



IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y
TECNOLÓGICA, A. C.**

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**SEMILLAS DE CÁCTACEAS: FACTORES INTERNOS Y EXTERNOS QUE
INFLUYEN EN SU GERMINACIÓN**

Tesis que presenta

ERNESTO MASCOT GÓMEZ

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

Co-directores

Dra. Nguyen E. López Lozano

Dr. Joel D. Flores Rivas

San Luis Potosí, S.L.P., junio de 2020



Constancia de aprobación de tesis

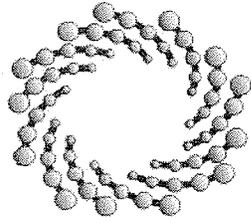


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de la Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano y el Dr. Joel David Flores Rivas.

Durante la realización del trabajo, el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-296779).

Este proyecto fue financiado por el proyecto SEP-CB-2015-01-254406 denominado "Efecto de los factores edafológicos, geográficos y fisiológicos de la planta hospedera sobre la estructura de la comunidad microbiana rizosférica de *Agave lechuguilla* y *Echinocactus platyacanthus*".



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 026 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 15 días del mes de junio del año 2020, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Laura Yáñez Espinosa	Presidente	UASLP
Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano	Secretaria	IPICYT
Dr. Ernesto Iván Badano _	Sinodal	IPICYT
Dr. Joel David Flores Rivas	Sinodal	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó el C.

Ernesto Mascot Gómez

sobre la Tesis intitulada:

Semillas de Cactáceas: Factores internos y externos que podrían influir en su germinación

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano
Dr. Joel David Flores Rivas

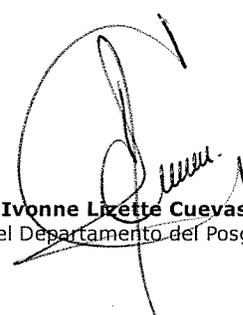
El Jurado, después de deliberar, determinó

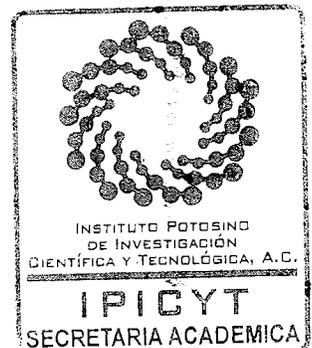
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 15 días del mes de junio de 2020.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Agradecimientos

Este trabajo se logró concluir gracias a la colaboración de muchas personas.

A mi familia porque a pesar del tiempo y distancia nunca me han dejado solo, siempre me hacen sentir su apoyo

A Karen Núñez, quien ha sido mi apoyo en esta etapa de mi vida, fue testigo de las alegrías y frustraciones que viví en este proceso, gracias por ser mi soporte, mi compañera.

También agradezco la contribución de algunas personas que tuvieron un paso efímero por el IPICYT como tesistas de licenciatura, entre quienes se encuentran principalmente Isabel Anaya, Mariana Pérez, Jazmín Velázquez.

Parte importante de este trabajo fue la ayuda de los técnicos académicos de la división de ciencias ambientales como es María del Carmen Rocha Medina, Juan Pablo Rodas, y Elizabeth Cortes. A los técnicos del LAMBAMA Verónica Zarate quien su trabajo fue fundamental en las ultimas etapas de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Andrea Echeverria, Ángel Estrada, Guadalupe Medina y la pequeña Rosaura Alfaro, quienes me ayudaron en la realización de pruebas, análisis de datos, discusión, entre otras cosas.

A los amigos que me dejo el IPICYT, Efrén, Erik, Luis, Dalia, Joel, Minerva, Jaqueline, Maximino, Kristell, Daniel y Karen Galindo

A mis amigos con quien he compartido media vida, Panchito y Angelica, y con quienes seguro continuare viviendo nuevas experiencias.

A mis asesores en este trabajo, Ernesto Badano, Laura Yáñez y Joel Flores, quienes hicieron más allá de su deber como profesores académicos pues me enseñaron a no olvidarme de aquellas cosas que dan sentido a la vida, a valorar el tiempo compartido con mi familia y amigos.

Francisco Bremont y Esmeralda López gracias por sus sugerencias, opiniones, apoyo y orientación durante el desarrollo de este trabajo.

A todos los que me faltó mencionar e hicieron mas amena mi estancia por el IPICYT, gracias, neta muchas pinches gracias, ustedes saben quiénes son y porqué lo digo, son unos héroes sin capa.

ÍNDICE

RESUMEN.....	14
INTRODUCCIÓN.....	16
1.1 Cactáceas en México.....	16
1.2 Factores que influyen en la germinación de cactáceas.....	18
1.2.1 Factores Intrínsecos: Testa de la semilla.....	18
1.2.2 Factores Intrínsecos: Mucílago.....	20
1.2.3 Factores Intrínsecos: Fitohormonas (GA ₃).....	21
1.3.1 Factores Extrínsecos: Luz.....	22
1.3.2 Factores Extrínsecos: Microorganismos promotorEs del crecimiento vegetal.....	23
CAPÍTULO I.....	27
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ANATÓMICAS DE SEMILLAS DE CACTÁCEAS.....	27
INTRODUCCIÓN.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Estructura de las semillas.....	30
Anatomía de semillas.....	31
Análisis estadísticos.....	32
RESULTADOS.....	33
Caracteres morfométricos.....	33
Apariencia de la testa.....	34
Características de las células presentes en la testa.....	35
Región Hilum-Micrópilo (HMR, por sus siglas en inglés).....	36
Anatomía interna de semillas.....	36
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES.....	40
CAPÍTULO II.....	41
GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE CACTÁCEAS DEL SUR DEL DESIERTO CHIHUAHUENSE: EFECTO DE MUCÍLAGO, LUZ Y FITOHORMONAS.....	41
INTRODUCCIÓN.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
Especies de estudio.....	44
Colecta de semillas.....	46

Pruebas de imbibición	46
Germinación de semillas.....	46
Efecto de fitohormonas	47
Efecto de la remoción del mucílago.....	47
Efecto de la luz.....	48
Diseño experimental.....	48
Análisis estadísticos	49
RESULTADOS	49
Presencia de mucílago.....	49
Pruebas de Imbibición de semillas.....	52
Efecto de fitohormonas, remoción del mucílago y tratamientos de luz sobre el porcentaje de germinación	52
Efecto de las fitohormonas, la remoción del mucílago y los tratamientos de luz sobre el tiempo medio de germinación (MGT)	57
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIONES.....	62
CAPÍTULO III	63
MICROORGANISMOS ASOCIADOS A SEMILLAS DE CACTÁCEAS Y SU PROBABLE FUNCIÓN EN LA GERMINACIÓN	63
INTRODUCCIÓN.....	64
OBJETIVOS.....	69
MATERIALES Y MÉTODOS.....	70
Aislamiento y caracterización de bacterias cultivables.....	70
Identificación de microorganismos cultivables	71
Identificación de bacterias no cultivables mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.....	73
Identificación de hongos no cultivables a partir de la región ITS.....	75
Identificación de microorganismos no cultivables; control positivo.....	75
Identificación de microorganismos no cultivables; control negativo.....	76
Análisis de secuencias	76
Microorganismos y su efecto sobre la germinación	77
RESULTADOS	79
Aislamiento e identificación de bacterias cultivables mediante la secuenciación del gen 16S rRNA	79
Caracterización de bacterias cultivables	81

Identificación de hongos cultivables mediante la secuenciación de la región ITS	82
Descripción de la microbiota asociada a semillas de cactáceas mediante secuenciación por Illumina	83
Microorganismos y su efecto promotor de la germinación	94
DISCUSIÓN	96
CONCLUSIONES	103
CONCLUSIONES GENERALES	104
ANEXO I Métodos para la caracterización de bacterias cultivables	106
Producción de ácido indol-3-acético (AIA); Protocolo de Salkowski (1985):	106
Producción de sideróforos; cromo azurol sulfonato (CAS) (Schwyn & Neilands, 1987).	107
Acidificación del medio	109
Actividad quitinolítica; Protocolo de Castro et al., 2011	109
Actividad reductora de acetileno (ARA); Protocolo de Otero (2011)	110
ANEXO II Diagrama completo de neighbor joining de las cepas aisladas. Se muestran los géneros bacterianos asociados a cactáceas, así como las propiedades promotoras de crecimiento evaluadas. También se muestra ubicación en la semilla donde fueron aislados, es decir, si son endoseminales (cactus negro) o episeminales (cactus verde).	111
ANEXO III. Tabla de cepas aisladas, su identificación y las capacidades promotoras de crecimiento vegetal que realizan	112
ANEXO IV. Comparación entre la diversidad bacteriana presente en las librerías de los tratamientos control y la encontrada en las cactáceas de nuestro estudio	114
ANEXO V. Heatmap a nivel de OTU de las bacterias asociadas a semillas de cactáceas. La flecha roja indica el OTU más dominante en cuatro especies de cactáceas, mientras que la línea verde indica la especie y la región de las semillas que presentó mayor diversidad.	115
ANEXO VI. Comparación entre la diversidad fúngica presente en las librerías de los tratamientos control y la encontrada en las cactáceas de nuestro estudio	116
REFERENCIAS	117

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Relieve de los límites celulares anticlinales: a, límite casi invisible; b, acanalado; c, elevado..... **24**
- Figura 2.** Células de la testa cóncavas tabulares de *Mammillaria thornberi* subsp. *yaquensis*. A la izquierda se presentan células intactas con cutícula lisa (estriado solo sobre los límites anticlinales). A la derecha se presenta una célula después de la extracción de la cutícula, lo que demuestra que es la pared celular la que produce la estructura de superficie de verrucosa..... **25**
- Figura 3.** Semillas de las especies estudiadas, A) *Echinocactus platyacanthus*, B) *Ferocactus latispinus*, C) *Ferocactus pilosus* y D) *Stenocereus queretaroensis*. Barra de escala = 1 μm **27**
- Figura 4.** Micrografías de semillas completas y de la región del hilum en *E. platyacanthus* (A), *F. latispinus* (B), *F. pilosus* (C) y *S. queretaroensis* (D). Las flechas amarillas señalan la región hilum-micropilo en las semillas..... **28**
- Figura 5.** Células de la testa de semillas de *E. platyacanthus* (A), *F. latispinus* (B), *F. pilosus* (C) y *S. queretaroensis* (D)..... **29**
- Figura 6.** Anatomía de semillas de *E. platyacanthus*, (A) se presenta fotomicrografía de la sección longitudinal en la cual se observa el embrión (EM), endospermo (EN), micrópilo (MI), macrosclereidas (MA) y la radícula (RA). Sección longitudinal de la cubierta de semilla (B), así como una macrosclereida aislada (C), se observa un lumen (LU) reducido. Fotografía tomada en un microscopio (DM 2000, Leica Microsystems, DE).....**31**
- Figura 7.** Corte de semilla de *F. pilosus*, sección longitudinal de la semilla (A) se observa el acomodo de las macrosclereidas (MA) en la testa de la semilla, el embrión (EM), endospermo (EN), hilum (HI) y micrópilo (MI). También se presenta un corte longitudinal de la testa (B) donde se muestra el arreglo de las macrosclereidas (MA). Finalmente se muestra una macrosclereida aislada (C) con el lumen (LU) de mayor tamaño en comparación con lo observado en *E. platyacanthus*.. **31**
- Figura 8.** A) Resultado de formación y tinción del mucílago con cresyl blue alrededor de semillas de cinco especies de cactáceas. B) Semillas de cactáceas sometidas al tratamiento de lavado (sin mucílago) mostrando que la solución de cresyl blue ingresó al interior de las semillas. C) Semillas de cactáceas no lavadas (con mucílago), se observa que el colorante cresyl blue no ingresó al interior de las semillas, y que la capa de mucílago puede funcionar también para retener y facilitar el paso hacia el interior del agua. Las flechas indican el área más coloreada por el cresyl blue. La barra en la parte inferior de las semillas es de 1 mm.....**44**
- Figura 9.** Fotomicrografías del mucílago removido del micropilo en las semillas de: *E. platyacanthus* (A), *F. latispinus* (C), *F. pilosus* (E) y *S. queretaroensis* (G); y el mucílago cubriendo el micropilo de la semilla en *E. platyacanthus* (B), *F. latispinus* (D), *F. pilosus* (F) y *S. queretaroensis* (H). Fotomicrografías obtenidas con un microscopio electrónico de barrido..... **45**
- Figura 10.** Porcentaje de imbibición de semillas en cuatro especies de cactáceas sin mucílago (columna negra) y con mucílago (columna gris). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre medias de cada especie..... **46**
- Figura 11.** Germinación de semillas (A) y tiempo medio de germinación (MGT) (B) de semillas de *Coryphantha maiz-tablasensis* bajo tratamientos combinados de GA_3 y mucílago. Letras diferentes

indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre medias de todas las interacciones de tratamientos..... 48

Figura 12. Porcentaje de germinación (%) de cinco especies de cactáceas, sin mucílago (columnas negras) y con mucílago (columnas grises). Para cada especie, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre medias de cada especie..... 50

Figura13. Germinación de semillas de *F. latispinus* bajo tratamientos combinados de mucílago y GA₃. letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre medias 51

Figura 14. Tiempo medio de germinación (MGT) de cinco cactáceas (*C. maiz-tablasensis*, *E. platyacanthus*, *F. latispinus*, *F. pilosus* y *S. queretaroensis*) sin mucílago (columna negra) y con mucílago (columna gris). Para cada especie, diferentes letras indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre medias dentro de cada especie. El asterisco indica que no hubo germinación de semillas..... 53

Figura 15. Árbol de neighbor joining donde se muestra la afiliación taxonómica de las cepas aisladas de acuerdo con la secuencia de referencia que tuvo mayor porcentaje de similitud en la base de datos del GeneBank en el NCBI. Las líneas de colores muestran la especie de cactácea de la que fueron aisladas. Los símbolos indican la ubicación en la semilla de procedencia, endoseminales (cactus negro) o episeminales (cactus verde). Los valores de bootstrap se indican en la parte inferior de las ramas. En el ANEXO II se presenta un árbol de neighbor joining en extenso con las propiedades promotoras de crecimiento asociadas a cada cepa..... 74

Figura 16. Diagrama donde se muestran los géneros de bacterias endófitas (A) y epifitas (B) aislados de cada especie de cactácea, así como las actividades promotoras de crecimiento vegetal evaluadas. Se presentan las especies de cactáceas (círculo exterior), los microorganismos que tienen asociados (círculo intermedio) y las capacidades promotoras de crecimiento evaluadas (círculo interior). 75

Figura 17. Árbol de neighbor joining de una región parcial ITS donde se muestra la afiliación taxonómica de los hongos aislados de acuerdo con las secuencias de referencia que tuvo mayor porcentaje de similitud. Las líneas de colores muestran la especie de cactáceas de la que fueron aislados. Los símbolos indican la ubicación en la semilla de procedencia, endoseminales (cactus negro) o episeminales (cactus verde). Los valores de bootstrap se indican en la parte inferior de las ramas.....79

Figura 18. Curvas de rarefacción de los géneros bacterianos asociados a *E. platyacanthus* (A), *F. latispinus* (B), *F. pilosus* (C) y *S. queretaroensis* (D). Los puntos azules representan a géneros endoseminales de semillas y puntos anaranjados representan géneros episeminales de cactáceas..... 80

Figura 19. Índice de Shannon, basado en la diversidad de los géneros bacterianos asociados a semillas de cactáceas. las líneas paralelas representan los intervalos de confianza. Los puntos azules representan los géneros endoseminales, mientras que los puntos anaranjados representan géneros episeminales. Los datos para realizar estas curvas fueron obtenidos del programa EcoSim..... 81

Figura 20. Heatmap construido a partir de las abundancias relativas de los géneros bacterianos identificados. El color rojo representa mayor abundancia, mientras que el color azul representa una abundancia relativa baja. 82

Figura 21. Curvas de rarefacción de los géneros fúngicos asociados a <i>E. platyacanthus</i> (A), <i>F. latispinus</i> (B), <i>F. pilosus</i> (C) y <i>S. queretaroensis</i> (D). Los puntos azules representan a géneros endoseminales y puntos anaranjados representan géneros episeminales de cactáceas.....	85
Figura 22. Índice de Shannon, basado en la diversidad de OTUs (Unidad taxonómica operativa) fúngicos (a nivel género) asociados a semillas de cactáceas. Los puntos azules representan los OTUs endoseminales y puntos anaranjados representan OTUs episeminales. Los datos para realizar estas curvas fueron obtenidos mediante el programa EcoSim.....	86
Figura 23. Heatmap construido a partir de las abundancias relativas de los géneros fúngicos identificados. En el dendrograma se presenta la agrupación de los hongos endoseminales y episeminales. El color rojo representa la abundancia relativa más abundante, mientras que los colores azul y morado representan una abundancia relativa baja.	87
Figura 24. Comparación del porcentaje de germinación e infección entre semillas de <i>E. platyacanthus</i> lavadas y aquellas sometidas al tratamiento de re-inoculación. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.	88
Figura 25. Comparación entre semilla y plántula sana (A-B) contra semilla y plántula infectada (C-D) por <i>Aspergillus</i> sp.....	89
Figura 26. Factores abordados en esta investigación que influyen en la germinación de semillas	98

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Resultados de los ANOVA de dos vías utilizados para evaluar los efectos de diferentes concentraciones de GA₃ y la remoción de mucílago en el porcentaje de germinación y tiempo medio de germinación (MGT, por sus siglas en inglés) de las cinco especies de cactáceas. La tabla muestra los estadísticos (F-value, grados de libertad y p) para los efectos de cada uno de estos factores y sus combinaciones de niveles (crítico $\alpha = 0.05$). **45**
- Tabla 2.** Germinación de semillas en diferentes concentraciones de GA₃. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre medias en cada especie..... **47**
- Tabla 3.** Tiempo medio de germinación (MGT, por sus siglas en inglés) bajo diferentes concentraciones de GA₃ en las especies de estudio. Diferentes letras indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre medias dentro de cada especie..... **50**
- Tabla 4.** Concentración y volumen de los reactivos utilizados por cada PCR (rección en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) para organismos cultivables..... **64**
- Tabla 5.** Concentración y volumen de los reactivos utilizados por reacción de PCR para bacterias no cultivables..... **67**
- Tabla 6** Comparación de la diversidad entre los géneros bacterianos endoseminales y episeminales asociados cactáceas mediante la secuenciación del gen 16S rRNA..... **76**
- Tabla 7** Comparación de la diversidad entre los géneros fúngicos endoseminales y episeminales asociados a cactáceas mediante la secuenciación de la región ITS..... **81**

RESUMEN

Las semillas representan uno de los estadios más cruciales en el ciclo de vida de las plantas, ya que de ellas depende el establecimiento de nuevos individuos y la perpetuación de la especie. La germinación de semillas es un proceso regulado por factores propios de cada especie, como es la anatomía y morfología de sus semillas, el contenido de fitohormonas y mucílago, así como por factores externos como la luz, la temperatura, el agua y la asociación con diversos microorganismos.

En esta investigación se evaluaron las características anatómicas y morfológicas de semillas de cuatro especies de cactáceas (*Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus latispinus*, *F. pilosus* y *Stenocereus queretaroensis*) mediante la observación en microscopio óptico y microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), así mismo se estudió el efecto de la luz, fitohormonas y microorganismos en semillas de estas especies sobre la germinación. Se corroboró y demostró que todas las especies cuentan con una capa de mucílago la cual tiene influencia tanto en el porcentaje como en la velocidad de germinación, aspectos que en ambientes áridos son trascendentales para el establecimiento vegetal.

Posteriormente, mediante técnicas de biología molecular se determinó la comunidad microbiana de bacterias y hongos asociada a semillas de estas cactáceas. Se observó que la asociación con microorganismos dentro (endoseminales) y fuera de las semillas (episeminales) es fundamental en esta etapa de vida, ya que funcionan como el primer sistema de defensa de la planta ante el medio donde se desarrolla. Además, los microorganismos promueven su desarrollo a través de la fijación de nitrógeno, la producción de hormonas vegetales, entre otras capacidades. Los resultados sugieren que la presencia de una capa de mucílago, así como la asociación semilla-microorganismo son esenciales para la germinación y posterior establecimiento de estas cactáceas.

ABSTRACT

Seeds represent one of the most crucial stages in the life cycle of plants since the establishment of new individuals and the perpetuation of the species depend on them. Seed germination is a process regulated by factors specific to each species, such as the anatomy and morphology of its seeds, the content of phytohormones and mucilage, as well as external factors such as light, temperature, water and the association with various microorganisms

In this research, the anatomical, and morphological characteristics of seeds of four species of cacti (*Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus latispinus*, *F. pilosus*, and *Stenocereus queretaroensis*) were evaluated by observation under a light microscope and scanning electron microscope (SEM), the effect of light, phytohormones and microorganisms in seeds of these species on germination was also studied. It was confirmed and demonstrated that all species have a mucilage capacity which influences both the percentage and the speed of germination, aspects that in transcendental arid environments for plant establishment.

Subsequently, by means of molecular techniques, the microbial community of bacteria and fungi associated with seeds of these cacti was determined. Verify that the association with microorganisms inside (endoseminals) and outside (episemines) of the seeds is essential in this stage of life since it works as the first defense system of the plant against the environment where it develops. In addition, the microorganisms promote their development through nitrogen fixation, the production of plant hormones, among other capacities. The results that determine the presence of a mucilage layer, as well as the seed-microorganism association, are essential for the germination and subsequent establishment of these cacti.

INTRODUCCIÓN

1.1 CACTÁCEAS EN MÉXICO

Las zonas áridas cubren una tercera parte de la superficie terrestre del planeta, se caracterizan por presentar extremas temperaturas y la ausencia de lluvias en periodos prolongados que limitan el establecimiento de diversos organismos (Agarwal *et al.*, 2014; Powell *et al.*, 2013), así como la limitada productividad de sus suelos (Celaya & Castellanos, 2011). Estas regiones poseen una precipitación media anual menor a 350 mm, mientras que las zonas semiáridas reciben entre 350 y 600 mm anuales, en ambos casos, la precipitación promedio anual es menor a la evaporación potencial máxima anual, haciendo evidente el déficit hídrico (Tarango Arámbula, 2005).

La topografía también es característica en las regiones áridas. Uno de los efectos más conocidos en los que tiene incidencia este factor es la modificación de la temperatura mediante el gradiente térmico. Los macizos montañosos tienen la capacidad para retener o desviar la humedad cargada en los vientos de las laderas ubicadas a barlovento, estableciendo condiciones de aridez a sotavento, desempeñando un papel importante en la distribución de la vegetación (González Medrano, 2012). En México, las regiones áridas abarcan aproximadamente el 60 % de su territorio (Jiménez-Sierra, 2011), encontrándose aquí el mayor número de cactáceas del mundo, las cuales son ampliamente conocidas por sus adaptaciones para sobrevivir en estas condiciones.

La familia Cactaceae es originaria del continente americano, cuenta con aproximadamente 2,000 especies (Bravo-Hollis, 1978), siendo México el país con el mayor número de endemismos de esta familia, pues se albergan casi el 40% de todas ellas (Ortega-Baes & Godínez-Alvarez, 2006). Esta familia es una de las más abundantes de los desiertos mexicanos, siendo las zonas desérticas y semidesérticas de los desiertos Sonorense y Chihuahuense, y la región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán las zonas con mayor diversidad de este grupo (Jiménez-Sierra, 2011).

Dadas las características orográficas y climáticas de nuestro país, podemos encontrar miembros de esta familia a lo largo y ancho de su superficie. Por ejemplo, en ambientes semi-húmedos con precipitaciones anuales de entre 300 y 800 mm, cerca de la vertiente del Pacífico y en algunas regiones del Golfo donde se desarrollan bosques caducifolios, suelen crecer cactáceas de los géneros *Neobuxbaumia*, *Pachycereus* y *Cephalocereus* (Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1978). Por su parte, en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Puebla-Oaxaca) se tiene registro de 81 especies, de las cuales 25% son endémicas de la región. Entre las especies que aquí sobresalen podemos encontrar gran variedad de los viejitos (*Cephalocereus columna-trajani*), pitayas comestibles (*Stenocereus* spp.), biznagas (*Mammillaria* spp.), entre otras especies. En la depresión del Balsas se pueden encontrar especies de los géneros *Coryphantha*, *Cephalocereus*, *Opuntia* y *Backebergia militaris*, esta última especie endémica de la región (Jiménez-Sierra, 2011).

En el desierto Sonorense existen cactáceas arbóreas las cuales destacan por su tamaño, tales como el cardón pelón o cardón gigante (*Pachycereus pringlei*) y el sahuaro (*Carnegiea gigantea*), el cual puede alcanzar hasta 10 metros de altura. También se distribuyen algunas especies de nopales (*Opuntia* spp.) y biznagas (*Ferocactus* spp.) (Jiménez-Sierra, 2011).

Por otra parte, el Desierto Chihuahuense es considerado una de las regiones áridas con mayor diversidad en el planeta, es la región árida de mayor extensión de América del Norte. En el territorio mexicano abarca parte de los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí, mientras que en los Estados Unidos de América ocupa parte de los estados de Arizona, Nuevo México y Texas (Granados-Sánchez et al., 2011). Este desierto cuenta con 329 especies de cactáceas en México (Hernández & Gómez-Hinostrosa, 2005).

Particularmente el estado de San Luis Potosí posee la mayor riqueza de cactáceas de México, con un registro de 35 géneros y 161 especies (De-Nova et al., 2019).

Los cambios en el uso de suelo, la extracción ilegal de plantas para uso ornamental, la introducción de especies exóticas, así como la destrucción de hábitats naturales, han provocado que 255 especies de cactáceas se incluyan en la NOM-059-ECOL-2001 y 65 en el Libro Rojo de la IUCN (Flores-Rivas, 2019). Por último, 41 taxones se incluyan en el Apéndice I de la CITES (Guzmán *et al.*, 2003). Aunado a lo anterior, la recuperación en las poblaciones de cactáceas es afectada por las bajas tasas de germinación y establecimiento que se presentan en su entorno natural, haciendo evidente la necesidad de entender cómo influyen algunos rasgos morfológicos y anatómicos de las semillas en su germinación (M. Rojas-Aréchiga & Vázquez-Yanes, 2000).

1.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA GERMINACIÓN DE CACTÁCEAS

La semilla representa uno de los más cruciales estadios en el ciclo de vida de las plantas, ya que no solo sirven como punto de inicio, sino que también facilita la dispersión, adaptación y persistencia del embrión en ambientes adversos (Nelson, 2017). En este sentido, al ser las cactáceas uno de los grupos más importantes que habitan en las regiones áridas y semiáridas del país, se vuelve transcendental comprender los factores intrínsecos o extrínsecos a las semillas que influyen en su germinación.

1.2.1 FACTORES INTRÍNSECOS: TESTA DE LA SEMILLA

La testa de las semillas cumple una gran variedad de funciones, desde el desarrollo de la semilla hasta su maduración (Bewley *et al.*, 2006), ya que puede inhibir la germinación por presentar una resistencia mecánica impuesta por los tejidos que rodean al embrión, limitando de esta manera la protrusión de la radícula. Este efecto se puede suprimir al remover parcialmente la cubierta (Flores & Jurado, 2011).

También existen inhibidores químicos que afectan la germinación de semillas, uno de estos es el ácido abscísico (ABA, por sus siglas en inglés), el cual

es una fitohormona conocida por su papel en la permanencia del estado de latencia de semillas (Suárez *et al.*, 2012). Entre otros compuestos inhibidores que han sido identificados se encuentran ácidos fenólicos, taninos y cumarinas (Suárez & Melgarejo, 2010). Arias y Lemus (1984) indicaron que la germinación de semillas de *Melocactus curvispinus* está condicionada por una combinación entre las condiciones de luz y un tratamiento de lavado en las semillas previo a la siembra, sugiriendo de esta manera que la testa podría tener compuestos químicos que inhiben la germinación de esta especie, aunque en este estudio no se identificaron estos posibles compuestos inhibidores.

Durante la germinación, la cubierta de la semilla puede actuar como un regulador en la toma de agua (Orozco-Segovia *et al.*, 2007). Sin embargo, en algunas especies esta cubierta es impermeable, por lo que las semillas entran en un periodo de latencia física (Baskin *et al.*, 2000). Esta impermeabilidad de la cubierta es reflejada en su estructura anatómica. A menudo, se debe a una o más capas de células conocidas como macroesclereidas, las cuales están muy compactadas, sin poros, espacio intercelular o estomas entre ellas y los materiales repelentes al agua pueden o no estar presentes en ellas. Las macroesclereidas están presentes en un número considerable de familias: Cannaceae, Convolvulaceae, Fabaceae, Malvaceae y Rhamnaceae (Bewley *et al.*, 2006). Para semillas de la familia Cactaceae se ha sugerido la presencia de latencia física (Orozco-Segovia *et al.*, 2007); sin embargo, hasta ahora no se han reportado macroesclereidas.

Las paredes secundarias de las macroesclereidas se describen generalmente como compuestas de una matriz de celulosa pentosana que no está lignificada. Se observa como una "línea clara" justo debajo de la capa subcuticular. Debajo de las macroesclereidas hay una hipodermis formada por esclereidas con forma de reloj de arena (osteosclereidas), y varias capas de células del parénquima que contienen almidón formando la testa interna (Harris, 1983).

En muchos casos, la germinación puede ser inhibida por más de un efecto y/o factor actuando simultáneamente, ya que varias de las restricciones ejercidas

por la cubierta podrían actuar al mismo tiempo en mantener a la semilla dentro de un estado de latencia (Rojas-Aréchiga & Vázquez-Yanes, 2000).

