

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	
1 HD																							8
2C																							25
2 HD																							12
3C																							25
3 HD																							15
4C																							20
4 HD																							6
5C																							13
5 HD																							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).

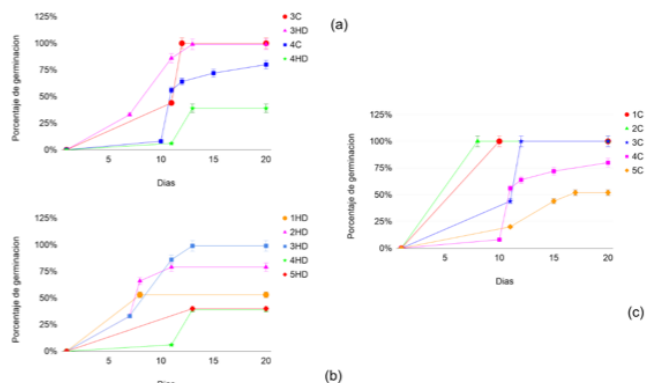


Figura 1. Efecto en la germinación en el ensayo de 25°C, (a) Curvas de germinación comparativas de *F. recurvus* (3C y 3HD) y *F. peninsulae* (4C y 4HD) para muestras Control y HD; en color naranja de observa *F. pilosus*, en rosa *F. clausen*, en azul *F. recurvus*, en verde *F. peninsulae* y en rojo *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
1C														11
1 HD														1
2C														18
2 HD														5
3C														11
3 HD														7
4C														2
4 HD														5
5C														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.

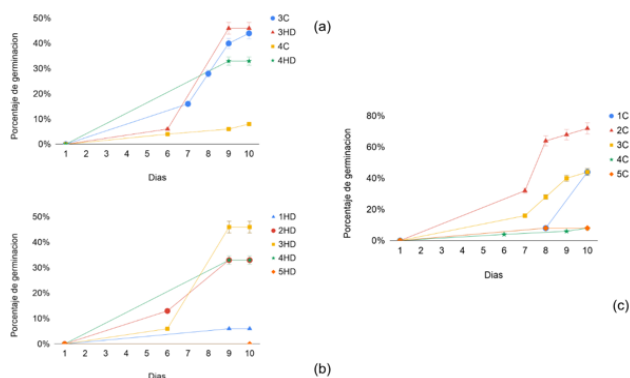


Figura 2. Efecto en la germinación en el ensayo de 35°C, (a) Curvas de germinación comparativas de *F. recurvus* (3C y 3HD) y *F. peninsulæ* (4C y 4HD) para muestras Control y HD. (b) Curvas de germinación comparativas de todos los tratamientos HD; en color azul de observa *F. pilosus*, en rojo *F. clausen*,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

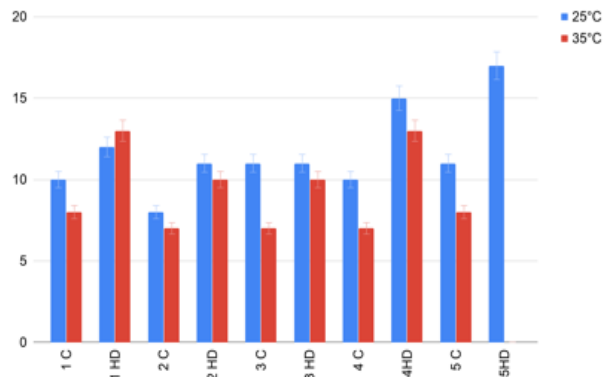


Figura 3. Tiempo medio de germinación expresado en días para *F. pilosus* (1C y 1HD), *F. clausen* (2C y 2HD), *F. recurvus* (3C y 3HD), *F. peninsulæ* (4C y 4HD) y *E. grusonii* (5C y 5HD).

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.