD: un minuto a 95°C, seguido de 40 ciclos compuestos por 30 segundos a 94°, 20 segundos a 57° y 30 segundos a 74°C, finalmente 8 minutos a 74°. Los amplicones obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% con regulador TBE 1X y teñido con Midori Green Advance en una cámara de electroforesis corriendo durante 20 minutos a 70V.

RTq-PCR

Obtenidos los geles de agarosa con los amplicones esperados se realizó RTq-PCR por triplicados utilizando el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix con reacciones de 10µl con 0.5µl de cDNA por reacción, en un termociclador StepOne™ Real-Time PCR System con el siguiente programa: ciclo inicial de 95°C durante 10 minutos, seguido por 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 95°C durante 15 segundos. Los datos fueron analizados con el software LibRe PCR: Analysis of quantitative RT-PCR Data.

Resultados y discusión

Utilizando el cDNA obtenido de los transcritos, se comprobó la actividad correspondiente a los diferentes genes por la presencia del producto de PCR amplificado en geles de agarosa (figura 1-5); obteniendo amplicones de tamaño (120 pb), pureza y concentración requerido a los distintos tiempos evaluados: 0 días (To) 4 días (Td) 7 días (Th), tiempo de germinación HD (TgHD) y tiempo de germinación grupo testigo (TgC).

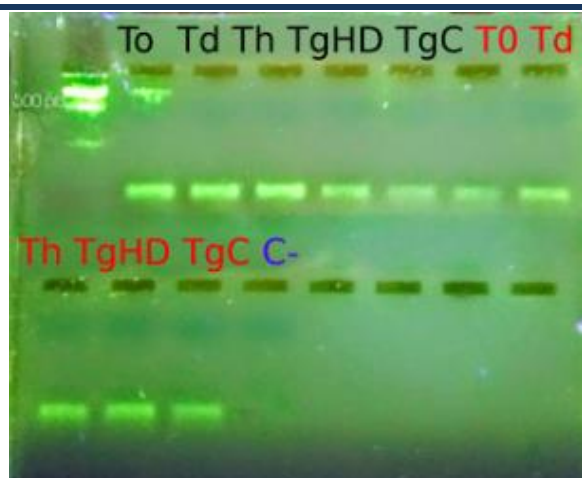


Figura 1. Productos de PCR correspondientes al iniciador SSG en distintos tiempos para ambas especies. *F. recurvus* en color negro, *F. peninsulae* color rojo y testigo negativo en azul.

El iniciador SSG presenta una expresión con menor variación entre tiempos y especies (figura 1), mientras que el iniciador de Actina (figura 2) para el caso de *F. recurvus* tiene una expresión disminuida en el tiempo de deshidratación (Td), esto no ocurre de igual manera con *F. peninsulae*, la cual únicamente para el To presenta nula expresión que posiblemente sea ocasionada por un error metodológico.

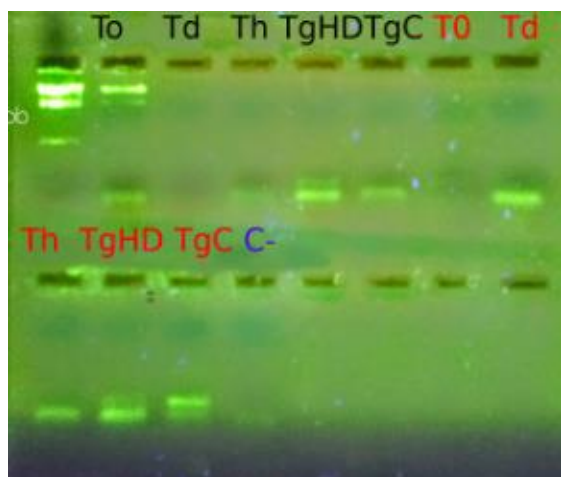


Figura 2. Productos de PCR correspondientes al iniciador Actina en distintos tiempos para ambas especies. *F. recurvus* en color negro, *F. peninsulae* color rojo y testigo negativo en azul.

El iniciador del gen LEAP (figura 3) presenta para ambas especies una disminución en la actividad durante el To, por lo que su actividad se ve referenciada a una etapa posterior cuando la semilla esta siendo hidratada.