1.2.2 FACTORES INTRÍNSECOS: MUCÍLAGO

La cubierta de las semillas muchas veces presenta una ligera capa mucilaginosa conformada por pectinasas y celulasas, la cual puede tener diversos papeles en el desarrollo adecuado de la semilla (Yang et al., 2012). Esta es una estrategia que las plantas han desarrollado para dispersarse, protegerse y asegurar su establecimiento en el suelo hasta que las condiciones ambientales sean más favorables (Bewley et al., 2006), ya que puede mantener húmeda la semilla protegiéndola de la pérdida de agua. Además, aletarga la actividad metabólica del embrión hasta que alcance su maduración, también reduce la difusión de oxígeno en su interior, manteniendo el estado de latencia en el embrión (Bewley et al., 2006; Western, 2012).

Durante la germinación, debido a sus propiedades higroscópicas, el mucílago puede atraer y retener el agua que rodea a la semilla (Yang et al., 2012). Las semillas que poseen mucílago tienen un mejor contacto con las partículas del suelo y, por lo tanto, su absorción de agua es mucho mejor que la de semillas sin mucílago (Sun et al., 2012). Además de mejorar la absorción de agua, el mucílago también puede lubricar la radícula y proporcionar nutrientes indirectamente a través de la interacción con microorganismos del suelo (Barrios et al., 2015).

En especies de la familia Cactaceae existen pocos estudios sobre la función del mucílago en semillas, siendo estos contrastantes. Por ejemplo, Bregman & Graven (1997) reportaron que semillas de *Echinopsis thionantha* y *Gymnocalycium gibbosum* presentaron mayores porcentajes de germinación cuando conservan la capa de mucílago en comparación con aquellas donde se eliminó esta capa. Por otro lado, Barrios et al. (2015) no encontraron diferencias entre los porcentajes de germinación en semillas de *Leptocereus scopulophilus* con y sin mucílago, la diferencia reportada únicamente fue en las velocidades de germinación, siendo las semillas que perdieron esta capa las que germinaron más rápido.

1.2.3 FACTORES INTRÍNSECOS: FITOHORMONAS (GA₃)

Las semillas de cactáceas, particularmente aquellas con forma de barril (géneros *Echinocactus* spp. y *Ferocactus* spp.) y algunas columnares (*Pachycereus* spp., *Cephalocereus* spp. y *Neobuxbaumia* spp.) poseen fotoblastismo positivo, es decir, necesitan del estímulo de luz para germinar, por lo que no son capaces de llevar a cabo el proceso de germinación en condiciones de oscuridad (Rojas-Aréchiga *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha observado que en semillas que necesitan del estímulo de luz, un tratamiento con ácido giberélico (GA₃) puede promover la germinación en condiciones de oscuridad (Alcorn & Kurtz, 1959; Brencher *et al.*, 1978; Ortega-Baes & Rojas-Aréchiga, 2007). Esto se debe a la evidencia molecular que involucra al fitocromo en el control del metabolismo y la síntesis de giberelinas, estableciendo una relación directa entre ambos factores (Araya *et al.*, 2000). Además, se ha demostrado que la exposición a la luz promueve la transcripción de ciertas enzimas, que participan en la síntesis de giberelinas, como es el caso de la 3β-hidroxilasa (Bewley *et al.*, 2006).

Las giberelinas son fitohormonas promotoras del crecimiento vegetal, que están involucradas en un gran número de procesos que incluyen la germinación de semillas, emergencia de plántulas, crecimiento de tallos y hojas, inducción floral y el crecimiento de flores y frutos, pues son sintetizadas en diferentes tejidos de la planta, principalmente en aquellos con crecimiento activo, tales como el embrión o meristemas (Bottini *et al.*, 2004).

Se han propuesto dos mecanismos mediante los cuales el GA₃ puede controlar la germinación de semillas. El primero es la inducción de la expresión de genes que codifican enzimas hidrolíticas en el endospermo, tales como la α-amilasa, responsable de descomponer las reservas de almidón presentes en la semilla, este tejido confiere parte de la resistencia mecánica a la protrusión de la radícula (Debeaujon, 2000; Ochoa *et al.*, 2015). El segundo mecanismo consiste en la estimulación directa sobre el crecimiento potencial del embrión, el cual podría verse restringido por el ácido abscísico (Debeaujon, 2000).

El GA₃, ha sido usado ampliamente como un promotor de la germinación en diferentes especies de cactus. Brencher *et al.* (1978) encontraron que las concentraciones de 500 y 1000 ppm de GA₃ promueven la germinación de semillas de seis especies de cactáceas (*Gymnocalycium ourselianum*, *Hamatocactus setispinus*, *Heliabravoa chende*, *Pachycereus hollianus*, *Rebutia minuscula* y *R. marsoneri*) en condiciones de oscuridad, similar a lo reportado anteriormente por Alcorn & Kurtz (1959) en semillas del saguaro (*Carnegiea gigantea*). Más recientemente Rojas-Aréchiga *et al.* (2007, 2011) encontraron que el GA₃ promueve la germinación de diferentes especies (*Trichocereus terscheckii*, *Cylindropuntia imbricata*, *C. leptocaulis*, *Opuntia rastrera* y *O. macrocentra*) cuando se combina esta fitohormona con tratamientos de luz.

1.3.1 FACTORES EXTRÍNSECOS: LUZ

La germinación de semillas es un proceso que requiere la combinación de diferentes factores como son luz, temperatura, humedad, además de un adecuado balance hormonal, e incluso de oxígeno, los cuales podrían ser específicos para cada especie (Carranza *et al.*, 2016). Cuando estos factores son ideales para el desarrollo de un nuevo individuo, comienza la germinación, proceso que se inicia con la toma de agua o imbibición por parte de las semillas y concluye con la emergencia de la radícula (Bewley *et al.*, 2006).

Los cambios de temperatura, un fenómeno que ocurre habitualmente en los ambientes áridos, pueden influir en la respuesta de la semilla a la luz en especies con fotoblastismo positivo (Rojas-Aréchiga *et al.*, 1997). Las fluctuaciones de temperatura pueden inducir la germinación en condiciones de oscuridad, ya que los cambios en la temperatura pueden interferir con la forma activa del fitocromo (Seo *et al.*, 2009).

La sensibilidad a la luz que tienen las semillas es importante ya que proporciona los mecanismos para que ocurra la germinación y establecimiento de plántulas en circunstancias favorables para su supervivencia (Bewley *et al.*, 2006). El responsable de esta sensibilidad es el fitocromo, el cual controla muchos

aspectos del desarrollo y metabolismo vegetal, además de ser importante en la regulación de la germinación y latencia de semillas. El fitocromo es un fotorreceptor que puede encontrarse en dos formas reversibles; la forma que percibe la longitud de onda rojo absorbente (Pr), la cual se sintetiza en la oscuridad (biológicamente inactiva) y la forma que percibe la longitud de onda en el rojo lejano absorbente (Pfr), la cual promueve la germinación (biológicamente activa) incrementando los niveles de ácido giberélico, a la vez que disminuye la concentración de ácido abscísico, fitohormonas que promueven la germinación y el estado de latencia en semillas, respectivamente (Seo *et al.*, 2009).

1.3.2 FACTORES EXTRÍNSECOS: MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Como su nombre lo indica, son aquellos que poseen capacidades para promover el crecimiento vegetal, e interactúan con las plantas en todas las etapas del desarrollo. Estos microorganismos contribuyen al microbioma de la planta, llegando a formar interacciones significativas con las semillas y durante el desarrollo de la planta (Nelson, 2017).

Se tiene registro de diferentes phylum bacterianos asociados a semillas, entre los principales se encuentran Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes, los cuales, también son los más abundantes en el suelo (Barret *et al.*, 2015) y debido a que están presentes en otros tejidos de la planta podrían llegar a colonizar la semilla por medio de transferencia vertical (Truyens *et al.*, 2015).

Puente *et al.* (2009a) encontraron que las bacterias aisladas del interior de semillas (endoseminales) de *Pachycereus pringlei* pueden acelerar el proceso de formación del suelo. En otra investigación realizada con *Pachycereus pringlei*, *Stenocereus thurberi* y *Opuntia cholla*, se encontró que, en combinación con ácidos orgánicos exudados por las plantas, las bacterias logran degradar la roca ayudando a la formación de suelo, lo que mejora las probabilidades de establecimiento de las plantas (Puente *et al.*, 2004). También se observó que la asociación con microorganismos endófitos aumenta el tamaño de la raíz (Bashan *et al.*, 2002;

Lopez *et al.*, 2012), y/o facilita la asimilación de nitrógeno en la planta hospedera (Puente *et al.*, 2009b).

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés) transforman el N₂ atmosférico a formas de N asimilables por la planta (NH₄, NO₃⁻) (Gopalakrishnan *et al.*, 2015), entre los géneros más conocidos se encuentran *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Clostridium* (Diaz *et al.*, 2001).

Las PGPB también participan en la solubilización de nutrientes que las plantas difícilmente pueden tomar del suelo, como es el fósforo (Rodríguez & Fraga, 1999). Después del nitrógeno, el fósforo es el nutriente más limitante para el crecimiento de las plantas (Gopalakrishnan *et al.*, 2015), pues llega a constituir más del 0.2% del peso seco de la planta (Beltrán Pineda, 2014). La disponibilidad de este elemento para las plantas depende del pH, la compactación, aireación, humedad, temperatura, textura y materia orgánica del suelo (Corrales *et al.*, 2014). Entre los principales géneros activos en la solubilización de fósforo se encuentran: *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* y *Flavobacterium* (Diaz *et al.*, 2001). Estas bacterias sintetizan ácidos orgánicos de bajo peso molecular que actúan sobre el fósforo inorgánico, transformándolo en una forma asimilable. Se ha descubierto que algunas veces la mineralización de fósforo orgánico es realizada por enzimas de origen microbiano, tales como las fosfatasas ácidas, fosfohidrolasas y fitasas (Gopalakrishnan *et al.*, 2015).

Los microorganismos también pueden promover directamente el crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas, tales como el ácido indolacético (IAA), citocininas, ACC desaminasa y giberelinas (Truyens *et al.*, 2015). Particularmente las giberelinas no solo participan en la germinación de semillas, sino que también promueven el crecimiento vegetal por medio de la producción de pelos radiculares, en la diferenciación floral entre otros (Bottini *et al.*, 2004). Entre las bacterias que pueden producir giberelinas se encuentran *Azospirillum* sp., *Rhizobium* sp., *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* (Bastián *et al.*, 1998) y *Bacillus* sp. (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001). Hasta ahora no se conoce el papel de las giberelinas en bacterias u hongos, sin embargo, se cree que son

metabolitos secundarios que juegan un papel importante como factores de señalización en la planta huésped (Bottini *et al.*, 2004). Las giberelinas fueron descubiertas en cultivos de hongo *Fusarium moniliforma* (*Gibberella fujikuroi* en su forma sexual) en 1926 en Japón por Kurosawa (Bottini *et al.*, 2004).

Los hongos benéficos también pueden influir fuertemente en el crecimiento y supervivencia de las plantas (Kirkpatrick & Bazzas, 1979), ya que se pueden asociar a la planta. Entre los grupos de hongos benéficos usualmente asociados a las plantas se encuentran las clases Dothideomycetes, Sordariomycetes, Leotiomycetes, Eurotiomycetes y Pezizomycetes, Zygomycota y Basidiomycota, estos dos últimos encontrados comúnmente en pastos (Khidir *et al.*, 2010).

La asociación de plantas-hongos permite la inducción del sistema de defensa en la planta huésped, específicamente mecanismos de resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés), el cual es mediado por la acción de diferentes fitohormonas, entre las que destacan el ácido salicílico, ácido jasmónico y el etileno (Porrás-Alfaro & Bayman, 2011).

Muchos hongos pueden producir metabolitos secundarios que inhiben el ataque de patógenos o insectos sobre las semillas, además producen elicitores que estimulan la producción de metabolitos secundarios con actividad promotora de germinación como son: sorgoleona, isoflavona, sesquiterpeno lactonas y estrigolactonas; sin embargo, el mecanismo mediante el cual promueven esta actividad aún no es del todo claro (Bouwmeester *et al.*, 2007).

Los antecedentes mencionados hacen evidente que la germinación de semillas es un proceso que depende de diversos factores, aquellos propios de la semilla, como son el balance de fitohormonas, las características de la testa, como es la capa de mucílago, entre otras variables que podrían ser particulares para cada especie, o bien, por los factores brindados por el ambiente que rodea a la semilla como; la temperatura, la humedad, la luz y las asociaciones con microorganismos. Debido a que muchas cactáceas mexicanas se encuentran en alguna categoría de riesgo dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010 es urgente entender los factores que limitan su reproducción y desarrollo, de tal manera que se pueda facilitar reforestación de estas especies.

En esta investigación, el objetivo principal fue determinar cómo influyen diversos factores en la germinación de cactáceas, para esto, se estudiaron semillas de cinco especies de cactáceas con diferentes características anatómicas y morfológicas. También se evaluó la influencia de las condiciones de luz y diferentes concentraciones de fitohormonas en la germinación de semillas. Se describió además la presencia de una capa de mucílago en la testa de todas estas especies. Finalmente, se evaluó la composición en la comunidad microbiana, tanto al interior como al exterior de la testa de estas cuatro especies, determinando las propiedades promotoras del crecimiento vegetal de estos microorganismos. Todas las características descritas se relacionaron con la capacidad de germinación de las especies analizadas.

CAPÍTULO I

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ANATÓMICAS DE SEMILLAS DE CACTÁCEAS

INTRODUCCIÓN

Las semillas de especies de la familia Cactaceae presentan considerable variación en forma, tamaño, estructura, características del embrión y color de la testa (Bregman & Bouman, 1983; Rojas-Aréchiga & Vázquez-Yanes, 2000). Algunas de estas características se han relacionado con la germinación de las semillas, como la estructura (Maiti et al., 1994) y el tamaño (Flores et al., 2011). Bregman & Bouman (1983) relacionaron la forma de las grietas de las semillas de los cactus con diferencias en la germinación.

Las características estructurales de los frutos y semillas de cactáceas se han asociado con la forma de dispersión en algunas especies (Bregman, 1988), siendo principalmente dispersadas por viento y por animales (Rojas-Aréchiga & Vázquez-Yanes, 2000), aunque también pueden ser dispersadas por el agua durante el periodo de lluvias (Sánchez-Salas *et al.*, 2015).

Previo a la germinación, la estructura de las semillas protege al embrión cuando estas son consumidas por animales, ya que en regiones áridas y semiáridas, los cactus y sus frutos constituyen importantes fuentes de alimento para los depredadores (Barberá *et al.*, 2006). El destino de las semillas al ser digeridas es incierto, pueden ser incorporadas al suelo formando parte del banco de semillas, pueden germinar si son depositadas en un micrositio seguro donde las condiciones sean favorables o bien, ser destruidas al momento de ser digeridas (Rojas-Aréchiga & Vázquez-Yanes, 2000).

En la familia Cactaceae, la relación de la testa de semillas y su importancia ecológica ha sido poco abordada. Uno de los primeros trabajos es el que realizaron Bregman & Bouman (1983) quienes estudiaron los patrones de germinación en semillas de 94 géneros, incluyendo 89 de la familia Cactaceae, con base en aspectos morfológicos y líneas de desarrollo filogenéticas. Sus resultados mostraron que algunas especies necesitan de estructuras específicas, como es el caso del opérculo, el cual es una proliferación del endostoma (tegumento interno alrededor del micrópilo) para germinar (Gómez-Merino *et al.*, 2010).

Otro ejemplo es el trabajo realizado por Maiti *et al.* (1994), los cuales realizaron un estudio con ocho especies de cactáceas relacionando las características anatómicas de la testa y la germinación, encontrando una correspondencia entre estas variables, estos autores mencionan que los bajos porcentajes de germinación podrían estar relacionados con semillas de menor tamaño, debido a que tienen menor contenido del material de reserva.

Sánchez-Salas *et al.* (2015) determinaron las características morfológicas en semillas de *Astrophytum myriostigma* y su importancia en la dispersión. Sus resultados señalan que esta especie posee estructuras específicas, como son cámaras internas para proteger al embrión y para poder flotar, con lo cual concluyen que la dispersión de esta especie ocurre con ayuda del agua.

Con estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue analizar y describir los caracteres morfológicos y anatómicos en semillas de cuatro especies de cactáceas (*Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus latispinus*, *F. pilosus* y *Stenocereus queretaroensis*) distribuidas en el sur del Desierto Chihuahuense, con la finalidad de relacionar estas características con su capacidad germinativa. Se seleccionaron estas especies debido a su importancia ecológica y económica, particularmente el consumo del ser humano de sus frutos y/o tallos, además dos de estas especies, *E. platyacanthus* y *F. pilosus*, se encuentran en categorías de riesgo dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010, la cual enlista aquellas especies nativas del país que se encuentran en alguna categoría de riesgo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron semillas de *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto, *Ferocactus latispinus* Britton & Rose, *F. pilosus* (Galeotti) Werderm y *Stenocereus queretaroensis* (F.A.C.Weber ex Mathes.) Buxb. La colecta de frutos se realizó entre junio y agosto del año 2015 en los municipios de Cerritos, Guadalcázar y Zaragoza, localidades del estado de San Luis Potosí, México, todas ubicadas al sur del Desierto Chihuahuense. Las semillas fueron extraídas directamente del fruto dentro de una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

ESTRUCTURA DE LAS SEMILLAS

Se realizaron medidas de tamaño (largo y ancho) en 20 semillas por cada especie seleccionadas aleatoriamente. Las semillas fueron medidas con un vernier digital. El peso de las semillas se determinó usando grupos de 20 semillas con cinco repeticiones para cada especie.

Se realizó la observación de diversos caracteres morfométricos en 20 semillas por especie seleccionadas aleatoriamente. Los caracteres observados fueron la apariencia de la testa (color, matiz, células de la periferia, borde de la testa), el patrón de las células de la testa (forma celular y su relieve) y la región hilo-micrópilo (HMR, por sus siglas en inglés) (orientación, forma y configuración). Todas estas variables fueron observadas por medio de un estereoscopio óptico (Nikon C-PS), acoplado a una cámara de captura digital de imágenes (LEICA EC3).

La estructura de la testa de semillas se puede estudiar en tres niveles, los cuales pueden ser considerados por separado. El primero, es **una forma multicelular** que incluye la rugosidad de la testa, si las células están diferenciadas o si las células de la cresta de la periferia están agrandadas y diferenciadas del borde de la testa (región adyacente al hilum-micrópilo, HMR) del resto de la testa por una estructura superficial menos elaborada, la cual también se puede expandir o contraer. El segundo nivel de estudio son **las características individuales de las células**, incluyendo uniformidad celular, forma de las células, características de los límites anticlinales de las células, las cuales pueden ser planas, de profundo, acanaladas, o si están relacionadas con paredes periclinales papilosas o elevadas (Fig. 1). Finalmente, el tercer nivel de estudio es **micro-relieves de paredes celulares**, los cuales ocurren en tres condiciones: 1) cuando el micro-relieve no es evidente; 2) cuando la cutícula puede ser estriada sobre las paredes celulares de espesor uniforme; y, 3) cuando la pared celular y/o la cutícula pueden ser verrugosas, esta última característica se encuentra en ciertos miembros de la subtribu Cactinae (Fig. 2) (Barthlott & Hunt, 2000).

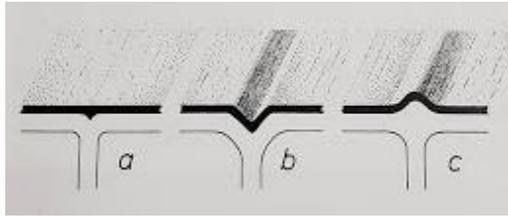


FIGURA 1. RELIEVE DE LOS LÍMITES CELULARES ANTICLINALES: A, LIMITE CASI INVISIBLE; B, ACANALADO; C, ELEVADO (IMAGEN TOMADA DE BARTHLOTT & HUNT, 2000).

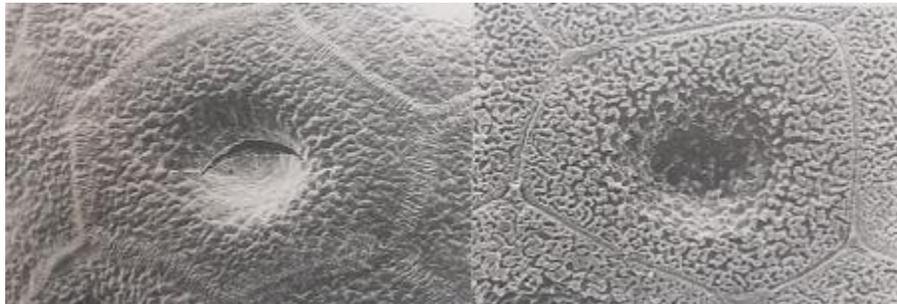


FIGURA 2. CÉLULAS DE LA TESTA CÓNCAVAS TABULARES DE MAMMILLARIA THORNBERI SUBSP. YAQUENSIS. A LA IZQUIERDA SE PRESENTAN CÉLULAS INTACTAS CON CUTÍCULA LISA (ESTRIADO SOLO SOBRE LOS LÍMITES ANTICLINALES). A LA DERECHA SE PRESENTA UNA CÉLULA DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN DE LA CUTÍCULA, LO QUE DEMUESTRA QUE ES LA PARED CELULAR LA QUE PRODUCE LA ESTRUCTURA DE SUPERFICIE DE VERRUCOSA (IMAGEN TOMADA DE BARTHLOTT & HUNT, 2000).

También se realizó la observación de semillas que fueron cortadas longitudinalmente y se montaron en una cinta adhesiva de carbón de doble cara en sujetadores metálicos, para observar la estructura externa de las semillas y la región hilar en un microscopio electrónico de barrido (QuantaTM 200, FEI, OR).

ANATOMÍA DE SEMILLAS

Para determinar si las semillas de las especies estudiadas tienen estructuras internas relacionadas con su germinación, se fijaron cinco semillas de cada especie (*Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus latispinus*, *Ferocactus pilosus* y *Stenocereus queretaroensis*) en una de glutaraldehído al 3%, posteriormente se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol a diferentes concentraciones (10, 30, 50, 70 90 y 100%) y se incluyeron en glicol metacrilato (Technovit[®] 7100, Heraeus Kulzer, DE). Se realizaron cortes transversales de un espesor de 3 μ m con

un microtomo rotatorio (RM2125RT, Leica Microsystems, DE), se tiñeron con una solución acuosa de azul de cresilo brillante al 0.6% (Ruzin, 1999) y se observó el arreglo celular de la testa bajo un microscopio óptico (DM 2000, Leica Microsystems, DE).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos del peso y tamaño de semillas fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía para determinar diferencias entre las semillas de cada especie. Estos análisis fueron realizados en el programa STATISTICA 8.

RESULTADOS

CARACTERES MORFOMÉTRICOS

El tamaño longitudinal de las semillas fue 2.3 ± 0.02 mm para *E. platyacanthus*, 1.4 ± 0.01 mm para *F. latispinus*, 1.7 ± 0.01 mm para *F. pilosus* y de 2.2 ± 0.01 mm para *S. queretaroensis*. La longitud de las semillas mostró diferencias significativas ($F = 440.8$ _(3,76); $p < 0.01$) entre todas las especies.

En cuanto al peso de las semillas, se encontró que el peso promedio de las semillas de *E. platyacanthus* fue de 2.4 ± 0.05 mg, para *F. latispinus* fue de 0.22 ± 0.11 mg, para *F. pilosus* de 0.86 ± 0.06 mg y de 1.6 ± 0.04 mg para *S. queretaroensis*. Al igual que en la longitud, se encontraron diferencias significativas entre el peso de todas las especies ($F = 171.57$ _(3,39); $p < 0.01$).

Observamos una gran variación entre las formas de las semillas estudiadas, mientras que las semillas de *E. platyacanthus* y *S. queretaroensis* presentan forma piriforme, las semillas de ambas especies del género *Ferocactus* presentan forma reniforme (Fig. 3).

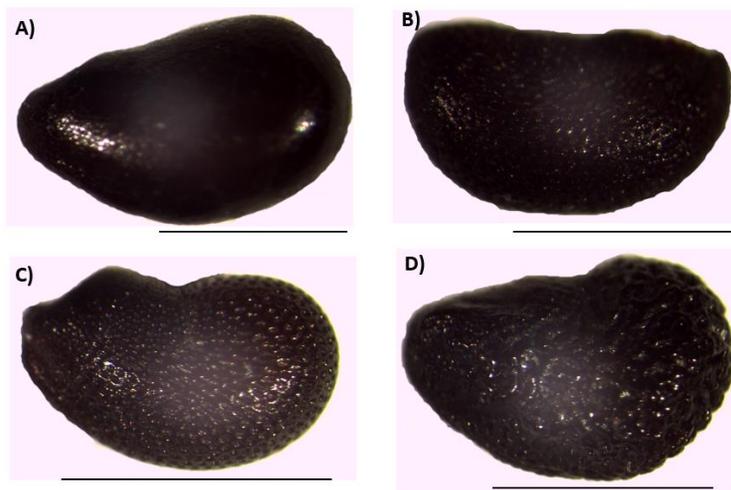


FIGURA 3. SEMILLAS DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS, A) *E. platyacanthus*, B) *F. latispinus*, C) *F. pilosus* Y D) *S. queretaroensis*. BARRA DE ESCALA = 1 MM

APARIENCIA DE LA TESTA

De acuerdo con Barthlott & Hunt (2000) las semillas de las cactáceas se caracterizan por tener color negro, algo que fue observado en las especies de estudio. Las semillas de *E. platyacanthus* y *S. queretaroensis* poseen testa brillante, mientras que *F. latispinus* y *F. pilosus* poseen testa semi-brillante. Para el caso de *E. platyacanthus* se observa una testa lisa, mientras que en el resto de las especies la testa es rugosa y/o porosa (Fig. 3). En cuanto al grosor de la testa, las semillas de *F. latispinus* presentaron la testa más delgada en comparación con el resto de las especies (Fig. 8, pp 44).

Por otro lado, de acuerdo con Barthlott & Hunt (2000), la diferenciación de la periferia de la semilla es algo característico de semillas de cactáceas, particularmente en cactus globulares de América del Norte. En el caso de las cuatro especies de estudio, este carácter no se encuentra diferenciado (Fig. 4). Finalmente, se encontró que *E. platyacanthus* y *F. latispinus* poseen un borde de la HMR no expandido alrededor del hilum, mientras que *F. pilosus* y *S. queretaroensis* presentan un borde ampliamente extendido alrededor del hilum (Fig. 4).

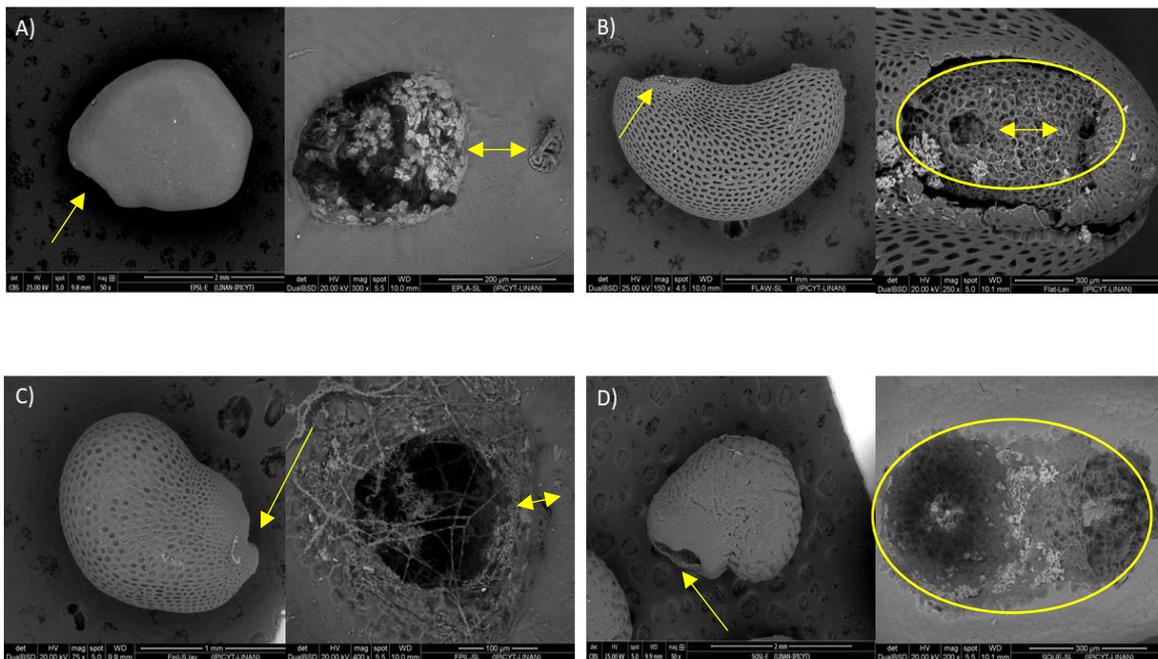


FIGURA 4. MICROGRAFÍAS DE SEMILLAS COMPLETAS Y DE LA REGIÓN DEL HILUM EN *E. platyacanthus* (A), *F. latispinus* (B), *F. pilosus* (C) Y *S. queretaroensis* (D). LAS FLECHAS AMARILLAS SEÑALAN LA REGIÓN HILUM-MICRÓPILO EN LAS SEMILLAS.

CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS PRESENTES EN LA TESTA

El tamaño de las células usualmente incrementa del borde hacia la región apical. Se encontró que *E. platyacanthus* presenta células de tamaño uniforme con respecto a la HMR (Fig. 4A). Contrario a esto, *F. latispinus* (Fig. 4B), *F. pilosus* (Fig. 4C) y *S. queretaroensis* (Fig. 4D) muestran una disminución gradual en el tamaño de las células hacia el hilum. La forma de las células superficiales de la testa puede ser isodiamétrica o elongada. *E. platyacanthus* presenta un arreglo isodiamétrico hexagonal (Fig. 5A). Por otra parte, tanto *F. latispinus* (Fig. 5B) como *F. pilosus* (Fig. 5C), presentan un arreglo alargado. Finalmente, *S. queretaroensis* presenta un acomodo isodiamétrico tetragonal, también se observan estriaciones regulares y finas (Fig. 5D).

Las células periclinales pueden estar planas, o bien, completa o parcialmente convexas o cóncavas. En el caso de *E. platyacanthus* (5A) las células periclinales presentan un relieve plano, por su parte, *F. latispinus* y *F. pilosus* poseen un relieve cóncavo (Figs. 5B y 5C, respectivamente), mientras que *S. queretaroensis* presenta células convexas (Fig. 5D).

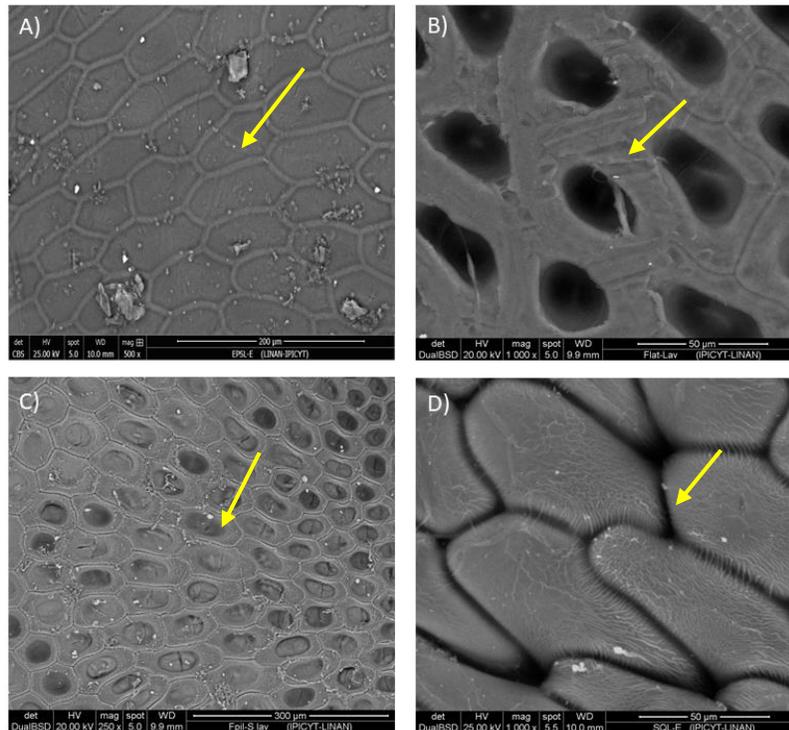


FIGURA 5. CÉLULAS DE LA TESTA DE SEMILLAS DE *E. platyacanthus* (A), *F. latispinus* (B), *F. pilosus* (C) Y *S. queretaroensis* (D). LAS FLECHAS AMARILLAS SEÑALA LAS CÉLULA PERICLINALES DE LA TESTA.

REGIÓN HILUM-MICRÓPILO (HMR, POR SUS SIGLAS EN INGLÉS)

Usualmente el tamaño de esta región es descrito en relación con el tamaño de la semilla entera (Barthlott & Hunt, 2000). De acuerdo con esta clasificación, las cuatro especies estudiadas poseen una HMR de tamaño medio, con una orientación basal, con respecto al eje más largo (Fig. 4). En cuanto a la configuración que posee cada especie de esta región se encontró que *E. platyacanthus* y *F. pilosus* poseen un hilum y micrópilo ligeramente separados (Figs. 4A y 4C, respectivamente). Por su parte *F. latispinus* presenta un hilum y un micrópilo unidos formando un complejo, pero separados por una pequeña banda de tejido (Fig. 4B), mientras que *S. queretaroensis* (Fig. 4D) presenta un micrópilo e hilum formando un solo complejo unido.

ANATOMÍA INTERNA DE SEMILLAS

De las cuatro especies utilizadas en este trabajo, únicamente en dos de ellas, *E. platyacanthus* y *F. pilosus*, se encontró una capa de células en empalizada, también conocidas como macroesclereidas. En el caso de *E. platyacanthus* (Fig. 6), se observa una fila de macroesclereidas inmediatamente debajo de la epidermis (capa exterior de la semilla), que muestra mayores paredes celulares que *F. pilosus*, ya que el lumen, un espacio intracelular que permite el paso de luz, está reducido.

Al igual que *E. platyacanthus*, la capa de macroesclereidas en *F. pilosus* (Fig. 7) se encuentra debajo de la epidermis y seguida de una fila de esclereidas cuadrangulares regulares y el lumen, que se extiende transversalmente a través de la capa macroesclereidea.

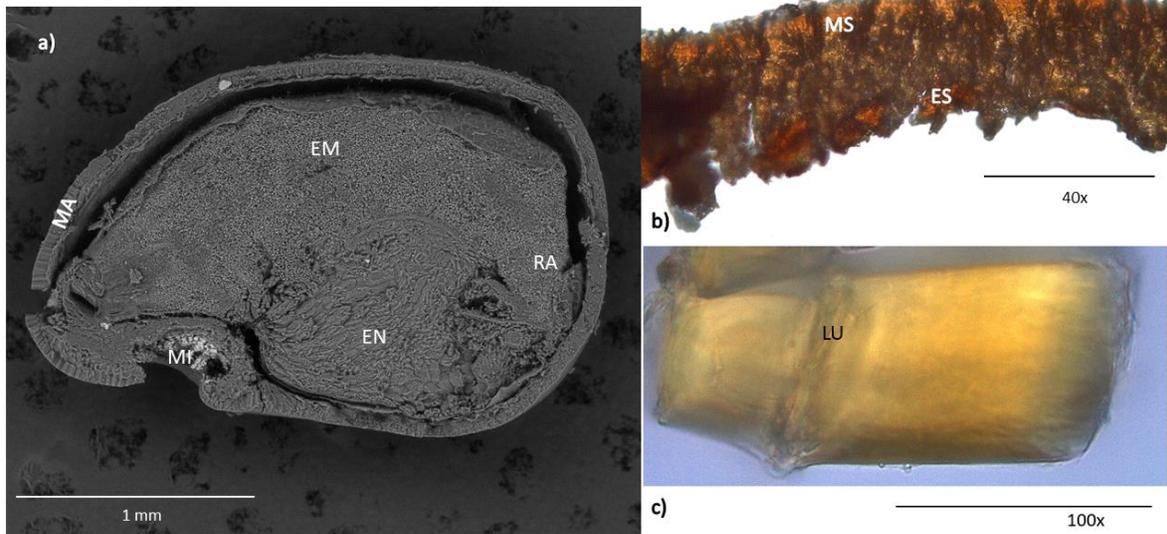


FIGURA 6. ANATOMÍA DE SEMILLAS DE *E. platyacanthus*, (A) SE PRESENTA FOTOMICROGRAFÍA DE LA SECCIÓN LONGITUDINAL EN LA CUAL SE OBSERVA EL EMBRIÓN (EM), ENDOSPERMO (EN), MICRÓPILO (MI), MACROESCLEREIDAS (MA) Y LA RADÍCULA (RA). SECCIÓN LONGITUDINAL DE LA CUBIERTA DE SEMILLA (B), ASÍ COMO UNA MACROESCLEREIDA AISLADA (C), SE OBSERVA UN LUMEN (LU) REDUCIDO. FOTOGRAFIA TOMADA EN UN MICROSCOPIO (DM 2000, LEICA MICROSYSTEMS, DE).

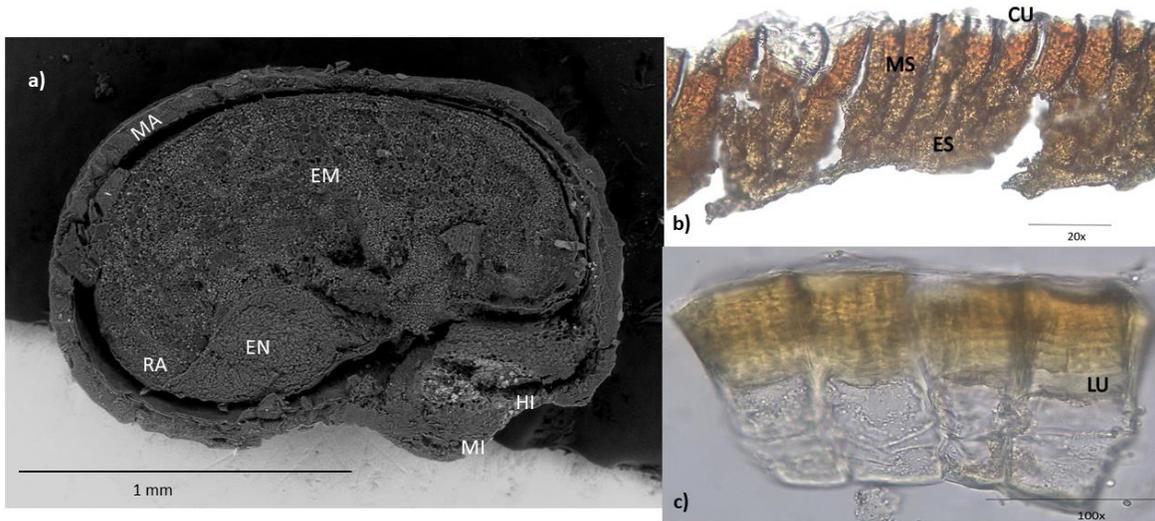


FIGURA 7. CORTE DE SEMILLA DE *F. pilosus*, SECCIÓN LONGITUDINAL DE LA SEMILLA (A) SE OBSERVA EL ACOMODO DE LAS MACROESCLEREIDAS (MA) EN LA TESTA DE LA SEMILLA, EL EMBRIÓN (EM), ENDOSPERMO (EN), HILUM (HI) Y MICRÓPILO (MI). TAMBIÉN SE PRESENTA UN CORTE LONGITUDINAL DE LA TESTA (B) DONDE SE MUESTRA EL ARREGLO DE LAS MACROESCLEREIDAS (MA). FINALMENTE SE MUESTRA UNA MACROESCLEREIDA AISLADA (C) CON EL LUMEN (LU) DE MAYOR TAMAÑO EN COMPARACION CON LO OBSERVADO EN *E. platyacanthus*.

DISCUSIÓN

Se ha reportado que el tamaño de semillas es una variable que puede determinar el establecimiento de plántulas en el ambiente. En este sentido, Barthlott & Hunt (2000) proponen una clasificación con base en el tamaño de semillas. Por otra parte, algunos autores sugieren que en semillas pequeñas existe una menor capacidad de germinación y establecimiento, debido a que poseen menor cantidad de reservas que le permitan hacer frente a las condiciones ambientales (Bregman & Bouman, 1982; Bowers & Pierson, 2001), por lo que, las semillas de *F. latispinus* y *F. pilosus* al tener un menor tamaño, se espera que tengan un menor porcentaje de germinación en comparación con *E. platyacanthus* y *S. queretaroensis*, sin embargo, existen trabajos que sugieren lo contrario que semillas pequeñas presentan mejores porcentajes de germinación (por arriba del 90%) (Flores & Jurado, 2011), por lo que en el siguiente capítulo de esta investigación será evaluado el porcentaje de germinación en nuestras especies de estudio.

De acuerdo con Sánchez-Salas *et al.* (2015), el tamaño pequeño de las semillas facilita su dispersión y persistencia en el suelo, favoreciendo la formación de bancos de semillas. Debido a que los frutos de algunas de las especies de estudio tienden a reventar al secarse (*E. platyacanthus*) arrojando las semillas lejos de la planta madre, tal como sucede con otras especies (Kutschker *et al.*, 2015), por lo que esta podría ser una estrategia utilizada por esta especie para asegurar su futuro establecimiento en los ambientes áridos.

Las zonas de distribución de las especies de estudio son, principalmente, ambientes áridos o semiáridos, aunque también se pueden presentar en climas templados. Las características anatómicas y morfológicas de las plantas son únicas para cada especie y podrían estar ligadas a particularidades del hábitat de cada especie (Sánchez-Salas *et al.*, 2015), pudiendo reflejarse en sus semillas, tal como se reporta en Lateur (2002) en semillas de *Astrophytum myriostigma* cuya forma navicular les permite flotar para ser dispersada a través de escorrentías durante el periodo de lluvias.

Los frutos de las plantas de mayor tamaño de la investigación, *E. platyacanthus* (Aragón-Gastelum *et al.* 2017), *F. pilosus* (Flores & Macías, 2008) y *S. queretaroensis* (Arriaga-Ruiz *et al.*, 2015), son utilizadas como fuente de alimento tanto por el ser humano como por diversas especies animales, quizá por esta razón, las semillas de estas especies en ocasiones son sometidas a algún tipo de escarificación que degrade su testa y así se promueva su germinación. En el caso de *F. latispinus*, se observa una testa más delgada y permeable, por lo que este tipo de tratamiento no es necesario ya que podría dañar al embrión. Sin embargo, es necesario realizar estudios que sustenten esta hipótesis.

En este estudio se encontraron dos tipos de estructuras en las semillas de las cactáceas, lisas (*E. platyacanthus*) y rugosa (*F. latispinus* y *F. pilosus*, así como *S. queretaroensis*). Se ha observado que, del peso de semillas lisas, aproximadamente 45% de su peso seco corresponde a almidón, mientras que las semillas rugosas presentan un menor contenido de almidón, aproximadamente el 35% (Semillas, 2020), un compuesto que es degradado durante la germinación de semillas (Kim *et al.*, 2017).

Maiti *et al.* (1994) sugieren que, al germinar las semillas de cactáceas, la emergencia de la radícula ocurre generalmente, en la región del micrópilo, por medio de las fracturas que presentan las semillas en esta zona. También sugieren que las semillas con testas delgadas tienen mayor capacidad de germinar en comparación con las semillas de testas gruesas. En este estudio, se observó que las semillas de *F. latispinus* presentaron una testa delgada y altos porcentajes de germinación (>85%) (Fig. 12, pp 50).

Las macroesclereidas están presentes en la testa de las semillas y limitan la entrada de agua al interior de las mismas, propiciando la latencia física. Hasta ahora no se ha reportado este arreglo celular en especies de la familia Cactaceae, sin embargo, existen trabajos en los que se sospecha su presencia sin lograrla confirmar (Orozco-Segovia *et al.*, 2007). En esta investigación se encontró evidencia de un arreglo celular similar al presentado por macroesclereidas en semillas de *E. platyacanthus* y *F. pilosus*, sin embargo, es necesario realizar más estudios con el fin de corroborar este hallazgo en estas y otras especies de la familia. De ser

corroborada su presencia, se estaría hablando de otra estrategia presente en la familia Cactáceae, ya que el único tipo de latencia comprobado para este grupo es latencia fisiológica.

CONCLUSIONES

El éxito en la germinación de cactáceas en ecosistemas áridos y semiáridos claramente depende de varios factores que, hasta cierto punto han sido ignorados, como son las características morfológicas, el tamaño y los rasgos anatómicos de sus semillas, e incluso a la condición ecológica en la que estas se encuentran, mismos que podrían tener influencia en los mecanismos de dispersión utilizados o su capacidad para sobrevivir en el ambiente formando bancos de semillas. Esta primera etapa de la investigación asentó las bases para comprender aspectos fundamentales en la germinación de las especies de cactáceas estudiadas.

CAPÍTULO II

GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE CACTÁCEAS DEL SUR DEL DESIERTO CHIHUAHUENSE: EFECTO DE MUCÍLAGO, LUZ Y FITOHORMONAS

Este artículo fue publicado en la revista científica Flora, para consultar la versión original buscar la siguiente referencia:

Mascot-Gómez E, Flores J, López-Lozano NE, Yáñez-Espinosa L 2020. Seed germination of Southern Chihuahuan Desert cactus: Effect of mucilage, light and phytohormones. Flora, 263: 151528.

INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae es endémica del hemisferio occidental, excepto para *Rhipsalis baccifera*, la cual también se encuentra en África y Asia (Ortega-Baes *et al.*, 2010). Esta familia comprende 124 géneros y 1,427 especies (Hunt, 2006). Las poblaciones de estas especies son drásticamente afectadas debido a la sobre extracción y severa perturbación de sus hábitats (Goettsch *et al.*, 2015). Las cactáceas son utilizadas para alimento, forraje, obtener medicamentos, y uso ornamental, así como fuente de madera (Ortega-Baes *et al.*, 2010, Goettsch *et al.*, 2015). Por tal motivo, 140 especies de cactus mexicanos se encuentran amenazadas y 32 especie están en peligro crítico formando parte de la lista roja de la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, por sus siglas en inglés) (Goettsch *et al.*, 2015).

Los estudios sobre la germinación de semillas podrían ayudar a la conservación de especies en categoría de riesgo, pues la posibilidad de obtener plantas a través de la propagación podría disminuir la demanda en la colecta de material silvestre (Flores *et al.*, 2008). Así el conocimiento de los factores que afectan la germinación es relevante en la propagación de especies silvestres para propósitos de conservación (Khurana & Singh, 2001), además, es fundamental entender la ecología de la germinación (Baskin & Baskin, 2014).

La germinación de semillas es uno de los estadios más vulnerables en la reproducción de cactáceas, muchas semillas no germinan debido a que son ingeridas por animales, atacadas por patógenos, o porque las condiciones ambientales son (permanente o temporalmente) inadecuadas para su establecimiento (Bregman & Graven, 1997), o bien, las semillas están en estado de latencia (Rojas-Aréchiga & Vazquez-Yanes, 2000).

La latencia es una falla temporal o bloqueo de una semilla viable para completar la germinación en condiciones físicas que normalmente la favorecen (Kucera *et al.*, 2005). La latencia de semillas es una adaptación para incrementar las probabilidades de germinación en un sitio seguro al momento ideal para tener éxito en el establecimiento de una plántula (Baskin & Baskin, 2014). Por lo tanto, la

germinación de semillas es un aspecto clave en la biología de las plantas y superar el periodo de latencia es necesario para que muchas cactáceas logren germinar (Rojas-Aréchiga & Vazquez-Yanes, 2000).

Las semillas de varias especies de cactáceas tienen latencia fisiológica (Rojas-Aréchiga & Vázquez Yanes, 2000). Algunas especies necesitan de un periodo de “after-ripening” (post-maduración) para superar el estado de latencia en semillas con embriones con bajo crecimiento potencial, como en *Opuntia tormentosa* (Orozco - Segovia et al., 2007), *O. streptacantha*, *O. leucotracha* y *O. robusta* (Delgado – Sánchez et al., 2011; 2013), así como en *Turbinicarpus lophophoroides* y *T. pseudopectinatus* (Flores et al., 2008). Otras especies como *O. compressa* y *O. macrorhiza* necesitan un periodo de estratificación para obtener mayores porcentajes de germinación (Baskin & Baskin, 1977).

Las hormonas tales como el ácido giberélico (GA_3) juegan un papel clave en la liberación de latencia fisiológica y en la promoción de la germinación en varias especies vegetales (Baskin & Baskin, 2004; Kucera et al., 2005). El GA_3 está involucrado en el rompimiento de la latencia en varias especies de cactáceas (McDonough, 1964; Brencher et al., 1978; Zimmer & Buttner, 1982; Deno, 1994; Sánchez – Venegas, 1997). El GA_3 puede actuar como una alternativa parcial al requerimiento de luz en *Carnegieia gigantea* y *Lemaireocereus thurberi* (*Stenocereus thurberi*) (McDonough, 1964); *Gymnocalycium oursellianum* (*G. monvillei*), *Hamatocactus setispinus* (*Thelocactus setispinus*), *Heliabravoa chende* (*Polaskia chende*), *Pachycereus hollianus* (*Lemaireocereus hollianus*), *Rebutia marsoneri* y *R. minuscula* (Brencher et al., 1978), *Gymnocalycium mihanovichii*, *Eulychnia longispina* (*E. breviflora*) y *E. castanea* (Zimmer & Buttner, 1982).

Las auxinas son reguladores del crecimiento y también pueden promover la germinación en algunas especies (Kucera et al., 2005), aunque por sí mismas no son una hormona necesaria en la germinación. De acuerdo con análisis respecto a la expresión de genes relacionados con auxinas, esta fitohormona está presente en la punta de la radícula de la semilla durante y después de la germinación de semillas (Miransari & Smith, 2014). Hasta ahora solo existen dos estudios con respecto al uso de auxinas para promover la germinación en cactáceas, *Ferocactus histrix* y *F.*

latispinus sin haberse encontrado un efecto de esta fitohormona (Amador-Alfárez *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha observado que bacterias aisladas de la raíz de *Mammillaria* spp. producen ácido indol-3-acético (IAA), una auxina comúnmente encontrada en plantas, reduciendo el tiempo de germinación de esta cactácea (Chávez – Ambriz *et al.*, 2016).

Por otra parte, la luz tiene un efecto estimulante en la germinación en muchas especies de cactáceas (Flores *et al.*, 2006, 2011, 2016; Meiado *et al.*, 2016). En algunas cactáceas la luz es un requerimiento condicionado al lavado de semillas antes de la siembra, por ejemplo, en semillas de *Melocactus curvispinus* subsp. *caesius*, las cuales fueron sembradas después de su cosecha, sin observar germinación bajo condiciones de luz u oscuridad, pero al someterla a un tratamiento de lavado antes de la siembra, se estimuló su germinación en 100 % bajo condiciones de luz (Arias & Lemus, 1984). Quizá los fenoles presentes en la testa de la semilla inhiben la germinación (Debeaujon *et al.*, 2000). Sin embargo, semillas de otras especies de cactáceas, por ejemplo, *Echinopsis thionanta* o *Gymnocalycium gibbosum*, tienen una capa secretora (mucílago) que absorbe agua y la distribuye sobre la superficie de la semilla; una capa enriquecida de proteínas que parece ser hidrofílica y que rodea la semilla madura y mejora la germinación en condiciones relativamente secas (Bregman & Graven, 1997).

La hipótesis para esta etapa de trabajo es que en algunas especies de cactáceas del sur del Desierto Chihuahuense; I) las semillas con mucílago tienen mayor porcentaje de germinación y menor tiempo de germinación, y II) las semillas de cactáceas son fotoblásticas positivas, pero el suplemento de fitohormonas como el GA₃ y el IAA promoverán la germinación en condiciones de oscuridad.

MATERIALES Y MÉTODOS

ESPECIES DE ESTUDIO

Las especies estudiadas fueron *Coryphantha maiz-tablasensis* Fritz Schwarz ex Backeb, *Echinocactus platyacanthus* (Link & Otto), *Ferocactus latispinus* (Haw.)

Britton & Rose, *F. pilosus* (Galeotti) Werderm y *Stenocereus queretaroensis* (F.A.C. Weber) Buxb. Estas especies fueron elegidas debido a su uso ornamental (todas las especies), además por sus frutos (*S. queretaroensis*) y tallos comestibles (*E. platyacanthus*, *F. latispinus* y *F. pilosus*). Dos de estas especies, *E. platyacanthus* y *F. pilosus* están bajo protección especial, mientras que *C. maiz-tablasensis* se encuentra en categoría de amenazada en el marco de las leyes y reglamentos ambientales de México (SEMARNAT, 2010). Tres de estas especies, *E. platyacanthus*, *F. latispinus* y *S. queretaroensis*, están ampliamente distribuidas al sur del Desierto Chihuahuense y en regiones semiáridas del centro y sur de México, las dos especies restantes, *C. maiz-tablasensis* y *F. pilosus*, tienen una distribución limitada al sur del Desierto Chihuahuense (Guzmán *et al.*, 2003).

Tres de estas especies, *E. platyacanthus*, *F. latispinus* y *S. queretaroensis*, son fotoblásticas positivas (Flores *et al.*, 2011), además, dos especies, *E. platyacanthus* y *F. pilosus*, poseen memoria hídrica (Contreras-Quiroz *et al.*, 2016). La germinación de semillas de *C. maiz-tablasensis* no ha sido evaluada anteriormente.

El número de semillas producidas por un solo fruto de cactáceas puede ser enorme, algunas especies presentan más de 1,000 semillas por fruto (*Pilosocereus chrysacanthus*) o solo de 1 a 5 semillas por fruto (*Epithelantha* spp. y *Pereskia aculeata*) (Rojas-Aréchiga & Vázquez-Yanes, 2000). En el caso de las especies de estudio, el número de semillas por fruto en *Coryphantha* spp es menor a 100 (Loza-Cornejo *et al.*, 2012), de 171 semillas en *E. platyacanthus* (Jiménez-Sierra *et al.*, 2007) y de 922 semillas en *S. queretaroensis* (Ibarra-Cerdeña *et al.*, 2005). En el caso de *F. latispinus* y *F. pilosus* el número de semillas por fruto es desconocido.

El peso de semillas de cactáceas varía de 0.046 a 16 mg (Flores *et al.*, 2011). Las semillas de las especies de este estudio son pequeñas; *E. platyacanthus* (2.62 mg), *F. latispinus* (0.26 mg) y *S. queretaroensis* (2.27 mg) (Flores *et al.*, 2011) y *F. pilosus* (1.2 mg) (Contreras-Quiroz *et al.*, 2016). La masa de *C. maiz-tablasensis* es desconocida.

COLECTA DE SEMILLAS

Las semillas de estas cinco especies fueron colectadas a partir de frutos maduros completamente cerrados al sur del Desierto Chihuahuense, México. Las semillas fueron extraídas dentro de una campana de flujo laminar y se dejaron secar a temperatura ambiente (21- 23 °C) y se almacenaron en bolsas de papel, también a temperatura ambiente hasta realizar los experimentos.

PRUEBAS DE IMBIBICIÓN

Se pesaron en seco tres grupos de 15 semillas por especie. Las semillas se colocaron en cajas Petri con 2 ml de agua destilada y se pesaron cada 10 minutos durante las dos primeras horas, luego cada hora hasta alcanzar un peso constante, lo que se consideró la máxima imbibición. Previo a cada pesaje, el agua fue removida de las cajas Petri. Debido a la falta de semillas, *C. maiz-tablasensis* no fue utilizada en esta prueba. Los datos son presentados como porcentaje de imbibición ($IP = (\text{peso de semillas embebidas} - \text{peso seco de semillas}) * 100$) de acuerdo con Lima & Meiado (2017).

GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Este experimento fue realizado para evaluar el efecto del mucílago (con y sin), condiciones de luz (luz y oscuridad) y fitohormonas (seis concentraciones de ácido giberélico (GA_3) y ácido indol-3-acético (IAA)) sobre el porcentaje de germinación y el tiempo medio de germinación, MGT (Ranal *et al.*, 2009). El mismo diseño experimental factorial fue usado para todos los experimentos. Se emplearon tres repeticiones por tratamiento, con 10 semillas por repetición. Las semillas se pusieron a germinar en una cámara de germinación (Lumistell ICP-19 d-c/iv, con tubos de luz blanca fluorescente de aproximadamente $38 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a 25 °C. Las semillas se colocaron en cajas Petri con agar al 1 %. La germinación (protrusión de la radícula) fue monitoreada diariamente para las semillas en condiciones de luz

y al final de 30 días para las semillas incubadas en condiciones de oscuridad. Al final del periodo de incubación la viabilidad de las semillas fue revisada cortando cada semilla para ver si el embrión estaba presente y parecía saludable (Flores *et al.*, 2011).

EFEECTO DE FITOHORMONAS

En cada fitohormona, GA₃ y IAA, tuvimos seis concentraciones (0, 50, 100, 250, 500 y 1,000 mg L⁻¹).

EFEECTO DE LA REMOCIÓN DEL MUCÍLAGO

Debido a que enjuagar en agua pura no fue un método eficiente para remover el mucílago formado en la cubierta de la semilla, se utilizó el tratamiento de esterilización de López *et al.* (2011) para remover la capa de mucílago, el cual consistió en: lavar las semillas con Tween 20 (al 2 %) durante 10 minutos, seguido de 10 enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, se enjuagaron las semillas en etanol (100 %) durante 1 minuto, seguido de 3 minutos en hipoclorito de sodio (6 %) y cinco enjuagues con agua destilada estéril. Inmediatamente después las semillas se enjuagaron cinco veces con tiosulfato de sodio (2 %) y finalmente se realizaron diez enjuagues con agua destilada estéril, todos estos tratamientos se realizaron en agitación constante. Semillas sin esterilizar fueron usadas como tratamiento control.

Para determinar si las semillas utilizadas en este estudio tenían una capa secretora (mucílago), se realizaron dos pruebas; primero, aleatoriamente se seleccionaron cinco semillas por especie por tratamiento de lavado (lavadas y no lavadas), a las cuales se les colocó en una solución de cresyl blue (1 %) para teñir la parte de pectina del mucílago (Martini *et al.*, 2008; Barrios *et al.*, 2015). Dos horas después, ambos grupos de semillas fueron seccionadas para determinar la presencia del mucílago en el micrópilo, esta prueba sirvió saber si esta capa funciona como una barrera que regula la entrada de agua.

En la segunda prueba se utilizaron cinco semillas de cada especie, tanto lavadas como no lavadas, seleccionadas al azar, posteriormente se montaron en una cinta adhesiva de carbono de doble cara sobre pasadores de metal para analizar la estructura de la testa observada bajo un microscopio electrónico de barrido (Quanta™ 200, FEI, OR). Debido a la falta de material, semillas de *C. maiz-tablasensis* no fueron utilizadas en esta prueba.