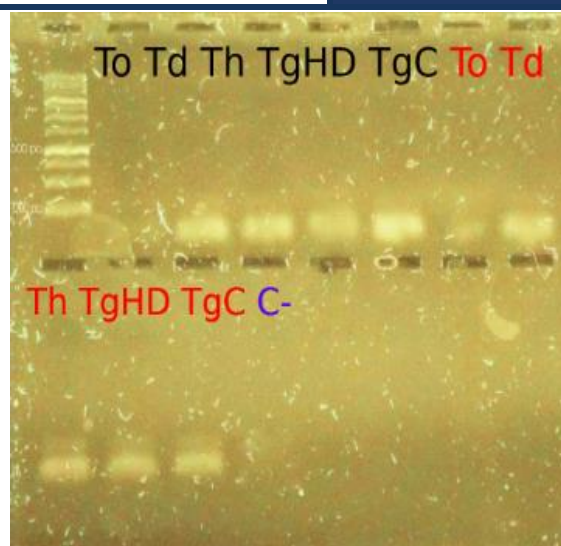


Figura 3. Productos de PCR correspondientes al iniciador LEAP en distintos tiempos para ambas especies. *F. recurvus* en color negro, *F. peninsulae* color rojo y testigo negativo en azul.

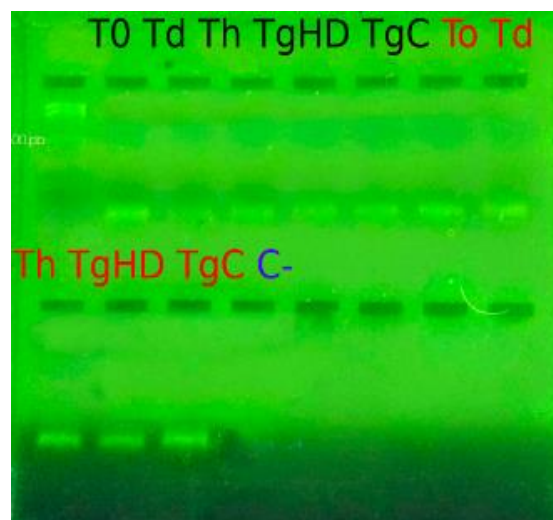


Figura 4. Productos de PCR correspondientes al iniciador UPL en distintos tiempos para ambas especies. *F. recurvus* en color negro, *F. peninsulae* color rojo y testigo negativo en azul.

Los iniciadores UPL (figura 4) y CASP (figura 5) presentan una expresión similar en los distintos tiempos evaluados en el presente trabajo, sin embargo, para el iniciador CASP se tiene una mayor cantidad de transcritos en *F. recurvus* que en *F. peninsulae*; mientras que el iniciador UPL presenta una expresión inversa para las especies.

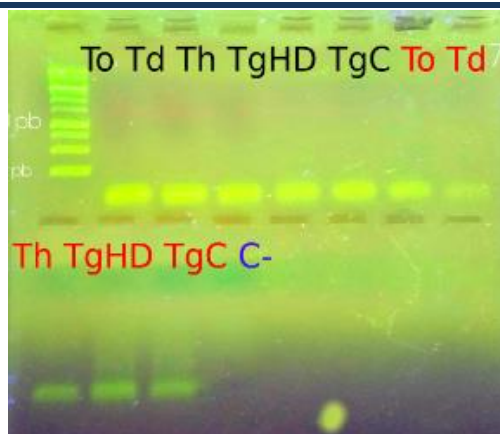


Figura 5. Productos de PCR correspondientes al iniciador CASP en distintos tiempos para ambas especies. *F. recurvus* en color negro, *F. peninsulae* color rojo y testigo negativo en azul.

Con la técnica de RT-PCR se observó contaminación continua en los iniciador LEAP y SSG a pesar del reemplazo de reactivos, por lo que se realizó un ensayo sin cDNA mostrando que existe contaminación en los iniciadores (figura 6).