EFEECTO DE LA LUZ

Para los tratamientos de luz se utilizó un fotoperíodo diario de 12 h de luz (en lo sucesivo “luz”) y otro en oscuridad continua (en lo sucesivo “oscuridad”) en una cámara de germinación durante 30 días. Para las condiciones de incubación del tratamiento de oscuridad, se utilizaron cajas Petri las cuales fueron envueltas con una doble capa de papel aluminio, tal como es sugerido por Baskin & Baskin (2014). La cámara se ajustó a 25 °C de acuerdo con Nobel (1988) como la temperatura más adecuada para las cactáceas. Para reducir las fluctuaciones de temperatura, se utilizaron lámparas fluorescentes y ventilación del aire.

DISEÑO EXPERIMENTAL

La germinación de semillas fue evaluada en condiciones de luz y oscuridad. En cajas Petri con agar al 1 %, se colocaron diez semillas de cada especie con tres repeticiones. Para las condiciones de luz, las cajas Petri se colocaron en una cámara de germinación (Lumistell ICP-19 d-c / iv, con aproximadamente 38 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con tubos de luz blanca fluorescente). Para las condiciones de oscuridad, las cajas Petri fueron envueltas con una doble capa de papel aluminio, de acuerdo con lo sugerido por Baskin & Baskin (2014). La germinación (protrusión de la radícula) fue monitoreada diariamente para las semillas en los tratamientos de luz, mientras que en las semillas sometidas al tratamiento de oscuridad se evaluó la protrusión de la radícula al finalizar el experimento, después de 30 días. Al final del período de incubación, se comprobó la viabilidad de las semillas no germinadas

cortando cada semilla para ver si el embrión estaba presente y lucía saludable. Las variables de respuesta en este experimento fueron porcentaje de germinación y tiempo medio de germinación (MGT) (Ranal *et al.*, 2009).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos de las pruebas de imbibición fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía para determinar diferencias entre semillas intactas (con mucílago) y semillas lavadas (sin mucílago) para cada especie. Los porcentajes de germinación fueron transformados usando el arcoseno de la raíz cuadrada para cumplir los lineamientos del ANOVA (Sokal & Rohlf, 1994). Los datos del porcentaje de germinación y el MGT fueron obtenidos con el programa GerminaQuant (Marques *et al.*, 2015). Un ANOVA de dos vías fue realizado para los porcentajes de germinación y el MGT, en los cuales los factores fueron las concentraciones de fitohormonas (GA_3) y la presencia o no de la capa de mucílago. Debido a que en condiciones de oscuridad la germinación fue nula o casi nula, el tratamiento de luz no fue incluido en los análisis estadísticos. Los tratamientos con IAA tampoco fueron incluidos en los análisis por la misma razón. Todas las pruebas de ANOVA fueron realizadas en el programa STATISTICA 8. Para todas las especies, diferencias entre tratamientos fueron determinados por medio de pruebas de Tukey.

RESULTADOS

PRESENCIA DE MUCÍLAGO

Todas las especies presentaron una capa de mucílago (Fig. 8). Se observó que semillas sin mucílago presentaron mayor tinción por el cresyl blue internamente en comparación con las semillas con mucílago, excepto en *F. latispinus* (Fig. 8). El tratamiento de esterilización removió la capa de mucílago, incluso en la zona del micrópilo donde también estaba presente (Fig. 9).

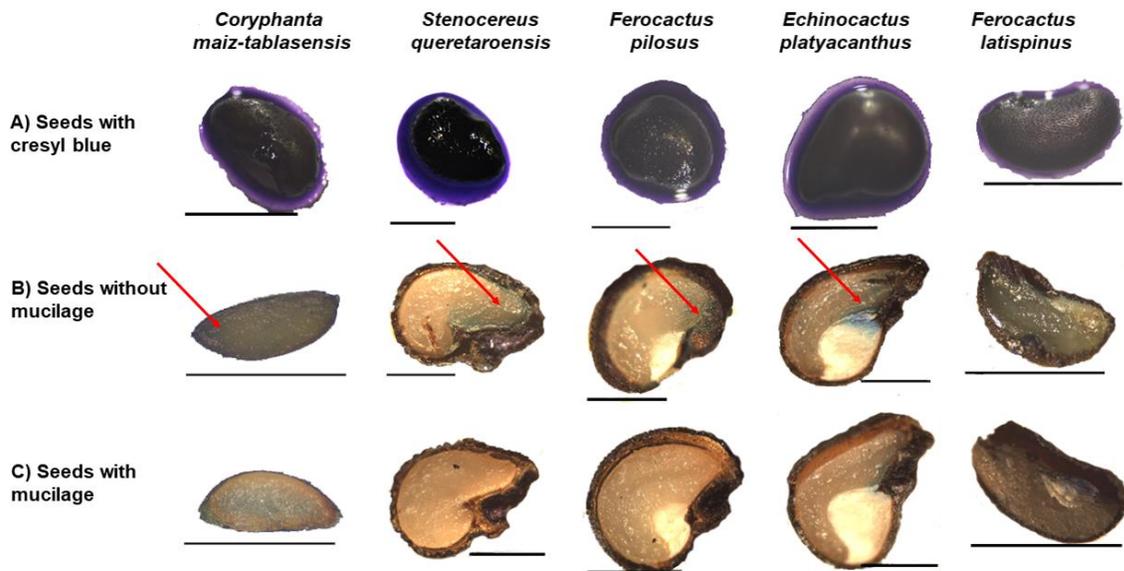


FIGURA 8. A) RESULTADO DE FORMACIÓN Y TINCIÓN DEL MUCÍLAGO CON CRESYL BLUE ALREDEDOR DE SEMILLAS DE CINCO ESPECIES DE CACTÁCEAS. B) SEMILLAS DE CACTÁCEAS SOMETIDAS AL TRATAMIENTO DE LAVADO (SIN MUCÍLAGO) MOSTRANDO QUE LA SOLUCIÓN DE CRESYL BLUE INGRESO AL INTERIOR DE LAS SEMILLAS. C) SEMILLAS DE CACTÁCEAS NO LAVADAS (CON MUCÍLAGO), SE OBSERVA QUE EL COLORANTE CRESYL BLUE NO INGRESÓ AL INTERIOR DE LAS SEMILLAS, Y QUE LA CAPA DE MUCÍLAGO PUEDE FUNCIONAR TAMBIÉN PARA RETENER Y FACILITAR EL PASO HACIA EL INTERIOR DEL AGUA. LAS FLECHAS INDICAN EL ÁREA MÁS COLOREADA POR EL CRESYL BLUE. LA BARRA EN LA PARTE INFERIOR DE LAS SEMILLAS ES DE 1 MM.

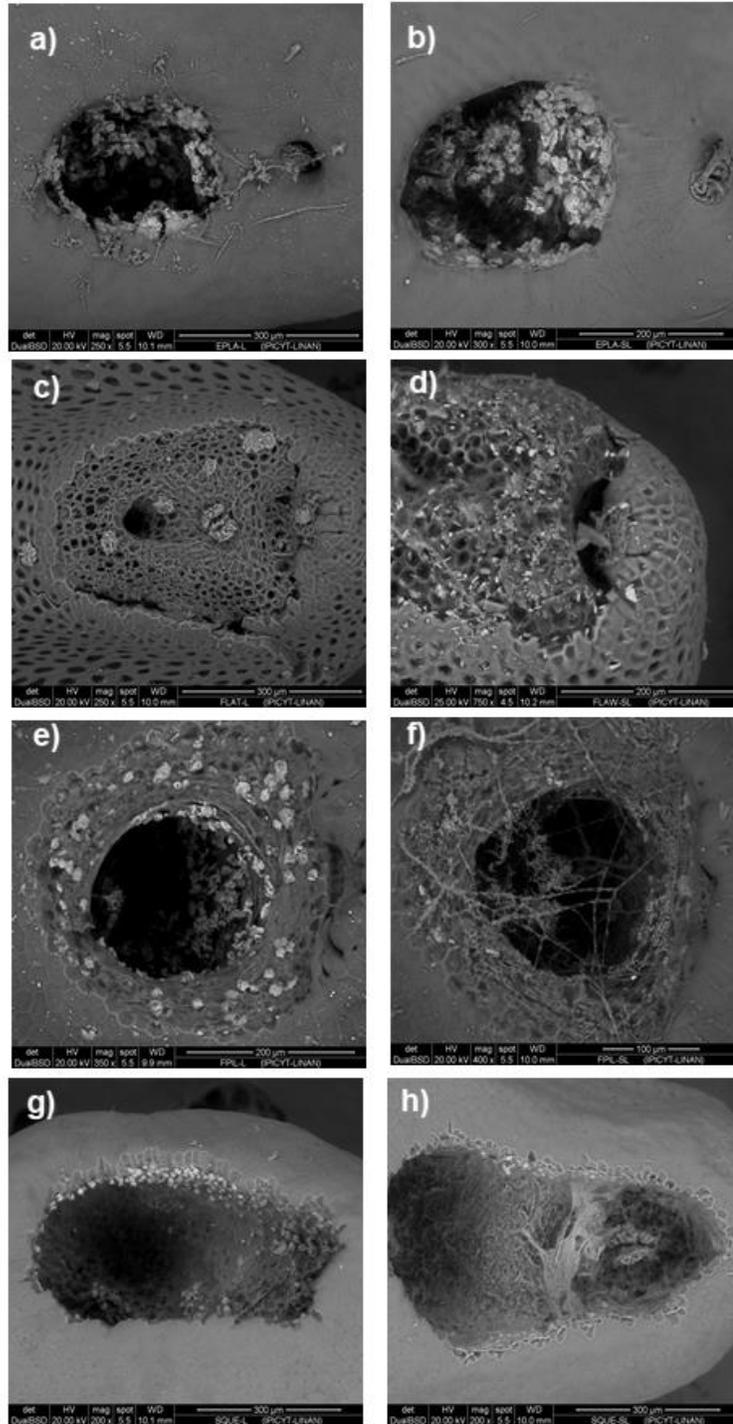


FIGURA 9. FOTOMICROGRAFÍAS DEL MUCÍLAGO REMOVIDO DEL MICRÓPILO EN LAS SEMILLAS DE: *E. platyacanthus* (A), *F. latispinus* (C), *F. pilosus* (E) Y *S. queretaroensis* (G); Y EL MUCÍLAGO CUBRIENDO EL MICRÓPILO DE LA SEMILLA EN *E. platyacanthus* (B), *F. latispinus* (D), *F. pilosus* (F) Y *S. queretaroensis* (H). FOTOMICROGRAFÍAS OBTENIDAS CON UN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.

PRUEBAS DE IMBIBICIÓN DE SEMILLAS

En general, la imbibición de semillas fue menor al 10 %, en las cuatro especies (Fig. 10). Sin embargo, se encontró mayor porcentaje de imbibición en semillas con mucílago que en aquellas donde se removió esta capa para *F. latispinus* ($F = 20.425$, $p = 0.01$) y *F. pilosus* ($F = 8.049$, $p = 0.04$). La remoción de mucílago no influyó en la imbibición de las semillas de *E. platyacanthus* ($F = 0.496$, $p = 0.52$) o *S. queretaroensis* ($F = 0.374$, $p = 0.57$).

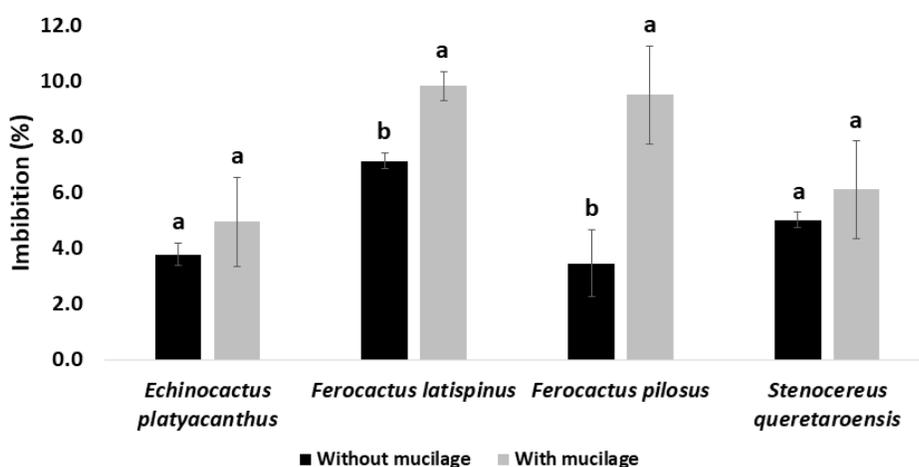


FIGURA 10. PORCENTAJE DE IMBIBICIÓN DE SEMILLAS EN CUATRO ESPECIES DE CACTÁCEAS SIN MUCÍLAGO (COLUMNA NEGRA) Y CON MUCÍLAGO (COLUMNA GRIS). DIFERENTES LETRAS INDICAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ($P < 0.05$) ENTRE MEDIAS DE CADA ESPECIE.

EFFECTO DE FITOHORMONAS, REMOCIÓN DEL MUCÍLAGO Y TRATAMIENTOS DE LUZ SOBRE EL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN

Las semillas de *C. maiz-tablasensis* no fueron afectadas por la presencia del mucílago, por el GA_3 , o por la interacción de estos dos factores (Tabla 1). Las semillas con mucílago a 50 mg/L de GA_3 presentaron bajos porcentajes de germinación en comparación con el resto de los tratamientos (Fig. 11A). Las semillas de esta especie germinaron por arriba del 90 %, independientemente si contaban o no con una capa del mucílago (Fig. 12). Las semillas de esta especie no

germinan en condiciones de oscuridad y el GA₃ no promovió la germinación en esta condición (datos no mostrados).

TABLA 1. RESULTADOS DE LOS ANOVA DE DOS VÍAS UTILIZADOS PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GA₃ Y LA REMOCIÓN DE MUCÍLAGO EN EL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN Y MGT DE LAS CINCO ESPECIES DE CACTÁCEAS. LA TABLA MUESTRA LOS ESTADÍSTICOS (F, GRADOS DE LIBERTAD Y P) PARA LOS EFECTOS DE CADA UNO DE ESTOS FACTORES Y SUS COMBINACIONES DE NIVELES (= 0.05).

	Germinación (%)	Tiempo medio de germinación (MGT)
<i>Coryphantha maiz-tablasensis</i>		
GA ₃	F _(5,24) = 2.10, p = 0.10	F _(5,24) = 4.42, p < 0.01
Capa de mucílago	F _(1,24) = 0.50, p = 0.48	F _(1,24) = 139.87, p < 0.01
GA ₃ x Capa de mucílago	F _(5,24) = 2.90, p = 0.03	F _(5,24) = 6.78, p < 0.01
<i>Echinocactus platyacanthus</i>		
GA ₃	F _(5,24) = 7.71, p < 0.01	F _(5,24) = 2.45, p = 0.06
Capa de mucílago	F _(1,24) = 662.47, p < 0.01	F _(1,24) = 87.98, p < 0.01
GA ₃ x Capa de mucílago	F _(5,24) = 2.19, p = 0.08	F _(5,24) = 1.75, p = 0.15
<i>Ferocactus latispinus</i>		
GA ₃	F _(5,24) = 16.18, p < 0.01	F _(5,24) = 0.38, p = 0.85
Capa de mucílago	F _(1,24) = 216.02, p < 0.01	F _(1,24) = 46.07, p < 0.01
GA ₃ x Capa de mucílago	F _(5,24) = 22.58, p < 0.01	F _(5,24) = 0.68, p = 0.63
<i>Ferocactus pilosus</i>		
GA ₃	F _(5,24) = 4.39, p < 0.01	F _(5,24) = 5.77, p < 0.01
Capa de mucílago	F _(1,24) = 1.95, p = 0.17	F _(1,24) = 8.10, p < 0.01
GA ₃ x Capa de mucílago	F _(5,24) = 1.29, p = 0.29	F _(5,24) = 1.30, p < 0.29
<i>Stenocereus queretaroensis</i>		
GA ₃	F _(5,24) = 0.64, p = 0.66	F _(5,24) = 7.70, p < 0.01
Capa de mucílago	F _(1,24) = 756.28, p < 0.01	F _(1,24) = 0.77, p = 0.57
GA ₃ x Capa de mucílago	F _(5,24) = 0.02, p = 0.99	F _(5,24) = 0.59, p < 0.70

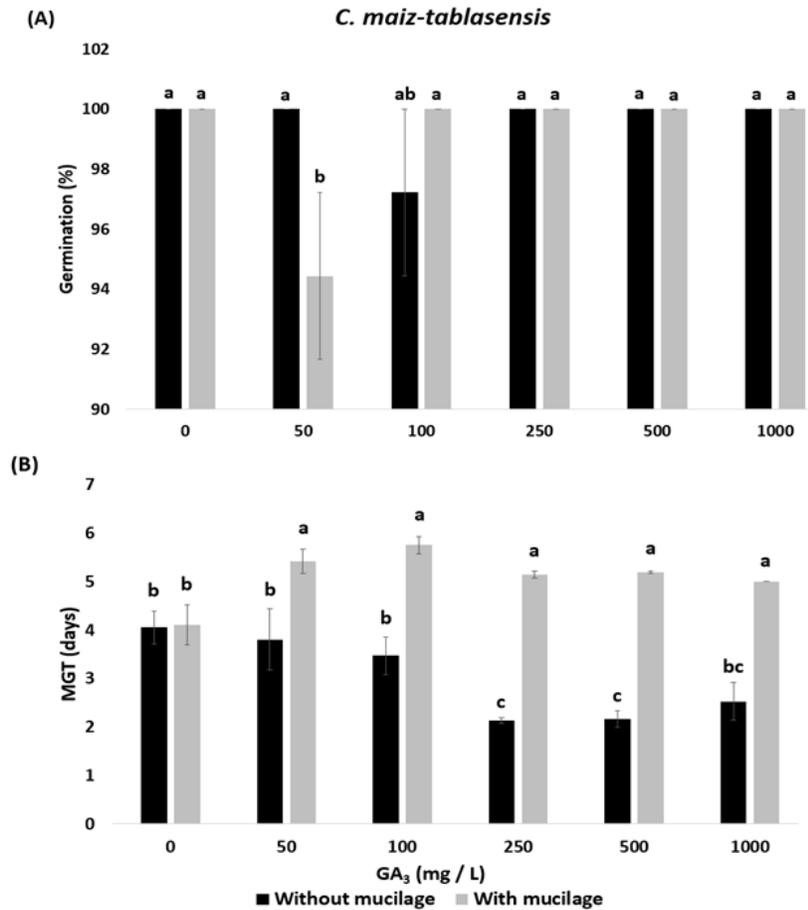


FIGURA 11. GERMINACIÓN DE SEMILLAS (A) Y TIEMPO MEDIO DE GERMINACIÓN (MGT) (B) DE SEMILLAS DE *Coryphantha maiz-tablasensis* BAJO TRATAMIENTOS COMBINADOS DE GA₃ Y MUCÍLAGO. LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS (P < 0.05) ENTRE MEDIAS DE TODAS LAS INTERACCIONES DE TRATAMIENTOS

Los porcentajes de germinación en *E. platyacanthus* difirieron por la capa de mucílago y el contenido de GA₃, pero la interacción de estos factores no fue significativa (Tabla 1). En semillas con mucílago la germinación (%) fue cuatro veces superior que en semillas sin mucílago (Fig. 12). Además, se observaron mayores porcentajes de germinación a 500 y 1,000 mg l⁻¹ que en 50 y 100 mg l⁻¹ (Tabla 2). Las semillas no germinaron en oscuridad y el GA₃ no promovió la germinación en esta condición.

TABLA 2. GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GA₃. LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P < 0.05) ENTRE MEDIAS EN CADA ESPECIE

GA ₃ (mg l ⁻¹)	<i>C. maiz-tablasensis</i>	<i>E. platyacanthus</i>	<i>F. latispinus</i>	<i>F. pilosus</i>	<i>S. queretaroensis</i>
0	100 ± 0.0 a	54.44 ± 17.67 ab	61.11 ± 16.64 c	55.00 ± 6.71 b	95.55 ± 2.22 a
50	97.22 ± 1.26 a	46.67 ± 16.06 b	54.44 ± 13.71 c	56.66 ± 9.55 b	97.77 ± 2.22 a
100	98.61 ± 1.39 a	43.33 ± 15.56 b	57.78 ± 14.47 c	71.66 ± 3.07 ab	97.77 ± 2.22 a
250	100 ± 0.0 a	56.66 ± 16.58 ab	67.78 ± 9.49 c	73.33 ± 4.22 ab	95.55 ± 2.22 a
500	100 ± 0.0 a	60.00 ± 14.4 a	80 ± 3.44 b	66.66 ± 3.33 ab	93.33 ± 6.66 a
1000	100 ± 0.0 a	67.77 ± 11.85 a	88.89 ± 4.77 a	85.00 ± 3.42 a	97.77 ± 2.22 a

Para *F. latispinus* la germinación difirió por la capa de mucílago y GA₃, además, se observaron diferencias significativas entre la interacción de estos factores (Tabla 1). Se observó mayor porcentaje de germinación en semillas con mucílago que en aquellas donde se removió esta capa (Fig. 12), en cuanto al efecto del GA₃, concentraciones de 1,000 mg l⁻¹ presentaron mayor porcentaje de germinación en comparación con el resto de las concentraciones utilizadas (Tabla 2). Las semillas con mucílago presentaron mayor germinación a 0, 50, 100 y 250 mg l⁻¹ de GA₃, que semillas sin mucílago, pero a concentraciones de 500 y 1,000 mg l⁻¹ las semillas sin mucílago no mostraron diferencias entre aquellas que conservaron esta capa (Fig. 13).

Los porcentajes de germinación en *F. pilosus* solamente fueron afectados por GA₃ (Tabla 1), observándose mayor porcentaje de germinación a 1,000 mg l⁻¹ de esta fitohormona que en las concentraciones más bajas (Tabla 2). No se encontraron diferencias entre semillas con y sin mucílago (Fig. 12). Las semillas no germinaron en oscuridad y el GA₃ no promovió la germinación en esta condición.

En *S. queretaroensis* el porcentaje de germinación difirió por la capa de mucílago, pero no por la fitohormona o la interacción entre estos factores (Tabla 1). El porcentaje de germinación fue de casi 50 veces más en semillas con mucílago que en las semillas donde se removió esta capa (Fig. 12). El GA₃ no promovió la germinación en condiciones de luz, pero en oscuridad promovió la germinación en

un 60% a 1,000 mg l⁻¹ de GA₃ (datos no mostrados). Las semillas sin mucilago presentaron muy baja germinación.

Para todas las especies, la mayoría de las semillas no germinadas fueron viables después del experimento.

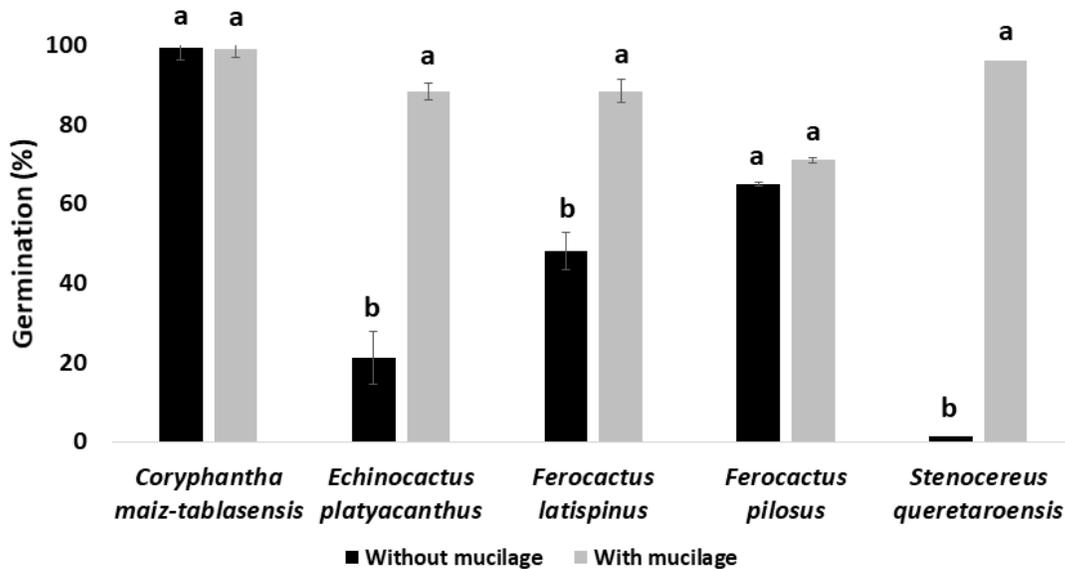


FIGURA 12. PORCENTAJE DE GERMINACIÓN (%) DE CINCO ESPECIES DE CACTÁCEAS, SIN MUCÍLAGO (COLUMNAS NEGRAS) Y CON MUCÍLAGO (COLUMNAS GRISES). PARA CADA ESPECIE, DIFERENTES LETRAS INDICAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ($P < 0.05$) ENTRE MEDIAS DE CADA ESPECIE.

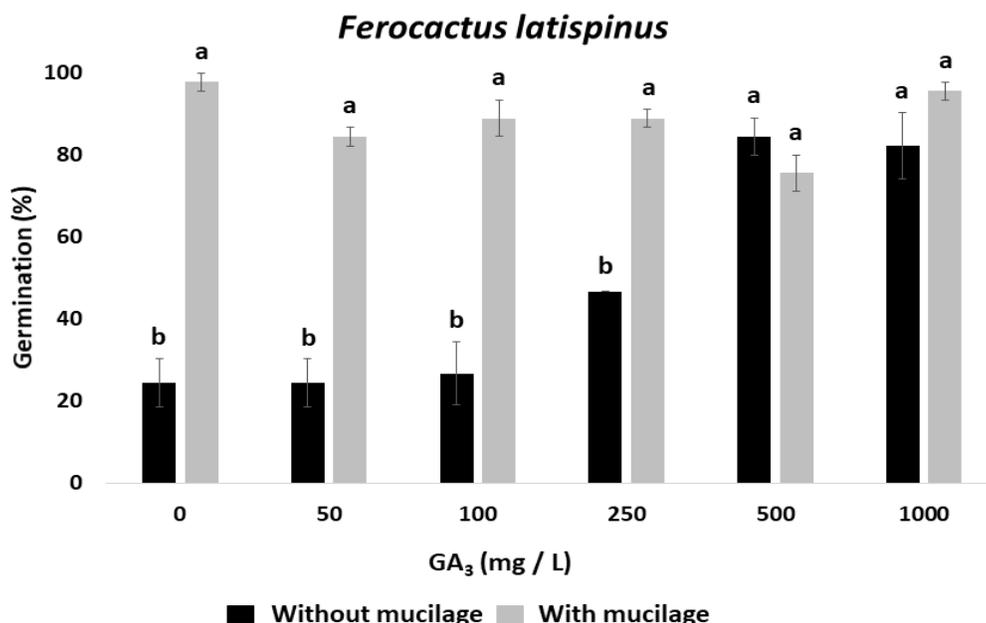


FIGURA 13. GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *F. latispinus* BAJO TRATAMIENTOS COMBINADOS DE MUCÍLAGO Y GA₃. LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P < 0.05) ENTRE MEDIAS

EFFECTO DE LAS FITOHORMONAS, LA REMOCIÓN DEL MUCÍLAGO Y LOS TRATAMIENTOS DE LUZ SOBRE EL TIEMPO MEDIO DE GERMINACIÓN (MGT)

En semillas de *C. maiz-tablasensis* el MGT difirió por la capa de mucílago y la concentración de GA₃, además, la interacción entre estos factores también mostró un efecto significativo (Tabla 1). La remoción del mucílago resultó en una germinación más rápida a mayores concentraciones de GA₃ (Fig. 11B), principalmente a 250 y 500 mg l⁻¹ de GA₃ que a otras concentraciones (Tabla 3).

Para *E. platyacanthus* y *F. latispinus* el MGT solamente fue afectado por la capa de mucílago (Tabla 1), en donde las semillas con mucílago germinaron más rápido que aquellas en las que esta capa fue removida (Fig. 14).

En *F. pilosus*, el MGT presentó diferencias significativas por la capa de mucílago y los tratamientos con GA₃, sin embargo, la interacción entre estos tratamientos no fue significativa (Tabla 1). Esta especie presentó menor tiempo de germinación a 1,000 mg l⁻¹ de GA₃ que el resto de los tratamientos (Tabla 3). Las

TABLA 3. TIEMPO MEDIO DE GERMINACIÓN (MGT) BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GA₃ EN LAS ESPECIES DE ESTUDIO. DIFERENTES LETRAS INDICAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS (P <0.05) ENTRE MEDIAS DENTRO DE CADA ESPECIE

	Concentraciones de GA ₃ (mg l ⁻¹)					
	0	50	100	250	500	1000
C. <i>maiz-tablasensis</i>	4.08 ± 0.24 ab	4.61 ± 0.47 a	4.61 ± 0.54 a	3.64 ± 0.67 b	3.68 ± 0.68 b	3.76 ± 0.58 ab
<i>E. platyacanthus</i>	13.46 ± 1.59 a	16.60 ± 2.58 a	17.04 ± 2.84 a	13.87 ± 2.33 a	15.09 ± 3.07 a	12.10 ± 1.93 a
<i>F. latispinus</i>	10.85 ± 1.62 a	10.60 ± 1.33 a	11.78 ± 2.13 a	11.64 ± 2.17 a	10.50 ± 1.72 a	10.02 ± 1.22 a
<i>F. pilosus</i>	17.33 ± 1.51 ab	18.24 ± 1.17 a	15.93 ± 1.07 ab	14.37 ± 0.93 b	13.71 ± 0.88 bc	11.90 ± 1.05 c
<i>S. queretaroensis</i>	6.67 ± 0.65 a	6.72 ± 0.24 a	6.14 ± 0.14 a	6.00 ± 0.60 a	5.71 ± 0.16 a	6.27 ± 0.60 a

semillas con mucílago germinaron más rápido que aquellas donde esta capa fue removida.

En *S. queretaroensis*, el MGT difirió por la capa de mucílago, pero no por la fitohormona GA₃ o la interacción entre estos factores (Tabla 1). Las semillas sin mucílago no presentaron germinación (Fig. 14).

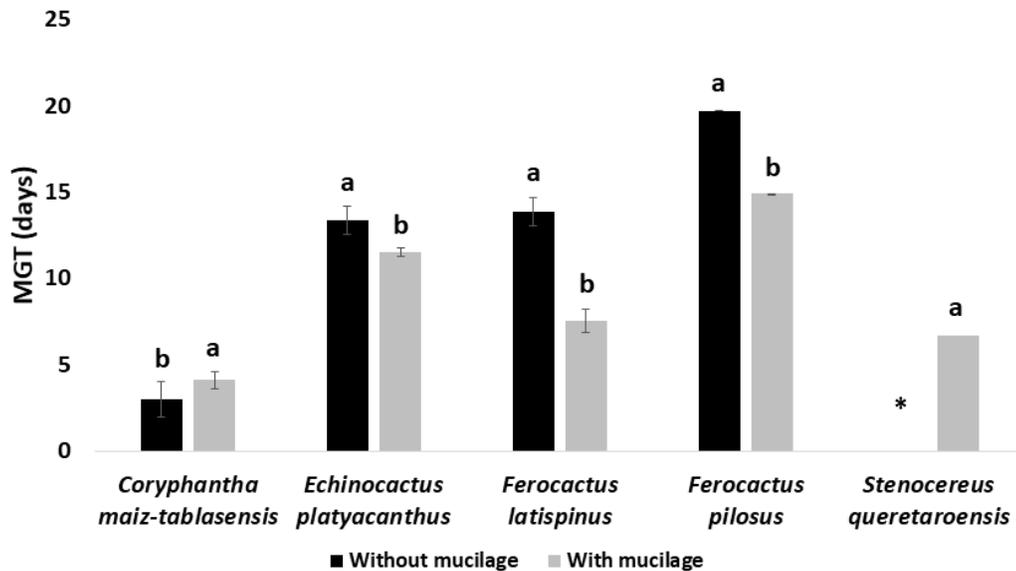


FIGURA 14. TIEMPO MEDIO DE GERMINACIÓN (MGT) DE CINCO CACTÁCEAS (*C. maiz-tablasensis*, *E. platyacanthus*, *F. latispinus*, *F. pilosus* y *S. queretaroensis*) SIN MUCÍLAGO (COLUMNA NEGRA) Y CON MUCÍLAGO (COLUMNA GRIS). PARA CADA ESPECIE, DIFERENTES LETRAS INDICAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS (P <0.05) ENTRE MEDIAS DENTRO DE CADA ESPECIE. EL ASTERISCO INDICA QUE NO HUBO GERMINACIÓN DE SEMILLAS.

DISCUSIÓN

Las semillas de todas las especies estudiadas están rodeadas por una capa secretora de mucílago, particularmente observamos que tienen la habilidad de retener agua (las semillas tuvieron mayor imbibición) en dos especies *F. latispinus* y *F. pilosus*. De este modo, los resultados apoyan parcialmente a Bregman & Graven (1997) quienes encontraron que la capa de mucílago en semillas de cactáceas puede funcionar para retener agua y, además, facilitar el paso del agua al interior de la semilla.

Debido a que también se encontró que el mucílago cubre la zona del micropilo y que las semillas sin esta capa adquirieron mayor coloración que las semillas que la conservaron, sugerimos que el mucílago en el micropilo puede funcionar como una barrera que regula el paso del agua hacia el interior de la semilla.

La primera hipótesis de que las semillas con mucílago tienen un mayor porcentaje de germinación y un tiempo medio de germinación más bajo que las semillas sin mucílago fue, en parte, corroborada. Las semillas con mucílago que germinaron en mayor porcentaje fueron *E. platyacanthus* y *S. queretaroensis*. Sin embargo, para estas especies el mucílago no mostró diferencias en la imbibición. Quizá el mucílago podría contener microorganismos involucrados en la promoción de la germinación, tal como lo reportaron Delgado *et al.* (2011, 2013) en semillas de *Opuntia*. El ataque de microorganismos reduce la resistencia mecánica de la testa en semillas de *Opuntia*, facilitando la emergencia del embrión (Delgado *et al.*, 2011; 2013). En otras plantas del desierto, el mucílago de las semillas y la comunidad microbiana del suelo interactúan exitosamente promoviendo el establecimiento de plántulas (Hu *et al.*, 2019).

Semillas intactas de *E. platyacanthus*, *F. latispinus* y *F. pilosus* germinaron más rápido que las semillas sin mucílago, mientras que las semillas de *S. queretaroensis* no mostraron germinación al remover la capa de mucílago. Estos resultados coinciden con Bregman & Graven (1997) quienes encontraron que semillas intactas de dos especies sudamericanas (*Echinopsis thionantha* y *Gymnocalycium gibbosum*) tomaron significativamente más agua y germinaron mejor que semillas donde la capa hidrofílica había sido removida artificialmente.

En contraste, el porcentaje de germinación de semillas en *C. maiz-tablasensis* no se afectó por la remoción de la capa de mucílago, excepto a 50 mg l⁻¹ de GA₃, en la cual se tuvo una germinación ligeramente menor en semillas con mucílago. Sin embargo, esta baja germinación se debió a la contaminación por hongos. De igual manera, se encontró un menor MGT en semillas sin mucílago que en semillas con mucílago. Quizá, las semillas de *C. maiz-tablasensis* no necesitan la cubierta de mucílago para retener agua ya que esta especie se distribuye en

áreas sujetas a inundación (Dicht & Luthy, 2005) y en esta zona tienen mayor acceso al agua que semillas de otras zonas áridas.

La segunda hipótesis de que las semillas de cactáceas tienen fotoblastismo positivo (forzosamente necesitan luz para germinar), pero fitohormonas como el GA₃ y el IAA promueven la germinación en la oscuridad, no fue apoyada por los resultados, con excepción de *S. queretaroensis*, en la que el GA₃ promovió la germinación de semillas en condiciones de oscuridad (por encima del 60%) a 1000 mg l⁻¹ de GA₃. Estos resultados coinciden con lo reportado por Brencher *et al.* (1978), quienes reportaron que el GA₃ promueve la germinación en condiciones de oscuridad en *Gymnocalycium oursellianum*, *Hamatocactus setispinus*, *Polaskia chende*, *Pachycereus hollianus*, *Rebutia minuscula* and *Rebutia marsoneri*, todas especies de cactáceas. Además, el efecto de las fitohormonas dependió del tipo de fitohormona y de la especie vegetal. Encontramos que GA₃ promueve la germinación en tres especies, pero el IAA no tuvo este efecto. Nuestros resultados del IAA coinciden a lo reportado por Amador-Alfárez *et al.* (2013), quienes evaluaron la germinación en *F. histrix* y *F. latispinus*, ante diferentes concentraciones de IAA.

F. latispinus fue la única especie en la cual las semillas sin mucílago incrementaron con altas concentraciones de GA₃ (500 and 1000 mg l⁻¹). Quizás las semillas esterilizadas perdieron microorganismos involucrados en la promoción de su germinación y las altas concentraciones de GA₃ permitieron la activación de enzimas hidrolíticas que favorecieron la degradación de la testa para aumentar de este modo la germinación.

Encontramos que GA₃ es un importante factor en condiciones de luz para dos especies. En *F. latispinus*, la germinación de semillas fue mayor en condiciones de luz a 500 y 1,000 mg l⁻¹ de GA₃, en comparación con otras concentraciones. En el caso de *F. pilosus* la germinación de semillas fue mayor en condiciones de luz a 1,000 mg l⁻¹ de GA₃ que en el resto de las concentraciones utilizadas. Nuestros resultados de GA₃ en condiciones de luz coinciden con otras cactáceas. Por ejemplo, *Carnegiea gigantea* y *Stenocereus thurberi* (McDonough, 1964), el trabajo de *Opuntia joconostle* (Sánchez-Venegas, 1997), *Gymnocalycium oursellianum* y *Polaskia chende* (Brencher *et al.*, 1978), *Myrtillocactus geotrizans*, *Mammillaria*

ritteriana, *Arequipa erectocylindrica*, *Eulychnia longispina* y *E. castanea* (Zimmer & Buttner, 1982) y en *Ferocactus acanthodes* y *F. wislizeni* (Deno, 1994).

CONCLUSIONES

Las semillas de las cinco especies estudiadas están rodeadas por una capa secretora de mucílago y el efecto del mucílago sobre la germinación depende de la especie. El mucílago produjo un mayor porcentaje de germinación en *E. platyacanthus*, *F. latispinus* y *S. queretaroensis*, así como un menor tiempo medio de germinación en *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *F. latispinus*. El efecto del GA₃ sobre la germinación de semillas de cactus también depende de la especie. Las semillas sin mucílago presentaron mayor coloración al interior que las semillas con mucílago, por esta razón se sugiere que el mucílago que rodea al micrópilo puede funcionar como una barrera que regula la entrada de agua al interior de la semilla. La relación entre el mucílago, la microbiota de semillas y la germinación de semillas en estas especies se probó en la siguiente etapa de esta investigación.

CAPÍTULO III

MICROORGANISMOS ASOCIADOS A SEMILLAS DE CACTÁCEAS Y SU PROBABLE FUNCIÓN EN LA GERMINACIÓN

INTRODUCCIÓN

Las semillas representan uno de los más cruciales estadios en el ciclo de vida de las plantas, ya que además de participar en la reproducción de las plantas, contribuyen en la dispersión, adaptación y persistencia en el ambiente (Nelson, 2017). Las semillas pueden beneficiarse de los microorganismos que tengan la capacidad de asociarse con ellas, ya que éstos pueden desempeñar un papel fundamental en su preservación, o bien, en la preparación del ambiente para la germinación, ya que sin éstos, es probable que la plántula tenga menos probabilidad de sobrevivir (Kumar & White, 2019; Truyens *et al.*, 2015).

Los microorganismos son capaces de colonizar prácticamente todos los tejidos de la planta huésped (con excepción de las células meristemáticas). Aquellos que colonizan los tejidos aéreos de las plantas tienen mayor probabilidad de ser colonizadores de semillas y, por lo tanto, de ser transmitidos verticalmente como endoseminales (Kumar & White, 2019).

Estos microorganismos incluyen hongos y bacterias principalmente (Mano *et al.*, 2006). Entre los microorganismos comúnmente asociados a semillas se han reportado especies de los géneros *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Staphylococcus*, *Pantoea* y *Paenibacillus*, las cuales han sido aisladas de diversas semillas como de arroz, tabaco, maíz, tomate, trigo y algunas cactáceas (Mano *et al.*, 2006; Nelson, 2017; Puente *et al.*, 2009b; Truyens *et al.*, 2015), mientras que en hongos comúnmente se encuentran las clases *Dothideomycetes*, *Sordariomycetes*, *Leotiomycetes*, *Eurotiomycetes* y *Pezizomycetes*, aislándose principalmente de pastos y plantas de la división *Magnoliophyta* (Kumar & White, 2019; Porrás-Alfaro & Bayman, 2011). Esto no debería de sorprendernos, ya que muchos de estos microorganismos no solo dominan las comunidades microbianas en la mayoría de los suelos, sino que también dominan las comunidades de endófitos y epífitos asociados a raíces y otros tejidos, además de las semillas (Barret *et al.*, 2015; Nelson, 2017).

De acuerdo con Nelson (2017) el microbioma de las semillas puede y debe distinguirse en; A) la microbiota endófito a la semilla (en adelante endoseminal), la

cual son aquellas especies microbianas que residen en los tejidos internos de las semillas y pueden ser transmitidas verticalmente a las plántulas de la progenie; y B) a microbiota sobre la semilla (en adelante episeminales), caracterizándose por las especies microbianas que colonizan las superficies de las semillas y pueden o no llegar a internarse dentro de los tejidos de la semilla y transmitirse tanto vertical como horizontalmente.

La comunidad microbiana en la semilla es compleja, ya que posee microorganismos reclutados no solo del suelo sino también de agentes de dispersión, polinizadores y del microbioma floral (Nelson, 2017). Truyens *et al.* (2015) proponen tres principales vías en que los microorganismos pueden colonizar las semillas; a) por medio del tejido vascular para la transmisión desde las partes vegetativas parentales hacia el endospermo de semillas, b) los microorganismos endófitos de la planta madre pueden transmitirse directamente al endospermo o al embrión a través de los gametos, y c) pueden transmitirse verticalmente, como en el caso de meristemas reproductivos que dan lugar a óvulos y semillas.

Las condiciones al interior de la semilla se modifican durante su periodo de maduración y esto puede determinar qué microorganismos serán capaces de habitar en ellas (Truyens *et al.*, 2015). Entre los factores determinantes para establecer qué microorganismos pueden colonizar el interior de las semillas se encuentran, principalmente, el estado de maduración en que está se encuentre y de las capacidades de cada microorganismo, ya que algunas características propias de los endoseminales de las semillas, como es la tolerancia a altas presiones osmóticas, o la solubilización de ácido fítico, única fuente de fosforo al interior de las semillas, características que no se encuentran en microorganismos aislados de otros tejidos vegetales como raíces o tallos (Mano *et al.*, 2006; Truyens *et al.*, 2015).

Entre las principales capacidades que deben tener los microorganismos para habitar el interior de las semillas es la movilidad y la formación de esporas, así lo asegura Okunishi *et al.* (2005) quienes estudiaron la diversidad de bacterias endófitas durante la maduración de semillas de arroz, encontrando que en los primeros estadios del desarrollo, los microorganismos más abundantes estuvieron relacionados a los géneros como *Bacillus*, *Sphingomonas*, y *Pantoea*, mientras que

en estadios medios de maduración se encontraron únicamente miembros del género *Bacillus*. Estos autores aseguran que casi todos los microorganismos evaluados tenían movilidad y capacidad para formar esporas, propiedades que les permiten migrar antes de que la semilla se endurezca o bien, tolerar las condiciones que se presentan cuando entra en periodo de latencia (Truyens *et al.*, 2015). Los microorganismos endófitos con la capacidad de colonizar semillas durante su formación, además de la movilidad, necesitan secretar enzimas que degraden la pared celular, ya que utilizan los espacios intercelulares ricos en nutrientes de la planta huésped para la migración, mientras que aquellos que colonizan la semilla en etapas posteriores deben soportar la alta presión osmótica que se presenta en las semillas durante el periodo de latencia y termina hasta el momento de la germinación (Mano *et al.*, 2006; Shahzad *et al.*, 2018; Tuyens *et al.*, 2015).

Los microorganismos adquiridos durante el periodo de formación de las semillas pueden ser determinantes en el ensamblaje del microbioma de la planta en desarrollo, ya que estos microorganismos proliferarán durante la germinación, colonizan plántulas y diversos órganos de las plantas maduras (Nelson, 2017). Por lo que la evaluación de las comunidades microbianas asociadas a semillas es muy importante, tanto en aspectos ecológicos como funcionales, pues al conocer este microbioma inicial se puede comprender su relación con el desarrollo temprano de la planta, su salud, su productividad y su impacto con el entorno asociado (Vujanovic & Germida, 2017).

Algunos endoseminales asociados a los géneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas* participan en la movilización de nutrientes del suelo que difícilmente pueden ser asimilados por las plantas como es el caso de fósforo (Puente *et al.*, 2009). También se ha reportado que participan en la producción de fitohormonas, principalmente giberelinas, las cuales promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas (Khan *et al.*, 2013). Finalmente se reporta la protección de las plantas contra el estrés biótico (otros hongos patógenos e insectos) y abiótico (tolerancia a la salinidad del suelo o estrés hídrico) (Kumar & White, 2019). Además, pueden tener la capacidad de promover la germinación mediante diversas estrategias utilizadas por microorganismos asociados a raíces o

tallos. Una de estas estrategias es la producción de etileno, la cual se ha observado en bacterias del género *Pseudomonas*, las cuales son capaces de promover la germinación de semillas de *Striga* spp. (Berner *et al.*, 1999). En cactáceas, un ejemplo de la importancia de los microorganismos asociados a semillas es presentado por Puente *et al.* (2009), quienes evaluaron la germinación de semillas de Cardón gigante (*Pachycereus pringlei*) inoculadas con cepas endófitas de *Bacillus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, y *Pseudomonas*, todas aisladas previamente de esta planta. También evaluaron el establecimiento de plántulas con y sin estos microorganismos. Los resultados de esta investigación señalan que el desarrollo de las plántulas en esta cactácea se incrementó cuando las semillas fueron inoculadas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Otro componente esencial de la microbiota son los hongos, los cuales presentan una amplia variación en su modo de transmisión de un hospedero a otro, y una estricta transmisión vertical de una generación a otra (Khan *et al.*, 2013), además, han sido relativamente poco estudiados (Links *et al.*, 2014). Se ha reportado una gran variedad de hongos endófitos, tanto de semillas como de otros tejidos, y recientes estudios han señalado que la composición de hongos presentes en las semillas puede estar influenciada ampliamente por las condiciones locales y no por el hospedero (Klaedtke *et al.*, 2016). Sin embargo, se ha observado que algunos hongos endoseminales foliares pueden transferirse a la superficie de la hoja y viceversa, planteando la idea que los microorganismos con esta capacidad han sido seleccionados por el ambiente del huésped mediante interacciones mutualistas, inhibiendo el crecimiento de patógenos que puedan infectar al hospedero (Links *et al.*, 2014).

Barret *et al.* (2015) demostraron que semillas de plantas de la familia de *Brassicaceae* estaban dominadas por el phylum Ascomycota, particularmente por las clases; *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Leotiomycetes*, *Sordariomycetes* y *Tremellomycetes*, esta última perteneciente al phylum Basidiomycota. Además de estar presentes al interior de las semillas, muchos de estos géneros se asocian comúnmente con suelos, donde se transmiten de forma horizontal hacia las plantas.

En el caso de cactáceas, Delgado-Sánchez *et al.* (2010a, 2010b) señalan que semillas de *Opuntia* spp. están asociadas con hongos de los géneros *Penicillium* sp., *Phoma* sp. y *Trichoderma* sp. que les ayudan a germinar. Algunos de estos microorganismos son considerados patógenos, por lo que reconocer el papel potencial que juegan las semillas en la propagación de patógenos es primordial para comprender la dispersión de enfermedades de las plantas (Elmer, 2001).

Debido a que la microbiota asociada a semillas es fundamental para el desarrollo de las plantas en sus primeros estadios de vida, particularmente en cactáceas, donde las condiciones ambientales para su desarrollo son consideradas extremas, la asociación que guardan las semillas con los microorganismos puede ayudar a entender las estrategias que este grupo de plantas han desarrollado a lo largo de la vida para establecerse en ambientes áridos.

OBJETIVOS:

1) Describir y comparar la diversidad de la comunidad microbiana (bacterias y hongos) episeminales y endoseminales asociados a semillas de cuatro especies de cactáceas

2) Determinar las capacidades promotoras de crecimiento vegetal que poseen los microorganismos cultivables, tanto endoseminales como episeminales de cactáceas

3) Determinar la influencia de microorganismos episeminales de la semilla en la germinación de cactáceas y en la protección ante la infección por patógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CULTIVABLES

En este capítulo se emplearon semillas de cuatro especies de cactáceas: *E. platyacanthus*, *F. pilosus*, *F. latispinus* y *S. queretaroensis*.

Con el fin de analizar las poblaciones microbianas que son transmitidas verticalmente en las plantas, las semillas de todas las especies fueron extraídas directamente del fruto dentro de una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Para el aislamiento de microorganismos, tanto endofíticos como epifitos, se utilizaron dos gramos de semillas por cada especie, a las cuales se añadieron 5 ml de buffer de fosfatos con 0.05 % (vol/vol) de Tween 20 y se mantuvieron en agitación constante a 60 rpm durante 2.5 horas (Barret *et al.*, 2015). Posteriormente, se tomó una alícuota (20 μ L) de esta suspensión para inocular diferentes medios de cultivo selectivos (TSA, Rennie, PDA, AlPO_4 , FePO_4 , CaHPO_4), y tener así mejor representados a los microorganismos cultivables presentes en el exterior de las semillas. Posteriormente se removieron las semillas de esta solución, una vez realizada esta acción, se centrifugó a $6,000 \times g$ durante 15 minutos, se deshecho el sobrenadante y el pellet fue almacenado a -80°C para la posterior caracterización de los microorganismos episeminales mediante métodos independientes de cultivo.

Con el fin de remover a los microorganismos presentes en la parte superficial de la testa (epifitos), las semillas se sometieron a un tratamiento de lavado (Cap. II, Efecto de la remoción del mucílago, pp. 35-36). Posteriormente, para asegurarnos que el proceso de lavado fue exitoso y que no hubiera la presencia de microorganismos epifitos, las semillas se colocaron en cajas Petri con medio sólido TSA y se incubaron toda la noche. Una vez corroborado que no hubo crecimiento de microorganismos episeminales en este medio, se procedió al cultivo y aislamiento de los microorganismos endoseminales, para ello, se maceraron los dos gramos de semillas, previamente utilizadas, con 5 ml de una solución de buffer de fosfatos, posteriormente se tomó una alícuota de esta solución (50 μ L) que sirvió para inocular los diferentes medios de cultivo seleccionados anteriormente. El resto de la suspensión fue centrifugada a $6,000 \times g$ durante 15 minutos, y el pellet fue

almacenado a una temperatura de -80°C para la caracterización de los microorganismos endoseminales por métodos independientes de cultivo.

Los medios de cultivo inoculados se incubaron a una temperatura de 28°C por un periodo de 4 a 5 días, hasta observar el crecimiento de colonias.

Para la caracterización de las bacterias cultivables, todas las cepas aisladas se cultivaron en medio TSA. Se clasificaron acorde a la morfología colonial que presentaron en este medio, tomando en cuenta el medio en que fueron aisladas inicialmente y la especie vegetal de procedencia. Para determinar las capacidades promotoras del crecimiento vegetal de las bacterias aisladas, se seleccionaron únicamente las cepas que fueran diferentes dentro de la clasificación, a las que se les realizaron las siguientes pruebas (la metodología de todas las pruebas se describe en el ANEXO I):

- A) Producción de ácido indol-3-acético (AIA)
- B) Acidificación del medio
- C) Producción de sideróforos
- D) Actividad quitinolítica
- E) Actividad reductora de acetileno (ARA)

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CULTIVABLES

La identificación de las bacterias cultivables se realizó mediante la amplificación y posterior secuenciación del gen 16S rRNA. En el caso de los hongos se realizó por medio de la región ITS (Internal Transcribed Spacer). Tanto para bacterias como para hongos la extracción de DNA se realizó con el kit comercial DNeasy® UltraClean® Microbial Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido fue cuantificado en un Nanodrop™ (ND-1000 Thermo Scientific) para asegurarnos que tuviera la calidad necesaria para la amplificación.

La amplificación del gen 16S rRNA se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando los primers universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3) (Lane, 1991), los cuales amplifican un

fragmento de aproximadamente 1,400 pb. El protocolo utilizado en el termociclador (DNA Bio-Rad C 1000™) para llevar a cabo esta reacción fue el siguiente: temperatura inicial de desnaturalización 94 °C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 54 °C por 2 minutos, 72 °C por 3 minutos, y una extensión final de 72 °C por 10 minutos.

La amplificación de la región ITS se realizó con los primers ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'), los cuales amplifican un fragmento de DNA de 300 pb aproximadamente (White *et al.*, 1990). Las condiciones de amplificación fueron: temperatura de desnaturalización inicial de 98°C por 3 min, seguido por 33 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 57 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos y una extensión final de 72 °C por 10 minutos. El volumen y la concentración de los reactivos utilizados en estas reacciones se presentan en la Tabla 4.

TABLA 4. CONCENTRACIÓN Y VOLUMEN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES 16S rRNA Y LA REGIÓN ITS2 EN CADA PCR PARA MICROORGANISMOS CULTIVABLES

Reactivo	Bacterias- 16S rRNA		Hongos-ITS	
	Concentración Final	25 µL rxn	Concentración Final	25 µL rxn
10 X Buffer -Mg	1X	2.5	1X	2.5
50 mM MgCl₂	1.5 mM	0.75	1 mM	0.5
10 mM primer Forward	0.1 mM	0.25	0.1 mM	0.25
10 mM primer Reverse	0.1 mM	0.25	0.1 mM	0.25
10 mM dNTP's	0.1 mM	0.25	0.1 mM	0.25
5 U/ µL Taq	0.025 U/ rxn	0.125	0.02 U/µ	0.1
DNA	>50ng/uL	1.5	>20ng/uL	2
100 % DMSO	----	-----	3%	0.75
BSA (10 mg/mL)	----	-----	5 %	1.25
Agua	----	19.375	----	17.15

Para asegurarnos que efectivamente estábamos amplificando la región de interés, con el producto de ambas PCR's realizamos una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Si la electroforesis nos mostraba la banda en el gel del tamaño esperado, 1,400 pb para bacterias y de 300 pb para hongos, se procedía a la

purificación del producto de PCR mediante un kit comercial (Wizard® Gel and PCR Clean-Up System Protocol) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalmente, se determinó la concentración del producto de PCR purificado con un Nanodrop (ND-1000 Thermo Scientific), ajustando a una concentración mínima de 25 ng/μL en un volumen final de 20 μL. Las muestras se enviaron al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del IPICYT para ser secuenciadas por el método de dideoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Las secuencias fueron analizadas con ayuda del software BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) y MEGAX (Kumar et al., 2018). Se realizó la remoción de los primers y se seleccionaron las regiones de la secuencia con alta calidad. Posteriormente las secuencias se compararon individualmente con la base de datos del GenBank por medio de BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Después, realizamos un alineamiento por medio del software ClustalX (Larkin et al., 2007) con nuestras secuencias y secuencias de referencia (identidad > 97%). Finalmente, con las secuencias alineadas se calculó la matriz de distancia y realizamos la construcción de un árbol de Neighbor-joining en el programa MEGA7, utilizando el método de *Bootstrap* (con mil iteraciones).

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS NO CULTIVABLES MEDIANTE LA SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S rRNA

La identificación de las bacterias no cultivables se realizó a partir de las muestras obtenidas para este propósito, descritas en la sección anterior. En ambos casos, tanto para endoseminales como epifitos, se realizó la extracción del DNA con el kit “ZR soil Microbe DNA MiniPrep™ Kit” siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la amplificación del gen 16S rRNA mediante una PCR anidada, siguiendo el protocolo de Haroim y colaboradores (2011), esto con el propósito de suprimir la amplificación de DNA mitocondrial y del cloroplasto proveniente del tejido vegetal. Los primers que se utilizaron en la primera reacción fueron 799F (GCAAACAGGATTAGATACCCTGGT) y 1492R (GGATACCTTGTTACGACTT) (Hanshew et al., 2013), con el siguiente protocolo:

temperatura de desnaturalización inicial de 95 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 95 °C 30 s, 57 °C 40 s 72 °C 40 s y una extensión final de 72 °C durante 7 minutos. El producto de esta reacción se corrió en un gel de agarosa al 1% para separar los amplicones presentes, los cuales provenían del tejido vegetal (1090 pb) y de bacterias (740 pb) (Sun et al., 2008). La banda del tamaño deseado (aprox. 740 pb) se cortó y se purificó con el kit “The Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto purificado sirvió de molde para la segunda reacción. Las concentraciones y volumen de los reactivos utilizados tanto en la primera como en la segunda PCR se muestran en la Tabla 5.

Los primers utilizados en esta segunda reacción fueron Illumina968F (GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAACGCGAAGAACCTTAC) e Illumina1378R (TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGGTGTGTACAAGGCCCG GGAACG), ya que contaban con los adaptadores necesarios para la secuenciación en la plataforma de Illumina. Las condiciones del termociclador se establecieron siguiendo el protocolo de Brons & van Elsas (2008), las cuales consistieron en una temperatura inicial de desnaturalización de 95 °C durante 5 minutos, seguida de 10 ciclos (touchdown) a 95 °C por 1 minuto, temperatura de alineamiento de 60 °C 1 minuto y 2 minutos a 72 °C, con una disminución en la temperatura de alineamiento de 0.5 °C por ciclo, seguidos de 25 ciclos que consistieron en 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 55 °C, 72 °C durante 2 minutos y una extensión final de 72 °C durante 15 minutos.

El producto de esta reacción se purificó mediante el kit anteriormente mencionado. Se cuantificó la concentración de DNA final con un Nanodrop™ (ND-1000 Thermo Scientific), y se envió una concentración final de 50 ng/μL para la secuenciación por el método de Illumina Miseq Pair-end 300 ciclos en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO).