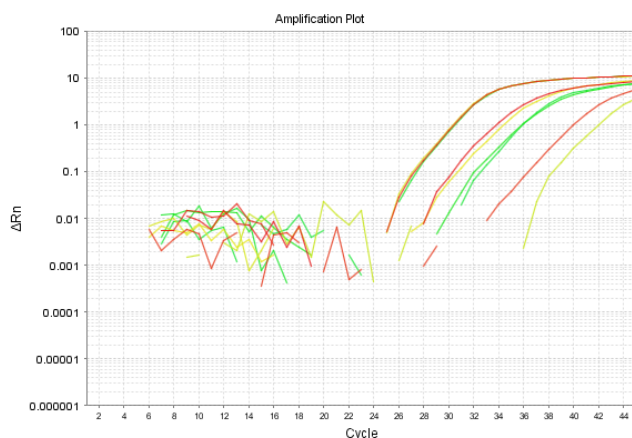


Figura 6. Contaminación de los iniciador LEAP y SSG detectada por el equipo de RT-PCR

Mediante mapas de expresión (Heat maps) se muestra que las condiciones de estandarización fueron óptimas para la amplificación de cDNA por medio de RT-PCR (figura 7), mostrando a la vez la relación entre iniciadores y tiempos. Por otro lado al representarlos con barras (figura 8) se presenta un comportamiento similar al obtenido en el mapa de expresión.

Los resultados del presente estudio indican que la reacción de RT-PCR se efectuó dentro de los parámetros aceptables establecidos por Cortázar y Silvia en 2004 para este tipo de metodología. Aunque en este estudio no se determinaron las causas de las diferencias en la

expresión lo cual es posible que se deba a las necesidades biológicas o a las condiciones ambientales distintas que presenta cada especie empleada en el trabajo, mediante mapas de expresión se observó la diferencia en el nivel de expresión de cada uno de los iniciadores, TXNH y SEEP fueron los que presentaron una mayor diferenciación con respecto a los demás para *F. peninsulae* y *F. recurvus* respectivamente, por lo tanto es necesario un trabajo más profundo para dilucidar la presencia de memoria de hidratación en *F. recurvus*.

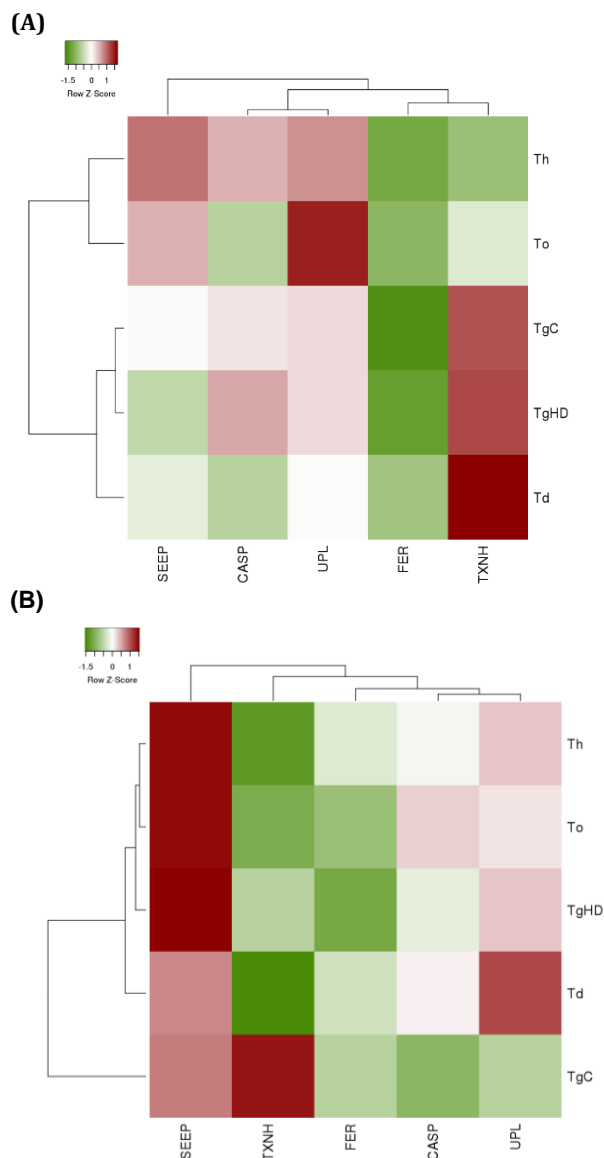
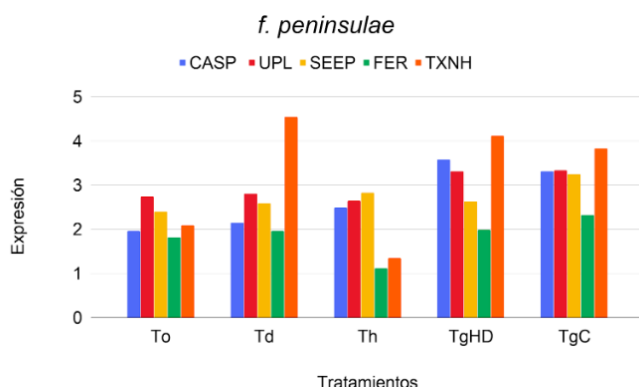