TABLA 5. CONCENTRACIÓN Y VOLUMEN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS DURANTE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S RRNA MEDIANTE LA REACCIÓN DE PCR PARA BACTERIAS NO CULTIVABLES

	1er Reacción de PCR (50 μ L)		2da Reacción de PCR (25 μ L)	
10 X Buffer -Mg	1X	5 μ L	1X	2.5
50 mM MgSO₄	1.5 mM	1.5	1.5 mM	0.75
10 mM primer <i>Forward</i>	0.1 μ M	0.5	0.1 mM	0.25
10 mM primer <i>Reverse</i>	0.1 μ M	0.5	0.1 mM	0.25
10 mM dNTP's	0.1 mM	0.5	0.1 mM	0.25
DMSO	2%	1	2%	0.5
Platinum DNA polymerasa	0.5 U/ rxn	0.1	1.0 U/ rxn	0.2
DNA	25 ng/ μ L	1.5	40 ng/ μ L	2
Agua	----	39.4	----	18.3

IDENTIFICACIÓN DE HONGOS NO CULTIVABLES A PARTIR DE LA REGIÓN ITS

La identificación de los hongos se realizó a partir de las mismas extracciones de DNA descritas en la sección anterior. La secuenciación se realizó en el LANGEBIO, para ello, se envió el DNA con una concentración mínima de 25 ng/ μ L en un volumen de 50 μ L. Los primers utilizados fueron ITS1 F (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 R (TCCTCCGCTTATTGATATGC) diseñados conforme a la plataforma Illumina (Gardes & Bruns, 1993).

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS NO CULTIVABLES; CONTROL POSITIVO

Para la identificación de bacterias y de hongos se utilizaron controles positivos, el cual consistió en una comunidad de referencia mock (ZymoBIOMICS™ Microbial Community Standard II (Log Distribution) Catalog No. D6310), compuesta por el DNA genómico de ocho bacterias (tres Gram negativo y 5 cinco Gram positivo) y dos levaduras. La comunidad mock fue sometida al mismo tratamiento que las muestras problema.

El control positivo se utilizó para identificar el rango de detección de la metodología empleada, ya que las concentraciones de la comunidad mock son diferentes entre cada microorganismo.

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS NO CULTIVABLES; CONTROL NEGATIVO

El control negativo se trató de agua milli-Q la cual fue sometida al mismo tratamiento en bacterias (extracción de DNA y PCR anidada), mientras que, en hongos, solamente se realizó la extracción de DNA de una muestra de agua mili-Q. la importancia de utilizar este control fue para identificar contaminación por parte de reactivos o del manejo humano en esta técnica.

ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Todo el procesamiento de las secuencias, tanto de bacterias como de hongos, se realizó con el programa Mothur V. 1.35.1 (Schloss *et al.*, 2009). Las lecturas obtenidas fueron filtradas acorde a su calidad (Valor de Q ≥ 25 , número de homopolímeros >8 , sin ambigüedades, etc.) y se hizo la eliminación de quimeras.

Las secuencias correspondientes a Bacteria, una vez filtradas se alinearon con la base de datos del gen 16S rRNA de SILVA versión 132, liberada en diciembre de 2017 (<https://www.arb-silva.de/>). Se calculó una matriz de distancia a través del conjunto de secuencias no redundantes y las lecturas se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTUs) con un umbral de similitud del 97%. Estos OTUs fueron categorizados taxonómicamente usando el clasificador Bayesiano de Mothur. Para el caso de hongos se realizó un alineamiento pareado para generar la matriz de distancia y las secuencias se clasificaron de acuerdo con la base de datos UNITE 8.0 (<https://unite.ut.ee/>) (Nilsson *et al.*, 2018).

Con el fin de eliminar los sesgos ocasionados por la posible contaminación de las muestras durante su procesamiento, tanto en las librerías de bacterias como en las de hongos, se realizó una corrección en la abundancia de OTUs obtenidos con base en la abundancia de los OTUs presentes en los respectivos controles

negativos. Esta corrección consistió en remover de todas las librerías aquellos OTUs que se encontraron en alta abundancia en el control negativo. Por su parte, el control positivo sirvió para determinar la sensibilidad de detección del procedimiento utilizado.

Posteriormente, a partir de las abundancias relativas de los géneros obtenidos, tanto de bacterias como de hongos (ambos análisis por separado), se realizaron heatmaps con el programa RStudio v1.2.1335 y el paquete gplots (Warnes et al., 2016).

Los datos obtenidos de las descripciones taxonómicas fueron utilizados para realizar el análisis de diversidad con el software EcoSim Profesional v1.2d (Gotelli & Entsminger, 2000). Entre los parámetros analizados se encuentran curvas de la riqueza acumulada de especies, el índice de diversidad de Shannon y la dominancia, así como el estimador de Chao 1. Todos los análisis de diversidad se realizaron de acuerdo con la abundancia presente en cada muestra, al nivel taxonómico de género.

MICROORGANISMOS Y SU EFECTO SOBRE LA GERMINACIÓN

Finalmente, con el propósito de corroborar si la microbiota presente en la testa de la semilla (episeminal) tiene un efecto sobre la germinación y protección ante patógenos, se realizó un experimento usando semillas de *E. platyacanthus*, ya que esta fue la especie que presentó mayor afectación en los porcentajes de germinación al lavar sus semillas durante los experimentos de la primera parte de esta tesis.

Como unidad experimental se utilizó una caja Petri en la que se colocaron 15 semillas que habían sido sometidas al lavado. Cada tratamiento consto de cinco replicas. Los tratamientos consistieron en inocular las 15 semillas con 1.5ml de cultivo de microorganismos aislados de *E. platyacanthus* ajustados a una DO de 0.4 ABS, para ello se utilizaron tres cepas de bacterias (*Bacillus*, *Burkholderia* y *Enterobacter*) y un hongo (*Aspergillus*), la mezcla se dejó durante 15 min en agitación leve. Además, con la finalidad de inocular la comunidad epifita completa

que se hubiera desprendido de las semillas y no solo los aislados, se utilizó un tratamiento adicional en el cual, se pusieron 2 gramos de semillas (extraídas directamente del fruto) en agitación con 4 mL buffer de fosfatos durante 2.5 horas, se removieron las semillas y se centrifugó a $6,000 \times g$ durante 5 minutos, el sobrenadante fue desechado. El pellet fue re-suspendido en 1.5 mL de buffer de fosfatos y se agregaron semillas que previamente fueron lavadas y se mezclaron por 15 min en agitación leve. Finalmente, como tratamientos control se utilizaron semillas extraídas directamente del fruto sin lavar (control positivo), y uno de semillas sometidas al tratamiento de lavado, sin re-inoculación (control negativo).

RESULTADOS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CULTIVABLES MEDIANTE LA SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S RRNA

Se aislaron un total de 102 colonias bacterianas provenientes de las cuatro especies de cactáceas en los seis medios de cultivo empleados, de las cuales se seleccionaron 60 cepas basándonos en la morfología colonial adquirida al hacerlas crecer en un medio de cultivo rico (TSA). De las 60 cepas aisladas 16 provenían de semillas de *E. platyacanthus* (8 endoseminales y 8 episeminales), 13 de *F. latispinus* (5 endoseminales y 8 episeminales), 14 de *F. pilosus* (6 endoseminales y 8 episeminales) y 17 de *S. queretaroensis* (9 endoseminales y 8 episeminales).

En la Fig. 15 se presenta la reconstrucción del árbol de neighbor joining a partir de las secuencias obtenidas para bacterias, con un fragmento de aproximadamente 800 pb. Se indican los géneros bacterianos aislados y sus respectivas asociaciones con cactáceas. Se observa la presencia de bacterias asociadas a todas las especies de cactáceas utilizadas en este estudio como es el caso del género *Burkholderia*, *Enterobacter* y *Stenotrophomonas*. También se puede observar que algunos géneros bacterianos se encuentran asociados exclusivamente a una sola planta, como es el caso de *Achromobacter*, que se encontró asociado a *F. pilosus*, llamando la atención que estas bacterias se presentaron exclusivamente en la superficie de la testa.

En el anexo II se presenta un diagrama de neighbor joining desglosado, en donde se muestran las actividades promotoras de crecimiento vegetal asociadas a cada cepa bacteriana, así como la especie vegetal de donde fueron aisladas cada cepa.

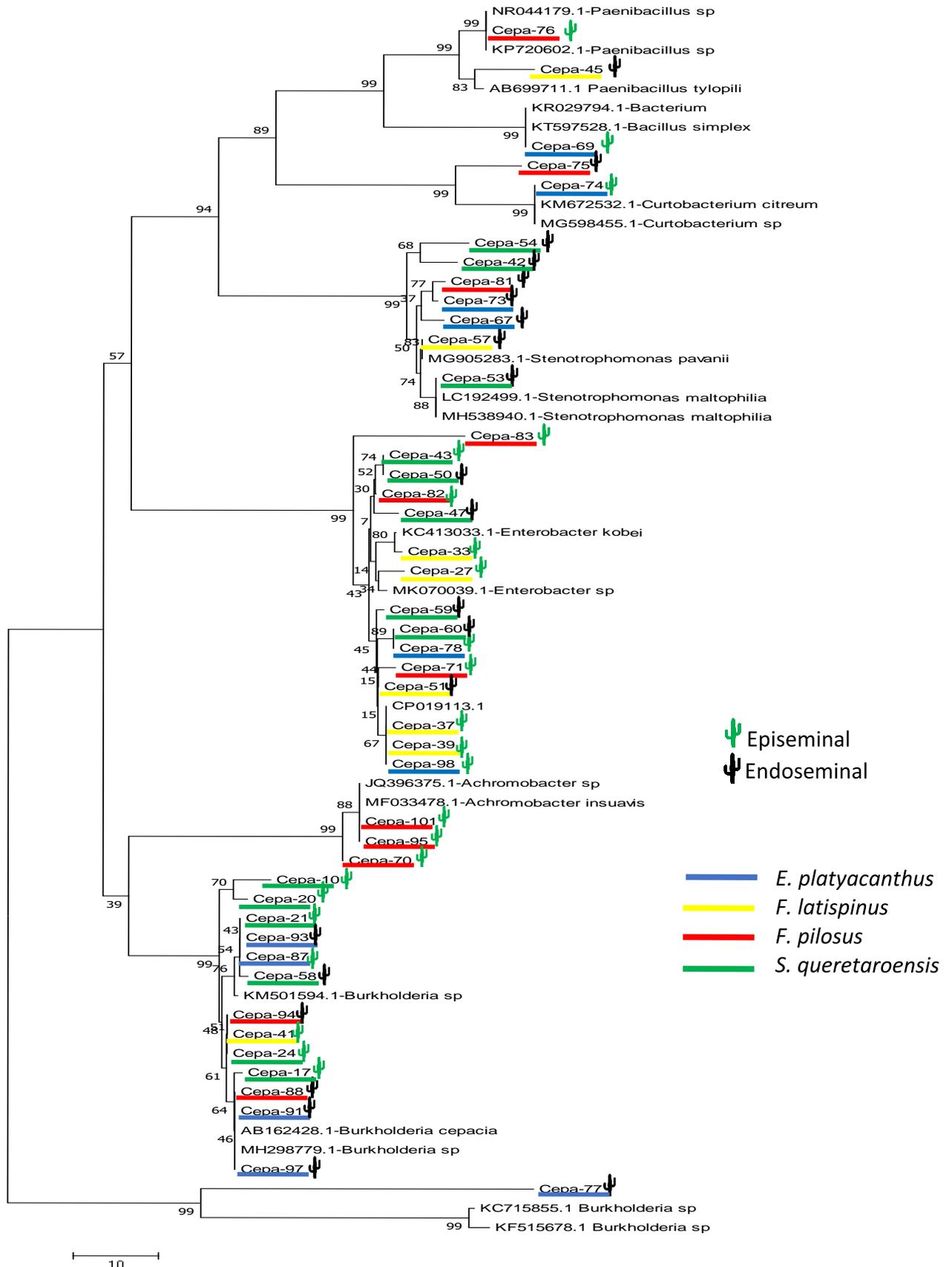


FIGURA 15. ÁRBOL DE NEIGHBOR JOINING DONDE SE MUESTRA LA AFILIACIÓN TAXONÓMICA DE LAS CEPAS AISLADAS DE ACUERDO CON LA SECUENCIA DE REFERENCIA QUE TUVO MAYOR PORCENTAJE DE SIMILITUD EN LA BASE DE DATOS DEL GENE BANK. LAS LÍNEAS DE COLORES MUESTRAN LA ESPECIE DE CACTÁCEA DE LA QUE FUERON AISLADAS. LOS SÍMBOLOS INDICAN LA UBICACIÓN EN LA SEMILLA DE PROCEDENCIA, ENDOSEMINALES (CACTUS NEGRO) O EPISEMINALES (CACTUS VERDE). LOS VALORES DE BOOTSTRAP SE INDICAN EN LA PARTE INFERIOR DE LAS RAMAS. EN EL ANEXO II SE PRESENTA UN ÁRBOL DE NEIGHBOR JOINING EN EXTENSO CON LAS PROPIEDADES PROMOTORAS DE CRECIMIENTO ASOCIADAS A CADA CEPA.

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CULTIVABLES

En las 60 cepas seleccionadas se evaluó su capacidad para acidificar el medio donde crecen, producir sideróforos, auxinas, particularmente ácido indol-3-acético (IAA), fijar nitrógeno y la capacidad para degradar quitina. En la Fig. 16 se presentan las cuatro especies de cactáceas, los géneros bacterianos asociados a estas y las características promotoras de crecimiento vegetal que poseen los microorganismos aislados de endoseminales (A) y episeminales (B). Se observa que en las semillas de las cuatro especies de cactáceas estudiadas se encuentran microorganismos, tanto endoseminales como episeminales, que podrían beneficiar las primeras etapas del ciclo de vida de la planta, así como promover su crecimiento en etapas posteriores (Fig. 16).

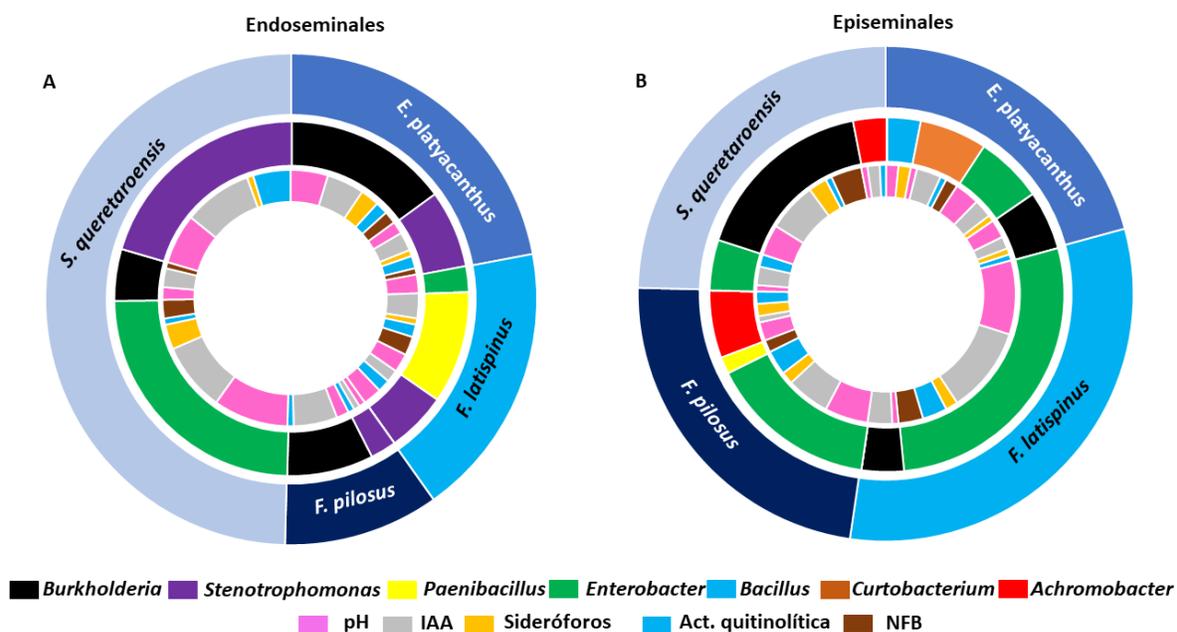


FIGURA 16 DIAGRAMA DONDE SE MUESTRAN LOS GÉNEROS DE BACTERIAS ENDOSEMINALES (A) Y EPISEMINALES (B) AISLADOS DE CADA ESPECIE DE CACTÁCEA, ASÍ COMO LAS ACTIVIDADES PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL EVALUADAS. SE PRESENTAN LAS ESPECIES DE CACTÁCEAS (CÍRCULO EXTERIOR), LOS MICROORGANISMOS QUE TIENEN ASOCIADOS (CÍRCULO INTERMEDIO) Y LAS CAPACIDADES PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EVALUADAS (CÍRCULO INTERIOR).

Las semillas de *E. platyacanthus* estuvieron asociadas a una cepa episeminal del género *Curtobacterium*, la cual produjo la mayor concentración de AIA en el

ensayo *in vitro* (11.16 mg l⁻¹). Por su parte, en las semillas de *F. latispinus* se aislaron cepas episeminales, las cuales fueron las que mostraron mayor actividad quitinolítica (2.7 en relación halo/colonia) y fijadora de nitrógeno (0.27 nmol/día/ml) de nuestro estudio, todas estas cepas asociadas al género *Enterobacter*. Las cepas episeminales asociadas a *F. pilosus*, *Enterobacter* y *Achromobacter* en promedio presentaron una producción de sideróforos de 1.4 (con relación halo/colonia), sin embargo, las cepas endoseminales, asociadas a esta cactácea no produjeron sideróforos. Finalmente, las semillas de *S. queretaroensis* estuvieron asociadas a cepas del género *Burkholderia*, las cuales presentaron mayor producción de sideróforos (4.7 en relación halo/colonia) y fijación de nitrógeno (0.214 nmol/día/ml) de este estudio. Todas las cepas aisladas presentaron miembros con la capacidad de acidificar el medio.

En el ANEXO III se presenta una tabla con todas las propiedades promotoras de crecimiento vegetal evaluadas, además, el porcentaje de identidad con base en la secuencia de referencia con la que se tuvo mayor similitud en la base de datos del GeneBank del NCBI.

IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CULTIVABLES MEDIANTE LA SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN ITS

Los hongos cultivables fueron aislados principalmente del interior de las semillas de dos especies de cactáceas, *E. platyacanthus* y *S. queretaroensis*., al exterior solo se aisló una cepa procedente de *E. platyacanthus*. La identificación reveló que los tres aislados corresponden al género *Aspergillus* (Fig. 17). En la Figura 17 se muestra el árbol de neighbor joining, generado a partir de las secuencias de los hongos aislados y las secuencias de referencia que tuvieron el mayor porcentaje de similitud en el genebank, para identificar la cercanía filogenética entre grupos. El tamaño del fragmento utilizado para realizar este árbol fue de aproximadamente 220 pb.

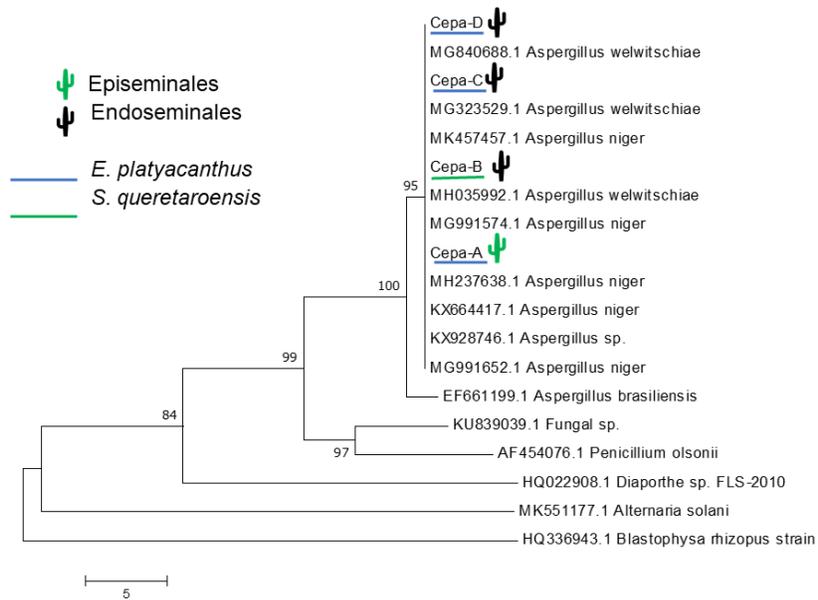


FIGURA 17. ÁRBOL DE NEIGHBOR JOINING DE UNA REGIÓN PARCIAL ITS DONDE SE MUESTRA LA AFILIACIÓN TAXONÓMICA DE LOS HONGOS AISLADOS DE ACUERDO CON LAS SECUENCIAS DE REFERENCIA QUE TUVO MAYOR PORCENTAJE DE SIMILITUD. LAS LÍNEAS DE COLORES MUESTRAN LA ESPECIE DE CACTÁCEAS DE LA QUE FUERON AISLADOS. LOS SÍMBOLOS INDICAN LA UBICACIÓN EN LA SEMILLA DE PROCEDENCIA, ENDOSEMINALES (CACTUS NEGRO) O EPISEMINALES (CACTUS VERDE). LOS VALORES DE BOOTSTRAP SE INDICAN EN LA PARTE INFERIOR DE LAS RAMAS.

DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A SEMILLAS DE CACTÁCEAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN POR ILLUMINA

Identificación de bacterias mediante secuenciación del gen 16s rna

Se analizaron un total de 105,714 secuencias de todas las librerías (34,058 de endoseminales y 71,656 de episeminales), de las cuales una vez filtradas por calidad se tuvo un promedio de 5,200 secuencias en cada librería, destaca la presencia de los epífitos en *F. latispinus* y *S. queretaroensis*, donde se presentó el mayor (17,785) y menor (851) número de secuencias respectivamente (Tabla 6).

Previo al análisis de nuestras muestras, observamos la presencia de diversos géneros en el control negativo, los cuales fueron: *Nesterenkonia* (20%), *Aeribacillus* (8%), *Caldalkalibacillus* (11%), *Halomonas* (40%), entre otros. Estos géneros se removieron de las librerías de cada cactácea, ya que podrían afectar resultados al

sospechar la existencia de algún tipo de contaminación, asegurando de este modo que las librerías no estaban contaminadas (ANEXO IV).

En el caso del control positivo (comunidad mock), se utilizó para determinar la eficiencia de recuperación de cepas en baja abundancia, acorde al patrón esperado se observa una gran abundancia del género *Listeria* (84.7%) la cual, de acuerdo con la ficha técnica del producto, era el microorganismo con mayor concentración de DNA (89.1 %). También se encontraron miembros del género *Bacillus*, cuya concentración de DNA fue de 2.5 % (ANEXO IV), el cual presentaba una composición del 0.89 % de la comunidad mock. Las bacterias presentes en la comunidad mock con una abundancia por debajo de 0.08 % no fueron recuperados.

TABLA 6. COMPARACIÓN DE LA DIVERSIDAD ENTRE LOS GÉNEROS BACTERIANOS ENDOSEMINALES Y EPISEMINALES ASOCIADOS A SEMILLAS DE CACTÁCEAS.

	Endoseminales						Episeminales					
	# secuencias	# géneros	H	D	Chao	% cobertura	# secuencias	# géneros	H	D	Chao	% cobertura
<i>E. platyacanthus</i>	4087	15	0.17	0.95	20	75	3845	11	0.1	0.97	12	94
<i>F. latispinus</i>	4467	18	0.21	0.93	39	46	17785	19	0.12	0.96	24	79
<i>F. pilosus</i>	3104	15	0.13	0.96	19	80	4705	10	0.03	0.99	11	89
<i>S. queretaroensis</i>	3015	18	0.76	0.6	32	56	851	21	1.6	0.28	33	64

secuencias corresponde a la abundancia de los OTUs
H= índice de Shannon (diversidad), D= Dominancia

En la Figura 18 se presentan los resultados de la riqueza de géneros bacterianos cultivables de endoseminales y episeminales asociados a cactáceas. Se observa que en tres de las cuatro especies se encontró mayor riqueza en endoseminales que en episeminales, mostrando diferencias significativas en todos los casos. Todas las gráficas fueron realizadas con los datos obtenidos del programa EcoSim calculados a partir de las abundancias absolutas de los grupos taxonómicos en cada librería.

En el caso de *E. platyacanthus* se observa que la diferencia entre endoseminales y episeminales se alcanza a los 3,300 OTUs analizados, donde el interior de la semilla posee una riqueza de 15 géneros bacterianos, mientras que

los epífitos alcanzan solamente 11. Para calcular la eficiencia de muestreo bastó con dividir el número de géneros observados entre el número de géneros estimados por Chao 1, por lo que la eficiencia de muestreo para las bacterias endoseminales fue del 75 % mientras que en las episeminales fue del 94 % (Tabla 6).

En *F. latispinus* la diferencia entre endoseminales y episeminales se alcanzó a las 4,100 secuencias. Las bacterias endoseminales presentaron una riqueza de 17 géneros, mientras que las episeminales presentaron 13 géneros bacterianos. En cuanto a la eficiencia de muestreo, las bacterias endoseminales presentaron un 46 % mientras que las episeminales tuvieron un 79 % de cobertura (Tabla 6).

En *F. pilosus* la diferencia entre endoseminales y episeminales se alcanzó a las 1,500 secuencias, y se obtuvo una riqueza de 15 y 10 géneros, respectivamente. La eficiencia del muestreo de esta especie fue la más completa, ya que tanto en endoseminales como en episeminales se encontraron valores superiores al 80 %, haciendo de los microorganismos asociados a la superficie de esta especie el muestreo más completo de este estudio, con el 89 % de cobertura.

Finalmente, contrario a lo observado en las especies anteriores, *S. queretaroensis* fue la única especie que mostró una mayor riqueza en episeminales, con 21 géneros en comparación con los endoseminales (con 18 géneros). La eficiencia de muestreo para esta especie indica que en endoseminales se alcanzó a cubrir el 56 %, mientras que en los episeminales se cubrió el 64 % de la riqueza estimada (Tabla 6, Figura 18).

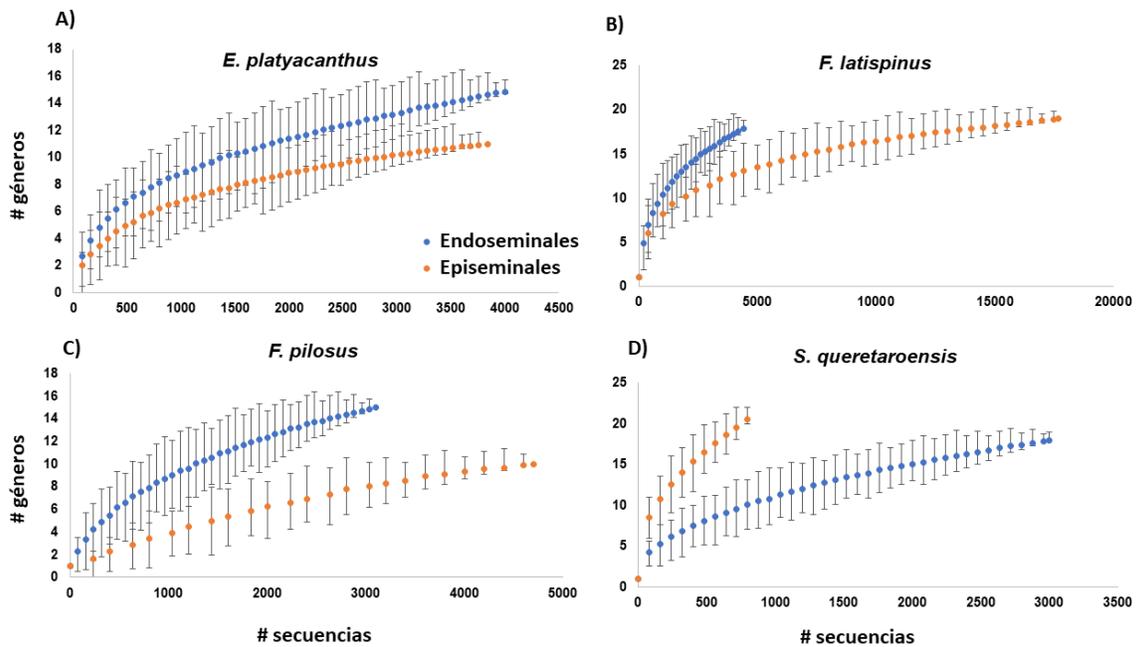


Figura 18. Curvas de rarefacción de los géneros bacterianos asociados a *E. platyacanthus* (A), *F. latispinus* (B), *F. pilosus* (C) y *S. queretaroensis* (D). Los puntos azules representan a géneros endoseminales de semillas y los puntos anaranjados representan géneros episeminales a la semilla de cactáceas.

Con el objetivo de saber cuál era la diversidad de las comunidades microbianas, tanto endoseminales como episeminales asociadas a estas cactáceas, se realizó el cálculo de los índices de diversidad de Shannon y de dominancia, dos índices ampliamente utilizados en ecología de comunidades. En la Figura 19 se presenta la representación gráfica del índice de diversidad de Shannon, se observa que la comunidad de bacterias episeminales en tres de las cuatro especies; *E. platyacanthus*, *F. latispinus* y *F. pilosus*, presentaron menores valores de diversidad que su contraparte endoseminal, por lo que poseen una baja diversidad. De acuerdo con los datos obtenidos, estas tres cactáceas cuentan con la presencia de grupos dominantes tanto al interior como al exterior de la semilla, esto también se observa en el heatmap de la Fig. 20.

En el caso de *S. queretaroensis*, se observó mayor diversidad en la comunidad de episeminales en comparación con los endoseminales. Además, los valores de diversidad observados en esta especie, tanto de endoseminales como de episeminales, fueron superiores a los correspondientes observados en el resto

de las cactáceas utilizadas en este estudio. En la Tabla 6 se muestra que esta especie presenta mayores valores de diversidad en comparación con el resto de las cactáceas de este estudio.

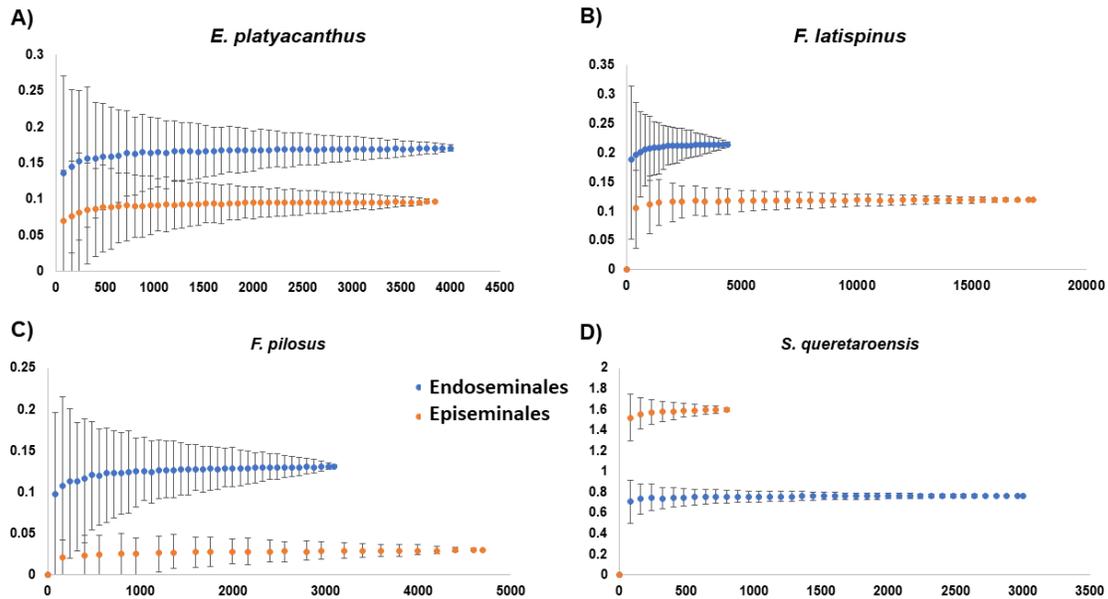


Figura 19. Índice de Shannon, basado en la diversidad de los géneros bacterianos asociados a semillas de cactáceas. las líneas paralelas representan los intervalos de confianza. Los puntos azules representan los géneros endoseminales, mientras que los puntos anaranjados representan géneros episeminales. Los datos para realizar estas curvas fueron obtenidos del programa EcoSim.

Los valores obtenidos muestran que tres especies de cactáceas presentaron microorganismos dominantes (Tabla 6), esto se corrobora en la Fig. 20 al hacer una comparación de la composición de la comunidad bacteriana asociada a cactáceas. Se observan los 10 géneros bacterianos más abundantes, pertenecen a dos phylum, Firmicutes y Proteobacteria. Se observa que tanto los endoseminales como episeminales de *E. platyacanthus*, *F. latispinus* y *F. pilosus* mostraron la presencia de un género dominante, ya que sus valores se encuentran cercanos a la unidad (Tabla 6). En el caso de *E. platyacanthus* dicha dominancia, tanto de endoseminales como en episeminales, está dada por miembros del género *Stenotrophomonas* con un 97 y 98 % respectivamente. En el caso de *F. latispinus* los géneros dominantes son *Kluyvera* en endoseminales (con un 96%) y *Stenotrophomonas* en episeminales

(con 98%). Las semillas de *F. pilosus* están colonizadas un 98% por *Stenotrophomonas* al interior y por *Paenibacillus* al exterior con un 99%. Finalmente, como se observó en la Tabla 6, la comunidad, tanto endoseminal como episeminal, asociada a *S. queretaroensis* fue la más diversa. En el caso de los endoseminales se encontró la presencia de los géneros *Bacillus* (70%) y *Stenotrophomonas* (20%) mientras que los episeminales mostraron mayor diversidad al presentar abundancias relativas menores al 40 % entre los grupos bacterianos detectados (*Aquibacillus*, *Bacillus* y *Paenibacillus*).

Al hacer un análisis más detallado, se observó que el mismo OTU, es decir, la misma especie, del género *Stenotrophomonas* fue el que dominó en todas las muestras. En el caso de los episeminales de *S. queretaroensis* se observa una gran diversidad de bacterias perteneciente al género *Bacillus* (ANEXO V).

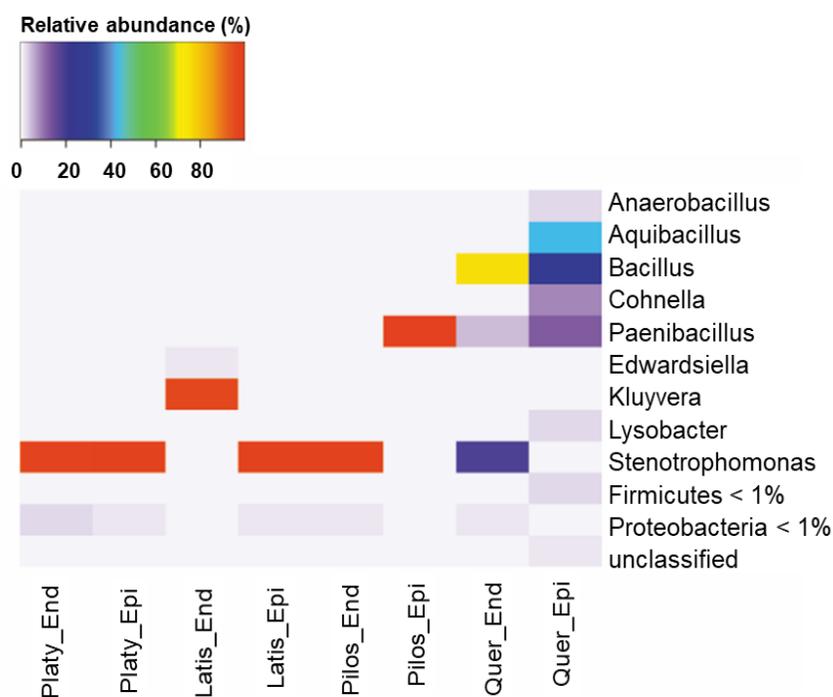


Figura 20. Heatmap construido a partir de las abundancias relativas de los géneros bacterianos identificados. El color rojo representa mayor abundancia, mientras que el color azul representa una abundancia relativa baja.

Identificación de hongos no cultivables mediante la secuenciación de la región ITS

Se analizaron un total de 289,444 secuencias correspondientes a hongos asociados a cactáceas (128,922 de endoseminales y 160,522 de episeminales), de las cuales una vez filtradas por calidad se obtuvo en promedio 36,180 secuencias en cada librería (Tabla 7). Se observa que, en tres de las cuatro especies de cactáceas el número de géneros fúngicos encontrados al interior de las semillas es mayor al encontrado en el exterior.

TABLA 7. COMPARACIÓN DE LA DIVERSIDAD ENTRE LOS GÉNEROS FÚNGICOS ENDOSEMINALES Y EPISEMINALES ASOCIADOS A SEMILLAS DE CACTÁCEAS

	Endoseminales						Episeminales					
	# secuencias	# géneros	H	D	Chao	% cobertura	# secuencias	# géneros	H	D	Chao	% cobertura
<i>E. platyacanthus</i>	28,945	156	1.336	0.4941	230	68	41,654	179	1.619	0.3626	278	64
<i>F. latispinus</i>	22058	246	1.995	0.3775	381	65	33336	236	2.401	0.1837	338	70
<i>F. pilosus</i>	37666	231	1.994	0.2644	314	74	43044	167	0.808	0.6724	289	58
<i>S. queretaroensis</i>	40253	246	1.921	0.232	409	60	42488	123	0.8445	0.5766	274	45

secuencias corresponde a la abundancia de los OTUs

H= índice de Shannon, D= Dominancia

Al igual que en bacterias, previo al procesamiento de datos, fueron removidos aquellos géneros fúngicos detectados en el control negativo los cuales fueron: *Penicillium* (67%), *Antrodia* (9%), *Cladosporium* (7%), entre otros (ANEXO VI).

También verificamos la presencia de los hongos presentes en la comunidad mock, nuestro control positivo. Detectamos una gran abundancia de *Saccharomyces*, (> 86%) y *Cryptococcus* (1 %), los cuales son los organismos presentes en la comunidad mock que, de acuerdo con lo reportado en la ficha técnica del producto, tienen una abundancia de 89 y 0.01 % respectivamente, lo cual indica que tuvimos una buena detección (ANEXO VI).

En la Figura 21 se presentan los resultados de la riqueza de géneros fúngicos endoseminales y episeminales de cuatro especies de cactáceas. Se observa que en tres de cuatro especies la mayor riqueza se encontró en los hongos

endoseminales. Todas las gráficas fueron realizadas con datos obtenidos en el programa EcoSim calculados a partir de los niveles de abundancia de cada librería.

En *E. platyacanthus* no se alcanzó una diferencia entre endoseminales y episeminales. Los hongos provenientes de interior de la semilla poseen una riqueza de 156 géneros diferentes, mientras que los episeminales alcanzaron 179 géneros. En cuanto a la eficiencia de nuestro muestreo se cubrió el 68 % al interior de la semilla, mientras que al exterior fue del 64 % (Tabla 7). En *F. latispinus* los hongos endoseminales presentaron una riqueza de 246 géneros, mientras que en los episeminales se encontraron 236. La eficiencia de muestreo para esta cactácea mostró un 65 % en endoseminales y de un 70 % en episeminales. La diversidad de grupos fúngicos presentes al interior de la semilla fueron diferentes a los encontrados al exterior (Fig. 22). En *F. pilosus* la diferencia en la diversidad entre endoseminales y episeminales estuvo presente en todo momento. En esta especie encontramos una riqueza en géneros de 231 endoseminales y de 167 episeminales, con una eficiencia de muestreo del 74 y 58 % respectivamente. Finalmente, *S. queretaroensis* mostró una riqueza de 246 géneros fúngicos endoseminales y de 123 episeminales. La cobertura del muestreo indica que en endoseminales se cubrió el 60 %, mientras que en los episeminales se cubrió el 45 % de la riqueza estimada, por lo que, al igual que en bacterias, esta especie fue la que menos cobertura de muestreo presentó en el estudio.

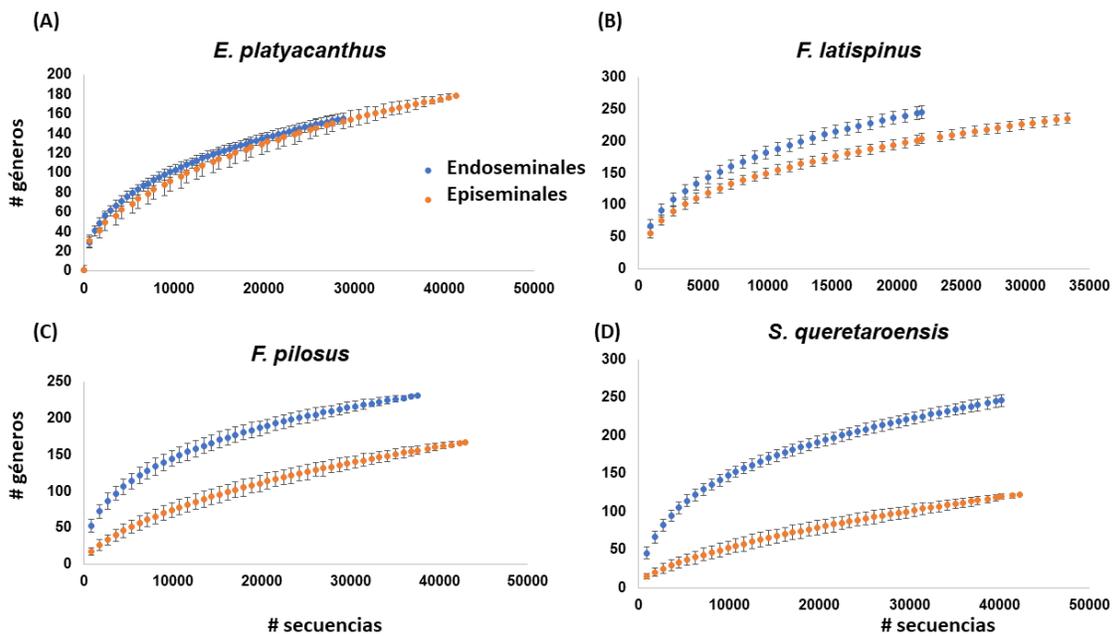


Figura 21. Curvas de rarefacción de los géneros fúngicos asociados a *E. platyacanthus* (A), *F. latispinus* (B), *F. pilosus* (C) y *S. queretaroensis* (D). Los puntos azules representan a géneros endoseminales y los puntos anaranjados representan géneros episeminales en cactáceas.

De acuerdo con los valores del índice de Shannon calculados para hongos (Tabla 7), la comunidad endoseminal asociada a las especies de *Ferocactus* y *Stenocereus* mostraron mayor diversidad, por su parte, la comunidad episeminal asociada a *E. platyacanthus*, y *F. latispinus* mostró la mayor diversidad. En la Figura 22 se muestran los valores de diversidad de Shannon de las comunidades endoseminales y episeminales de hongos en el muestreo, donde, a diferencia de lo observado en bacterias, los hongos muestran una comunidad más diversa, la cual, se puede apreciar en el heatmap de la Figura 23.

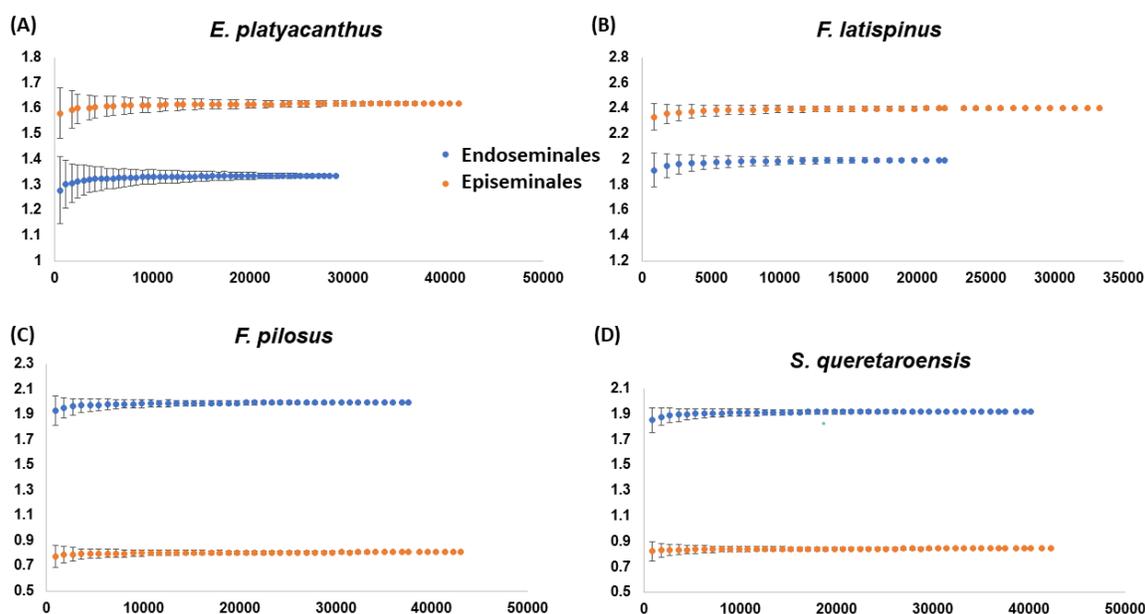


Figura 22. Índice de Shannon, basado en la diversidad de OTUs fúngicos (a nivel género) asociados a semillas de cactáceas. Los puntos azules representan los OTUs endoseminales y puntos anaranjados representan OTUs episeminales a la semilla. Los datos para realizar estas curvas fueron obtenidos mediante el programa EcoSim

Los endoseminales de *E. platyacanthus* están asociados con los géneros *Circinella* (68%) y *Fusarium* (14%), mientras que los episeminales se asociaron principalmente con *Filobasidium* (56 %) y *Aureobasidium* (19%). Por su parte, los endoseminales asociados a *F. latispinus* se caracterizaron por los géneros *Podoscypha*, cuya abundancia fue del 60%, mientras que los episeminales asociados a esta planta se asociaron con *Filobasidium* (36 %). Es importante señalar que en esta especie se encontraron otros géneros fúngicos, sin embargo, sus abundancias relativas fueron inferiores al 10%. En el caso de *F. pilosus*, los hongos endoseminales estuvieron asociados al género *Heteroconium* (con una abundancia del 43 %) y *Fusarium* (22 %), mientras que los episeminales de esta misma especie se asociaron con *Fusarium* en un 81 %. En el caso de *S. queretaroensis* encontramos una mayor diversidad en cuanto a hongos se refiere (Fig. 23). Los endoseminales de esta especie están asociados al género *Orphella* y *Heteroconium* y *Cephalotheca*, con una abundancia del 33, 27 y 17 %, respectivamente. Los episeminales estuvieron asociados a *Filobasidium* y *Aureobasidium*, con abundancias relativas del 72 y del 22%, respectivamente.

En el dendrograma resultado del análisis de clustering basado en la distancia de Bray-Curtis que se presenta en la Fig. 23 se puede observar una clara separación entre los hongos endoseminales y episeminales de cactáceas. Se observan grupos característicos de cada compartimento, por ejemplo, en endoseminales resalta la presencia de *Heteroconium* u otros miembros del género Ascomycota, mientras que el episeminales destaca la presencia de *Aureobasidium* y *Filobasidium*. De igual forma se observan algunos grupos que están presentes tanto al interior como al exterior de las semillas, como es el caso de *Fusarium* y *Aerobasidium*.

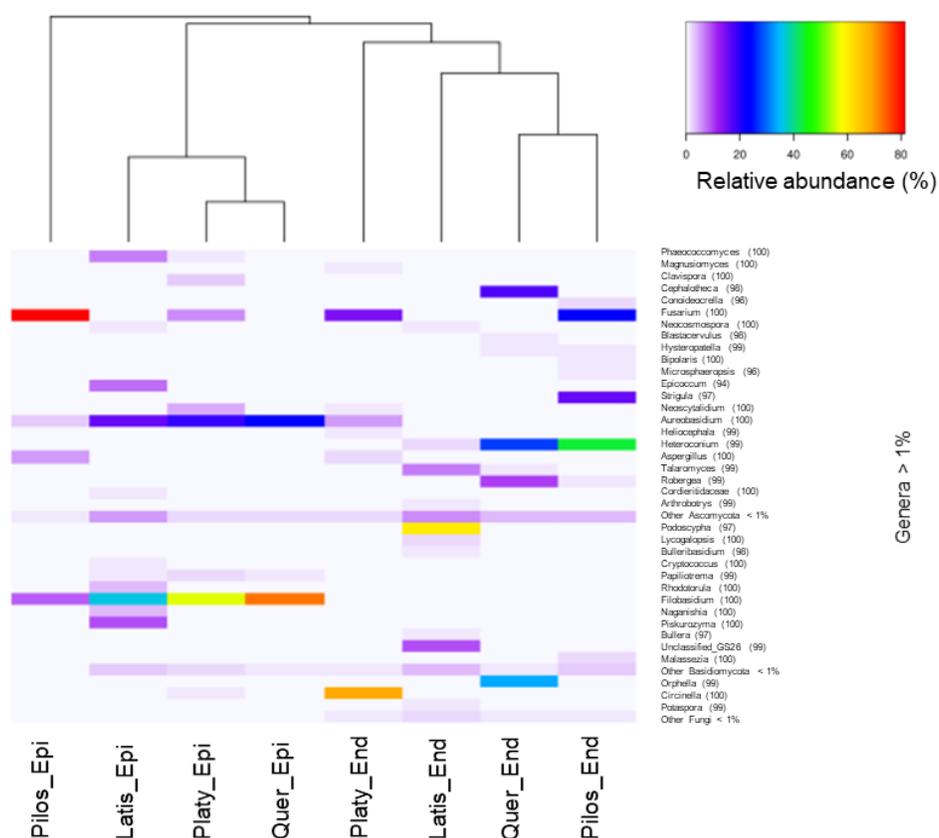


Figura 23. Heatmap construido a partir de las abundancias relativas de los géneros fúngicos identificados. En el dendrograma se presenta la agrupación de los hongos endoseminales y episeminales. El color rojo representa la abundancia relativa más alta, mientras que los colores azul y morado representan una abundancia relativa baja.

MICROORGANISMOS Y SU EFECTO PROMOTOR DE LA GERMINACIÓN

Los resultados del experimento de re-inoculación de semillas, para evaluar el efecto de los microorganismos presentes en la superficie de la semilla y su efecto sobre la germinación y/o protección de las semillas son presentados en la Fig. 24. También se presenta el porcentaje de germinación, se observan diferencias estadísticamente significativas entre las semillas que fueron lavadas y aquellas que no fueron lavadas (intact), siendo estas últimas las que presentaron mayores porcentajes de germinación. En cuanto a las cepas utilizadas, no se observaron diferencias significativas con las semillas lavadas.

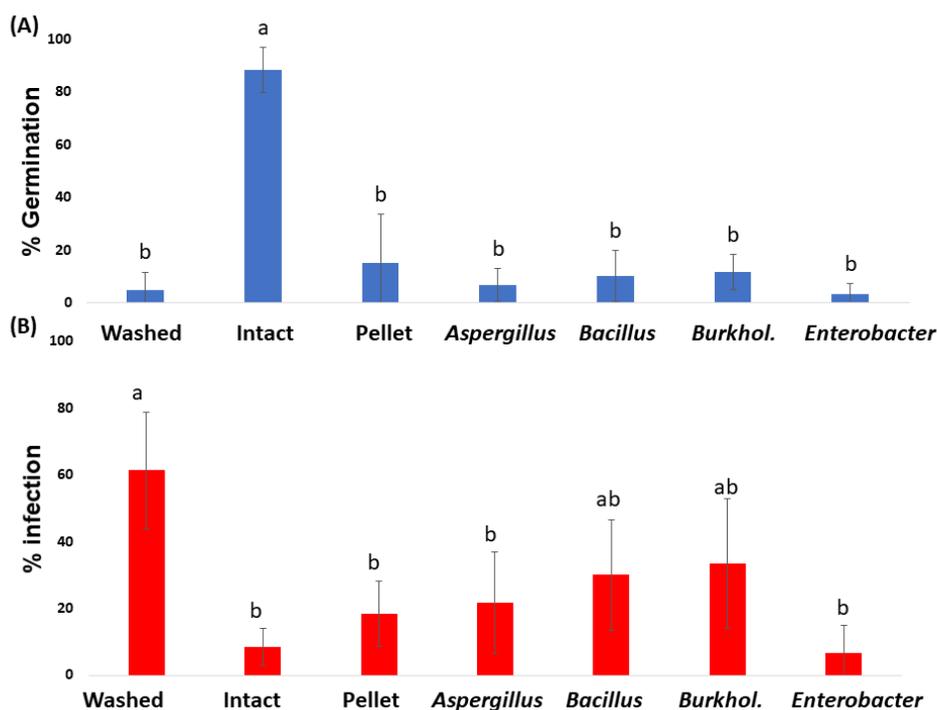


FIGURA 24. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN E INFECCIÓN ENTRE SEMILLAS DE *E. PLATYACANTHUS* LAVADAS Y AQUELLAS SOMETIDAS AL TRATAMIENTO DE RE-INOCULACIÓN. LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS.

En la Fig. 24B se presenta el porcentaje de infección entre semillas lavadas (washed), semillas no lavadas (intact) y semillas lavadas que fueron re-inoculadas con microorganismos aislados de esta especie, *E. platyacanthus*. Se observa que las

semillas que fueron sometidas al tratamiento de lavado presentaron mayores porcentajes de infección, probablemente por hongos del género *Aspergillus* (Fig. 25), mientras que las semillas extraídas directamente del fruto (intact) y aquellas que, después del lavado, fueron re-inoculadas con algún microorganismo presentaron menores porcentajes de infección. De las cinco cepas utilizadas solamente dos, *Bacillus* y *Burkholderia*, no mostraron diferencias significativas con las semillas lavadas en cuanto al porcentaje de infección (Fig. 24 B).

En la Fig. 25 se muestra una comparación entre semillas y plántulas sanas (Fig. 25A-B) contra semillas y plántulas infectadas por *Aspergillus* (Fig. 25C-D).



FIGURA 25. COMPARACIÓN ENTRE SEMILLA Y PLÁNTULA SANAS (A-B) CONTRA SEMILLA Y PLÁNTULA INFECTADA (C-D) POR ASPERGILLUS.

DISCUSIÓN

En este trabajo se determinó que las bacterias asociadas a las semillas de cactáceas son, en general, poco diversas a nivel de género, en contraste con los hongos, los cuales presentaron una gran diversidad a nivel taxonómico de género, además de diferenciarse entre aquellos que colonizaron el interior o el exterior de las semillas. También se encontró que la composición de la microbiota de la semilla influye en el porcentaje de germinación, muy probablemente porque sus miembros presentan capacidades promotoras del crecimiento vegetal, dentro de las que destacan, de acuerdo a lo observado en nuestro experimento de re-inoculación, la protección ante patógenos en los primeros estadios del desarrollo vegetal, además de la fijación de nitrógeno, actividad quitinolítica y producción de fitohormonas (Kumar & White, 2019).

En general, se observó una mayor riqueza en los microorganismos endoseminales que en los episeminales. Resultados similares han sido reportados en diversas investigaciones donde se sugiere que la capacidad de estos microorganismos para colonizar estos tejidos depende de su facultad para formar estructuras que permitan desplazarse al interior de la semilla o la planta, así como su capacidad para formar esporas que le permiten sobrevivir a las condiciones presentes en las semillas (Cope-Selby *et al.*, 2017; Klaedtke *et al.*, 2016; Truyens *et al.*, 2015).

La mayoría de las bacterias identificadas en este estudio se encuentran comúnmente presentes en tejidos vegetales, como son semillas, raíces y tallos, así como en el suelo (Hardoim *et al.*, 2012). Estos microorganismos pueden formar un microbiota esencial presente en diferentes especies de plantas, las cuales les permiten dispersarse y llegar a nuevos ambientes por medio de sus semillas. Un ejemplo se muestra con la presencia de *Stenotrophomonas*, la cual es una bacteria oportunista, algunas especies de este género han sido identificadas como patógenas humanas (Criollo *et al.*, 2012). Sin embargo, también han sido reportadas en suelos y en asociación con plantas (Taulé *et al.*, 2012). En este estudio se encontró que este género fue el único presente en todas las cactáceas, principalmente como endoseminal, su presencia como episeminal se observó

únicamente en *E. platyacanthus* y *F. latispinus*. Algunos autores han reportado que cepas de *Stenotrophomonas* pueden presentar actividad antifúngica, también han reportado la mitigación del estrés biótico y abiótico en plantas (Etesami & Alikhani, 2016; Kumar & White, 2019), aspectos fundamentales en el establecimiento de cactáceas. Se ha reportado que este género tiene miembros con la capacidad de producir hormonas indólicas, además de participar en la fijación de nitrógeno mediante la reducción de acetileno (Taulé *et al.*, 2012), características promotoras del crecimiento vegetal que fueron detectadas en las cepas de *Stenotrophomonas* aisladas en este estudio.

La mayoría de las investigaciones referentes a bacterias asociadas a semillas se han realizado en especies de interés agrícola, como es el caso de arroz (Hardoim *et al.*, 2011), maíz (Johnston-Monje & Raizada, 2011), trigo (Huang *et al.*, 2016), entre otros. A diferencia de esto, en este estudio se utilizaron especies de cactáceas silvestres que también tienen algún tipo de aprovechamiento por el ser humano. Se observó que la comunidad microbiana asociada a las especies de interés agrícola no es la misma que se encontró en especies de cactáceas silvestres, sin embargo, las funciones de estos microorganismos en la promoción del crecimiento vegetal fueron similares, como es la producción de fitohormonas (Tsavkelova *et al.*, 2006), fijación de nitrógeno (Johnston-Monje & Raizada, 2011), acidificación del medio donde crecen (Puente *et al.*, 2009c), entre otras.

Esta diferencia en la diversidad de la comunidad microbiana entre especies cultivables y silvestres posiblemente se deba al tipo de manejo al que son sometidas las semillas durante su siembra, cosecha o almacenado, pues existe evidencia que sugiere una influencia por estos factores sobre la comunidad microbiana (Klaedtke *et al.*, 2016). Además del tipo de especie y sus características inherentes (metabolismo CAM, adaptaciones morfológicas a ambientes áridos, entre otras) (Kumar & White, 2019).

Las especies bacterianas halladas en este estudio están asociadas, principalmente, con microorganismos presentes en el suelo, por lo que se refuerza la idea de que los microorganismos asociados a las semillas pueden transferirse

desde la rizosfera moviéndose en el interior de tejidos vegetales hasta llegar al fruto y, de esta manera, colonizar las semillas (Truyens *et al.*, 2015).