Figura 7. Mapas de expresión. Expresión de los iniciadores presentes en la respuesta de memoria de hidratación con respecto a su expresión a Actina para cactáceas en **A.** *F. peninsulae* y **B.** *F. recurvus*.

(A)



(B)

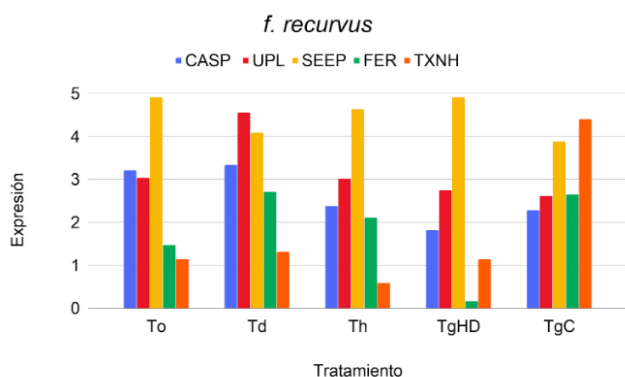


Figura 8. Expresión respecto al iniciador de actina, en azul se observa el iniciador CASP, en rojo UPL, en amarillo SEEP, en verde FER y en naranja TXNH para **A.** *f. peninsulae* y **B.** *F. recurvus*.

El uso de esta técnica permite realizar estudios de expresión diferencial en el género *Ferocactus* para conocer los genes involucrados en las diferentes etapas cuando se presenta memoria de hidratación, al lograrse la normalización de técnicas tales como la amplificación de los transcritos en semillas al tener un ciclo de HD; esto a pesar de que en la actualidad esta técnica es utilizada principalmente para el diagnóstico y detección de virus, así como de levaduras (Bowers et al., 2008; Castro et al 2012; Chiok et al. 2011; González, 2016).

Esta técnica tiene la ventaja de permitir tipificar el desarrollo de germinación con una alta sensibilidad y especificidad, de acuerdo a Sánchez et al., 2000. En el trabajo realizado no se hicieron cálculos de sensibilidad ni especificidad de la prueba con los diferentes genes, lo cual fue una limitante para la estandarización. Los resultados de este estudio, hacen evidente la necesidad de realizar otros experimentos que incluyan un mayor

número de muestras distribuidos por días y no por tiempo, así como muestras completas del grupo testigo.

Conclusiones

La técnica de RT-PCR validada en el presente trabajo, posee las condiciones óptimas para el buen funcionamiento de los iniciadores evaluados para *F. peninsulae* y *F. recurvus*.

Debe incorporarse una mayor cantidad de muestras debido al contener escasas muestras del grupo testigo el análisis final puede verse sesgado al interpretar el comportamiento natural del gen; así como contar el tiempo en días, para manejar de esta forma los datos con una veracidad mayor y puedan ser interpretados con una mayor facilidad.

Referencias

- Bowers R. M., LaPatra S. E., Dhar A.K., (2008). Detection and quantification of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. *J Virol Methods*, 147:226-234.
- Castro G., Manchego A., Chiok K. L., Sandoval N., More J., Ramírez M., Rivera, H. (2012). Estandarización de la técnica RT-PCR tiempo real para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 4:491-498.
- Cervantes L., Martínez P. (2000). Ensayos de germinación en semillas de *Fouquieria purpusii* Brandege. *Revista Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 45:52-61.
- Chiok K. L., Manchego A., Rivera H., Sandoval Ch.N., Ramírez, M. (2011). Estandarización y validación de la técnica RT-PCR cualitativa en tiempo real para la detección del virus de la peste porcina clásica. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, RIVEP*, 22:377-387.
- Contreras Q. M., Pando M. M., Jurado E. (2015). Seed germination of plant species from semiarid zones after hydration-dehydration treatments. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 1:41-50.
- Contreras-Quiroz M., Pando-Moreno M., Jurado E., Flores J., Bauk K., Gurvich D. E., (2016). Is seed hydration memory dependent on climate? Testing this hypothesis with Mexican and Argentinian cacti species. *Journal of Arid Environments*, 130:94-97.
- Cortázar M. A., Silvia R. E., P. (2004). Métodos Físico-Químicos en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Page. 17-27.

- Doria J., (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos tropicales*, 31:74-85.
- Dubrovsky J. G., (1996). Seed hydration memory in Sonoran desert cacti and its ecological implication. *American Journal of Botany.*, 83:624-632.
- Dubrovsky J. G., (1998). Discontinuous hydration as a facultative requirement for seed germination in two cactus species of the Sonoran Desert. *Journal of the Torrey Botanical Society.*, 25: 33-39.
- Evenari M., (1985). Adaptations of plants and animals to the desert environment. In M. Evenari, I. Noy-Meir & D. W. Goodall (Eds.), *Ecosystems of the world: Hot deserts and arid shrublands*. Amsterdam. p. 79-92.
- Fercha A., Capriotti A. L., Caruso G., Cavaliere C., Samperi R., Stampachiachiere S., Laganà A. (2014). Comparative analysis of metabolic proteome variation in ascorbate-primed and unprimed wheat seeds during germination under salt stress. *Journal of proteomics.*, 108:238-257.
- González Ll M. J. (2016). Estandarización de técnicas moleculares (RT-PCR E IC-RT-PCR) para el diagnóstico de infección por los principales virus que atacan a las uvas pisqueras del Perú. Tesis de Maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia
- Lima A. T., Meiado M. V. (2018). Effect of hydration and dehydration cycles on *Mimosa tenuiflora* seeds during germination and initial development. *South African Journal of Botany*, 116:164-167.
- López-Urrutia E., Martínez-García M., Monsalvo-Reyes A., Salazar-Rojas V. M., Montoya R., Campos, J. E. (2014). Differential RNA-and protein-expression profiles of cactus seeds capable of hydration memory. *Seed Science Research.*, 2:91-99.
- Neidler S. (2017). What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR, and RT-qPCR?. ENZO. Recuperado el 22 de Abril del 2019 de: <http://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr/>
- Rakhra G., Kaur T., Vyas D., Sharma A. D., Singh, J., Ram, G. (2017). Molecular cloning, characterization, heterologous expression and in-silico analysis of disordered boiling soluble stress-responsive wBsSRP protein from drought tolerant wheat cv. PBW 175. *Plant physiology and biochemistry.*, 112:29-44.
- Ren J., Tao L. (2003). Effect of hydration-dehydration cycles on germination of seven *Calligonum* species. *Journal of Arid Environments.*, 55:111-122.
- Ruttanaruangboworn A., Chanprasert W., Tobunluepop P., Unwin, D. (2017). Effect of seed priming with different concentrations of potassium nitrate on the pattern of seed imbibition and germination of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of integrative agriculture.*, 16:605-613.
- Sánchez F. J. A., Cruz J. E. A., Gutiérrez C. C., Olvera D. P. R., Zavala M. E. M. (2000). Incorporación de la técnica de RT-PCR para la detección del virus sincitial respiratorio. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.*, 13:145-152.
- Santini B. A., Rojas-Aréchiga M., Morales E. G. (2017). Priming effect on seed germination: Is it always positive for cacti species? *Journal of Arid Environments.*, 147:155-158.
- Semarnat (2016). Cactáceas, riqueza natural de México. Recuperado el 17 de Agosto del 2019 de: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/cactaceas-riqueza-natural-de-mexico>
- Welsh S. J., Bellamy W. T., Briehl M. M., Powis, G. (2002). The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1 α protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer research.*, 17:5089-5095.
- Yan M. (2015). Seed priming stimulate germination and early seedling growth of Chinese cabbage under drought stress. *South African Journal of Botany.*, 99:88-92.