Además del género *Stenotrophomonas*, otros grupos con alta abundancia en este estudio fueron: *Bacillus*, para los cuales se ha reportado su capacidad de producir ácidos orgánicos que liberan fósforo para el aprovechamiento de la planta, además de que pueden fijar nitrógeno, ayudando de esta forma en el crecimiento de las plántulas (Puente *et al.*, 2009a); *Paenibacillus* los cuales tienen la capacidad de producir IAA, sideróforos, además de poder solubilizar fosfatos y en algunos casos, inhibir el crecimiento de patógenos (Díaz Herrera *et al.*, 2016); *Burkholderia*, que también tienen la capacidad de solubilizar fósforo inorgánico insoluble por medio de la producción de ácidos orgánicos, especialmente el ácido glucónico (Hayat *et al.*, 2010), también se ha reportado la producción de IAA por miembros de este género. Amador-Alfárez *et al.* (2013) encontraron que concentraciones de esta fitohormona a 250 y 500 ppm en semillas de *Ferocactus latispinus* y *F. histrix* respectivamente, promueven la germinación en un 51 y 18% en comparación con el tratamiento control. Otro género que se encontró asociado a semillas de cactáceas fue *Enterobacter*. Algunos autores sugieren que la capacidad para promover el crecimiento vegetal por parte de este grupo se debe a la actividad enzimática que pueden realizar los miembros de este género (Shahzad *et al.*, 2018), muestra de ello es que en este trabajo las cepas aisladas de *Enterobacter* fueron las que presentaron mayor actividad quitinolítica (Anexo III).

Por otra parte, la simbiosis entre plantas y hongos es universal, siendo fundamental esta relación en algunas especies (Usuki & Narisawa, 2007). La diversidad de grupos fúngicos asociados a semillas de las cactáceas estudiadas, en general, fue superior en endoseminales que en los episeminales (Fig. 7).

De acuerdo con Barret *et al.* (2015) la comunidad fúngica de semillas en especies de la familia *Brassicaceae* están relacionadas con cuatro clases principales asociadas al phylum *Ascomycota* (*Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Leotiomycetes* y *Sordariomycetes*), así como una clase del phylum *Basidiomycota* (*Tremellomycetes*). En este estudio encontramos tres de estas clases,

Tremellomycetes (27.7 %), *Sordariomycetes* (21.1 %) y *Dothideomycetes* (26.8 %), todas con mayor abundancia en la parte superficial de las semillas.

Se observa que existen algunos grupos presentes tanto al interior como al exterior de las semillas, como son *Fusarium*, que es un género ampliamente reportado como un patógeno (Azevedo & Quecine, 2017), cuya abundancia se ha reportado que depende de los exudados radicales de la planta huésped (Rojas *et al.*, 2019; Wang & Bergeson, 1974). A pesar de esto, algunas investigaciones han reportado un efecto promotor de crecimiento vegetal por parte de hongos del género *Fusarium*, ejemplo de ello es el trabajo realizado por Zhang *et al.* (2012), donde se demuestra la capacidad de *Fusarium oxysporum* para promover el crecimiento en el sistema radical de *S. alfredii* en sitios con alto contenido de metales pesado (Pb, Zn, Cd y Cu). Teniendo en cuenta que en el estado de San Luis Potosí se caracteriza por la actividad minera de zinc, posiblemente la presencia de este hongo en semillas de cactáceas facilite su establecimiento (Cabrera Rodríguez, 2012).

Otra explicación sobre la asociación de este hongo con las semillas de cactáceas posiblemente se deba a que muchas especies de hongos las utilizan como vectores para alcanzar hospederos más vulnerables, ya que se han encontrado como endoseminales en tejidos como raíz y tallo en *Opuntia*, *Cylindropuntia*, *Echinocereus*, *Mammillaria* y *Cereus* (Azevedo & Quecine, 2017).

Otro grupo que también estuvo asociados a semillas (tanto al interior como al exterior) fue *Aureobasidium*, como se ha reportado en otras investigaciones (Nelson, 2017). Este género de distribución mundial puede ser patógeno de humanos, teniendo reportes de algunos casos de asma (Pontón *et al.*, 2002). Existen reportes que aseguran que miembros del género *Aureobasidium* pueden inhibir el crecimiento de otros hongos patógenos, como *Alternaria* (Van Den Heuvel, 1969). Se ha reportado que *Aureobasidium pullulans* es un hongo oligonitrófilo, es decir, que le bastan pequeñas cantidades de nitrógeno para vivir (Cooke, 1959), además, pueden promover el crecimiento de la planta mediante el transporte de nitrógeno (Usuki & Narisawa, 2007), capacidad que en ambientes áridos es fundamental para el crecimiento vegetal.

Por otra parte, existen algunos géneros de hongos que se encontraron exclusivamente al interior (*Talaromyces*) o exterior de las semillas (*Filobasidium*). En el caso de los *Talaromyces* se sabe que pueden promover el crecimiento vegetal, mediante el fortalecimiento del sistema de defensa de las plantas por medio de la producción de metabolitos secundarios (Esser, 2004; Vinale *et al.*, 2017), los cuales pueden inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos o bien, atraer a microorganismos promotores de crecimiento vegetal que se pueden asociar con las estas cactáceas, facilitando de este modo su establecimiento en el ambiente.

Finalmente, el género *Filobasidium* ya ha sido asociado a suculentas Bandoni *et al.* (1991) realizaron un trabajo descriptivo reportando la presencia de este género en diferentes especies de *Yucca* spp. en los estados de California, Nevada y Texas. Se sabe que los miembros de este género son patógenos en el humano (Kim *et al.*, 2017). El papel ecológico de este grupo es desconocido, ya que las cepas se han aislado de diferentes fuentes, como plantas, animales o suelo (Esser, 2004).

Se han reportado otros géneros de hongos asociados a la testa con la capacidad de degradarla, favoreciendo de este modo su germinación. Delgado-Sánchez *et al.* (2011) estudiaron el efecto de cuatro cepas de hongos (*Penicillium chrysogenum*, *Phoma medicaginis.*, *Trichoderma harzianum*, y *Trichoderma koningii*), sobre la germinación de semillas de *Opuntia* spp., encontrando que las semillas inoculadas con estas cepas presentaron mayores porcentajes de germinación en comparación con el tratamiento control. En esta investigación, estos géneros fueron asociados a las semillas estudiadas, sin embargo, su abundancia fue relativamente baja. Como se mencionó anteriormente, la función de estos hongos principalmente es degradar la testa. En el caso de las especies utilizadas en este estudio, son plantas cuyo fruto es consumido por diferentes animales, por lo que el paso de las semillas por el tracto digestivo podría simular la función del hongo al degradar la testa para promover su germinación. A pesar de que en hongos encontramos mayor diversidad que en bacterias, se observa que la cobertura de nuestro muestreo estuvo por debajo del 75 % (Tabla 7).

Como se puede observar, tanto en bacterias como en hongos nunca se alcanzó la asíntota de las curvas de rarefacción, y de acuerdo con el estimador de

Chao, en tres de las cuatro especies de estudio, se esperaría un mayor número de géneros tanto en bacterias como en hongos. Sin embargo, debemos tomar en cuenta que en ninguno de los análisis se removieron los *singletons* y *doubletons* (que se refieren a las especies representadas por uno o dos individuos en nuestro muestreo) lo cual, influye directamente sobre los análisis de diversidad (Chao *et al.*, 2014), ya que son tomados en cuenta para calcular los estimadores de diversidad.

Los bajos valores en el índice de Shannon para bacterias (Tabla 6) se deben a la presencia de grupos dominantes con abundancia por arriba del 96%, como se puede observar en la Fig. 20, los cuales tienen una gran influencia en este resultado, en pocas palabras, mientras haya un grupo dominante, no habrá diferencia en los valores de diversidad de Shannon a pesar de incrementar el número de especies muestreadas. En el caso de los hongos sucedió todo lo contrario, pues no se observó la presencia de grupos dominantes que influyeran en los análisis de diversidad, esto se puede observar tanto en los datos presentados en la Tabla 7 o la Fig. 23.

Finalmente, en este trabajo se demostró que la presencia de microorganismos episeminales es fundamental para la protección de la semilla y permitir de este modo el desarrollo del embrión para lograr la germinación. La cepa de *Aspergillus*, que ha sido reportado como saprófito y también como endoseminal (Hung & Rutgers, 2016), promueve el crecimiento vegetal por medio de la solubilización de fósforo (Achal *et al.*, 2007), la producción de diferentes fitohormonas (Bautista Celis & Gallardo, 2008), así como por la producción de diferentes metabolitos secundarios (Muria-Gonzalez *et al.*, 2015). En este estudio la cepa de este hongo reguló la infección de las semillas lavadas (Fig. 24), lo cual sugiere una función dual por parte de este microorganismo.

En el caso de *Enterobacter*, es una cepa ampliamente reportada como endófito, tanto de semillas como de otros tejidos en la planta (Kumar & White, 2019), y cuya tolerancia a estrés por sequía ha sido reportado (Naveed *et al.*, 2014), también participa en la producción de fitohormonas (IAA), solubilización de fosfatos, o actividad antifúngica (Verma & White, 2018). Dentro de las capacidades promotoras de crecimiento vegetal de esta cepa se encuentra la inhibición de

microorganismos patógenos, como se puede apreciar en la Fig. 10. Las semillas re-inoculadas con *Enterobacter* fueron las que presentaron menor porcentaje de infección en comparación con las semillas lavadas.

En el experimento de re-inoculación se observó que el tratamiento de pellet no pudo promover la germinación al igual que las semillas intactas, posiblemente esto se deba a que durante el tratamiento de lavado se removió parte de la capa de mucílago, la cual, entre muchas otras funciones, ayuda en la adherencia de los microorganismos a la semilla (Loredo-Osti *et al.*, 2004), por lo que al no estar en contacto permanentemente con la superficie de la semilla no pudieron ayudar en la degradación de la testa para facilitar la germinación. Esto también fue observado en los experimentos de la segunda etapa de esta investigación, las semillas con mucílago presentaron mayores porcentajes de germinación. En cuanto al porcentaje de infección, se encontró que la re-inoculación con los microorganismos del pellet redujo considerablemente la infección en semillas lavadas, esto pudo deberse a la acción de aquellos microorganismos que lograron permanecer adheridos a la testa, cuya actividad antimicrobiana es una de las principales características promotoras de crecimiento vegetal.

Los resultados obtenidos sugieren que tanto métodos dependientes como independientes de cultivo pueden ser complementarios (Cope-Selby *et al.*, 2017; Stefani *et al.*, 2015), ya que algunos de los microorganismos aislados se encontraban en bajas proporciones o no fueron identificados con los métodos independientes de cultivo. Esto podría ser explicado por diferentes factores, desde un insuficiente número de lecturas durante la secuenciación para cubrir el total de los grupos taxonómicos presentes, como lo indican las curvas de rarefacción tanto de bacterias como de hongos (Figs. 4 y 7, respectivamente), o bien, por los sesgos inherentes a los métodos y reactivos utilizados en la extracción de DNA y posterior PCR, que han sido desarrollados principalmente para microorganismos presentes en el suelo, los cuales requieren de tratamientos más rigurosos para la lisis celular y poder obtener el DNA (Cope-Selby *et al.*, 2017). Esto se corroboró con el uso de la comunidad mock en la que observamos que los microorganismos con una

abundancia por debajo de 0.89 % de DNA presente en la muestra difícilmente son detectados.

A pesar de la limitante que presentan los microorganismos cultivables, el conocer sus requerimientos de crecimiento, así como las propiedades que ayudan en el desarrollo vegetal, nos ha permitido entender las funciones que estos microorganismos realizan en el ecosistema, los mecanismos utilizados y la manera en la cual regulan a otros microorganismos patógenos que pueden llegar a colonizar las plantas (Bacon & White, 2016).

CONCLUSIONES

Las semillas de cactáceas utilizadas en este estudio se asocian a una gran diversidad de bacterias u hongos con capacidades promotoras del crecimiento vegetal. Algunos de estos microorganismos se encontraron exclusivamente en el interior (*Talaromyces* en hongos) o exterior (*Filobasidium* en hongos) de las semillas. En el caso de los microorganismos aislados del exterior de las semillas, particularmente *Enterobacter* o *Aspergillus*, se observó que pueden controlar la presencia de microorganismos patógenos que afectan el desarrollo vegetal.

El conocimiento sobre qué microorganismos están asociados a las plantas es fundamental para conocer las dinámicas de establecimiento requeridas por alguna especie en específico, de esta manera se pueden desarrollar estrategias de manejo que reduzcan las pérdidas de plántulas y optimicen la recuperación de especies en alguna categoría de peligro de extinción, como lo son las cactáceas.

CONCLUSIONES GENERALES

La germinación de cactáceas es un proceso complejo que requiere la conjugación de diversos factores (Fig.26). En este trabajo se abordaron factores poco estudiados en especies de la familia Cactaceae: la morfología y anatomía de semillas, la diversidad de microorganismos internos y externos a las semillas, así como el efecto combinado de fitohormonas, luz y mucílago en la germinación de semillas. Esta investigación representa una aproximación integrada sobre la germinación de cactáceas en ambientes áridos de México.

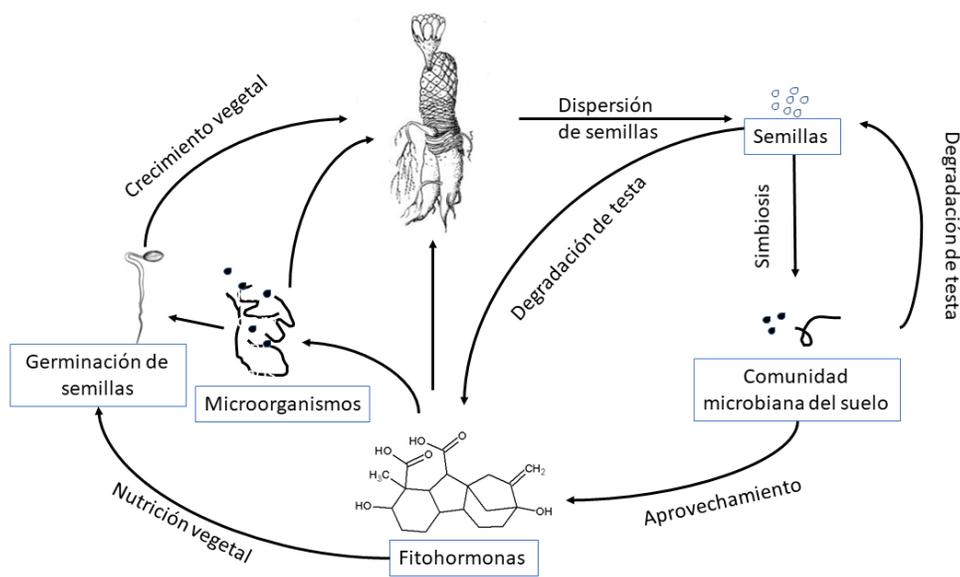


FIGURA 26. FACTORES ABORDADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN QUE INFLUYEN EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS.

Todas las especies de cactáceas utilizadas en este trabajo presentan una capa de mucílago, aunque su estructura anatómica es diferente y, esto último, puede influir en sus estrategias de germinación. También se detectó que la capa de mucílago es fundamental para la protección del embrión o la germinación en estas especies.

En el caso particular de cada especie se encontró que *E. platyacanthus* y *F. pilosus* presentaron una capa de macrosclereidas en la testa, algo no detectado

antes en cactáceas. Sin embargo, se necesita más investigación al respecto que corrobore la presencia de estas células y su efecto en la germinación.

Las semillas de *E. platyacanthus* presentaron diferencias significativas en su porcentaje de germinación entre semillas con y sin mucílago. Esta especie presentó principalmente bacterias del género *Stenotrophomonas*, las cuales son un género ampliamente distribuido con capacidades promotoras del crecimiento vegetal.

Al comparar el efecto del mucílago en la germinación de *F. latispinus* se encontró que aquellas semillas que conservaron esta capa presentaron mayores porcentajes de germinación. Sin embargo, al agregar GA₃ en altas concentraciones (500 y 1,000 mg/l) no se observaron diferencias entre semillas con o sin mucílago. Se encontró que la comunidad bacteriana asociada a esta especie difirió entre quienes colonizan el interior (*Kluyvera*) o exterior (*Stenotrophomonas*) de la semilla.

Por su parte, *F. pilosus* no mostró diferencias en el porcentaje de germinación entre semillas con y sin mucílago. La comunidad microbiana de esta especie se diferenció por los grupos que lograron colonizar el interior de la semilla (*Stenotrophomonas*) o permanecieron en su superficie (en bacterias *Paenibacillus* y en hongos *Fusarium*).

Finalmente, las semillas de *S. queretaroensis* sin mucílago no mostraron germinación, por lo que esta capa de mucílago es fundamental para el ciclo de vida de esta especie. En cuanto a la comunidad microbiana asociada a esta especie, fue la más diversa de todas las especies estudiadas en este trabajo.

ANEXO I Métodos para la caracterización de bacterias CULTIVABLES

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA); PROTOCOLO DE SALKOWSKI (1985):

➤ Preparación del reactivo Salkowski (100 mL)

- 2 mL de FeCl₃ a una concentración 0.5 M.
- 49 mL de ácido perclórico al 70%.
- 49 mL de agua destilada.

➤ Preparación del medio YEM (manitol-extracto de levadura) adicionado con triptófano (1 L)

- | | |
|--|----------|
| • Extracto de levadura | 1.0 g |
| • Manitol (C ₆ H ₁₄ O ₆) | 10.0 g |
| • Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄) | 0.5 g |
| • Sulfato de magnesio (MgSO ₄) | 0.2 g |
| • Cloruro de sodio (NaCl) | 0.1 g |
| • Triptófano (1%) | 1.0 g |
| • Agua destilada | 1,000 mL |

Se esterilizó en autoclave por 15 min a 120°C y 15 lb de presión.

➤ Incubación de bacterias

En tubos falcón de 15 mL se colocaron 5 mL del medio YEM estéril. Con palillos de mesa estériles se tomó una muestra de una cepa bacteriana el cual se introdujo en un tubo de ensayo, se incubó en un cuarto oscuro a 28° C y 60 rpm durante 6 días.

➤ Ajuste de la densidad óptica (DO) del cultivo bacteriano

Se midió la absorbancia (ABS) a una longitud de onda de 560 nm y si la ABS fue superior a 0.400 ABS se diluyó con medio YEM estéril, hasta alcanzar un valor igual o aproximado a 0.4 ABS. Una vez alcanzada la ABS deseada se conservó la alícuota en un tubo eppendorf.

➤ Curva de calibración de AIA

A partir de una solución “stock” de AIA (preparada a partir de la hormona comercial “3-indoleacetic acid 98%, SIGMA-ALDRICH”) disuelta en medio YEM realizaron diluciones para obtener soluciones a concentraciones de 5, 10, 20, 50 y 100 ppm y el blanco (medio YEM sin AIA adicionado).

➤ Lectura de absorbancia

Para leer la absorbancia de los cultivos se utilizó un espectrofotómetro para microplacas Epoch con capacidad de 300 µL por pozo. Se realizaron tres repeticiones por cultivo. La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera:

De los cultivos con DO de 0.4 ABS se tomaron 1.5 mL y se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL, luego se centrifugaron a 13000 × g durante 5 minutos.

Dentro de una misma microplaca óptica, fue incluida la curva patrón que se realizó utilizando 100 µL de las diluciones de AIA comenzando por el blanco y terminando con la concentración más alta, en los siguientes pozos se colocaron 100 µL del sobrenadante de los cultivos centrifugados posterior al ajuste de densidad óptica. Posteriormente se agregaron 200 µL del reactivo Salkowski a cada muestra y se mezclaron con una pipeta multicanal. La placa se dejó incubar durante 30 min en condiciones de oscuridad. Finalmente se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro para microplacas Epoch (BioTeK Instruments Inc.) a una longitud de onda de 530 nm.

PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS; CROMO AZUROL SULFONATO (CAS) (SCHWYN & NEILANDS, 1987)

➤ Preparación del medio NFb líquido para el crecimiento de las cepas (6.8 pH)

- Ácido málico 3.7 g
- K₂HPO₄ (10%) 5 mL
- MgSO₄ 7H₂O (10%) 2 mL
- NaCl (10%) 1 mL
- CaCl₂ 2H₂O (1%) 2 mL
- Solución de micronutrientes 2 mL
- Agua destilada 1,000 mL
- Se adiciona con NH₄NO₃ 1 g/L

Se esterilizó en autoclave por 15 min a 120°C y 15 lb de presión.

Solución de micronutrientes:

- Na₂MoO₄ 2H₂O 0.200 g
- MnSO₄ H₂O 0.235 g
- H₃BO₃ 0.280 g

- CuSO₄ 7H₂O 0.008 g
- ZnSO₄ 7H₂O 0.024 g
- H₂O 200 mL

Una colonia aislada fue sembrada en 3 mL de medio NFb líquido. Se incubó durante 48 h en un cuarto oscuro a 28° C y 60 rpm. Se tomó una alícuota y se ajustó la DO a una ABS de 0.2 a una longitud de onda de 560 nm.

➤ Preparación del colorante CAS 10x (50 mL)

Solución A: se pesaron 0.03025 g del colorante CAS y se disolvieron en 25 mL de agua destilada pH 7 (la solución adquiere un color rojizo). Se agregaron 50 µL de KOH al 10% (p/v) (se adquiere un color verde azulado) y después 5 mL de FeCl₃*6H₂O 1 mM (cambia la solución a color rojizo). Se agregaron 50 µL de KOH al 10% (p/v) y se adquirió nuevamente un color azulado.

Solución B: se pesaron 0.03645 g de CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) y se disolvieron en 20 mL de agua destilada pH 7. La mezcla se agitó durante varios minutos hasta que se disolvió por completo.

En agitación constante se agregó lentamente la solución A en la solución B (que adquirió nuevamente un color rojizo). Se agregaron 3 mL de KOH 10% (p/v), la mezcla adquirió un color verde azulado. Se esterilizó en la autoclave por 15 min a 120°C y 15 lb.

➤ Preparación del medio de cultivo (medio + PIPES)

Se utilizó 120 mL del medio de cultivo NFb líquido y se agregaron 4.575g de PIPES (ácido piperazín-N, N'-bis (2-etanosulfónico)) (pH 7). El PIPES baja el pH del medio a un valor de aproximadamente 3, a este pH el PIPES no se disuelve por lo que se llevó nuevamente el pH a 6.8 con KOH para que el PIPES se disolviera.

La mezcla se llevó a un volumen final de 135 mL con medio NFb y se agregaron 2.3 g de agar. La mezcla resultante se esterilizó en la autoclave por 15 min a 120°C y 15 lb.

➤ Preparación del Agar-CAS

Una vez esterilizado el medio + PIPES se dejó enfriar un poco y se agregaron 15 mL del colorante CAS 10X (estéril), la mezcla se agitó y se vació en cajas Petri libres de Fe^{+3} .

➤ Inoculación y determinación de sideróforos

Una caja Petri que contiene agar-CAS se inoculó con 10 μL de la suspensión bacteriana ajustada a una ABS de 0.2. Lo anterior se realizó por triplicado para cada cepa a ensayar. Se incubaron en un cuarto oscuro a 28°C durante 7 días.

La producción de sideróforos se observó por el cambio de color del agar CAS del verde azulado del medio a naranja, lo que produce la formación de un halo claro alrededor de cada una de las colonias. Se midió el tamaño del halo y la colonia con un vernier digital (Truper modelo H-7352).

ACIDIFICACIÓN DEL MEDIO

Las cepas aisladas se hicieron crecer en tubos falcón de 15 mL con 5 mL de medio líquido TSA durante toda la noche a 28 °C y 60 rpm. Posteriormente se realizó la medición del pH con un potenciómetro (Thermo Scientific™).

ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA; PROTOCOLO DE CASTRO ET AL., 2011

El medio con quitina ajustado a pH 8,0 \pm 0,2

- Agar 20,0 g,
- Quitina coloidal 4,0 g
- K_2HPO_4 0.7 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g
- KH_2PO_4 0.3 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g
- MnSO_4 1.26 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g
- Agua destilada 1,000 mL

La quitina coloidal se preparó según una modificación del método de Castro et al. 2011.

Se pesaron 2 g de quitina de cáscara de camarón, se agregaron 20 mL de HCl concentrado y se dejó en agitación por 50 min, después se añadieron 100 mL

de agua destilada fría y se dejó en agitación por 12 h. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 5 000 rpm por 10 min, el sobrenadante se retiró y se le agregó el mismo volumen de agua, se agitó con un vórtex y se volvió a centrifugar; este procedimiento se realizó cuatro veces para eliminar los restos del HCl. Por último, la quitina coloidal se esterilizó a 15 libras por 15 min y se almacenó a 4°C para su posterior uso.

En cajas Petri que contuvieron el medio suplementado con quitina se sembraron dos gotas de 4 µL de los microorganismos en buffer de fosfatos, con un ajuste de su DO a 0.4 ABS. Todas las cepas se evaluaron por triplicado.

Las cepas que crecieron en el medio con quitina fueron capaces de utilizarla como fuente de carbono y un halo claro alrededor de la colonia bacteriana, indicó actividad quitinasa positiva. Se realizó la relación halo/colonia a partir de la medición con un vernier digital (Truper modelo H-7352).

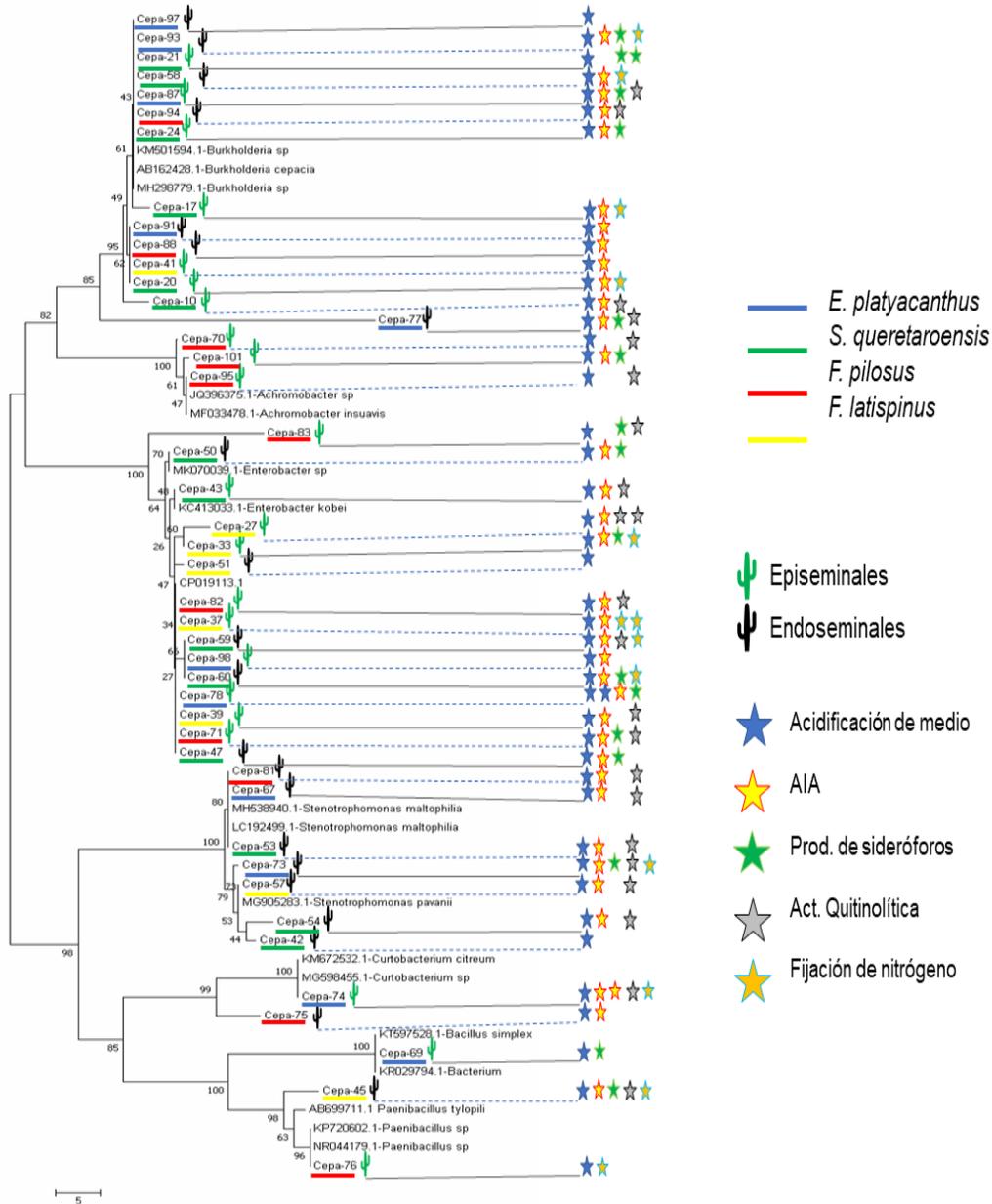
ACTIVIDAD REDUCTORA DE ACETILENO (ARA); PROTOCOLO DE OTERO (2011)

Es una prueba indirecta para saber la capacidad de la enzima nitrogenasa para reducir compuestos de triple enlace, como el nitrógeno molecular (N₂) o acetileno (C₂H₂).

En botellas de vidrio con una capacidad de 12 mL y tapa de algodón se inocularon inicialmente las bacterias en 5 mL de medio Rennie sin agar y durante 48 horas a 28°C y 60 rpm. Posteriormente se reemplazó el 10% de la atmosfera del tubo de cultivo con acetileno y se sustituyó el tapón de algodón por uno de caucho sellado herméticamente. Se incubó 24 horas a 28 °C y agitación de 60 rpm. La concentración de etileno se midió inyectando 100 µl de la atmosfera del tubo de cultivo en un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica y con detector de ionización de flama marca Agilent modelo 6890N. Para calcular la actividad de reducción de acetileno se realizó una curva de calibración a partir de diluciones seriadas de etileno en concentraciones de 1:50, 1:30 y 1:10 µl.

La actividad de reducción de acetileno para cada aislado se calculó según la altura del pico de etileno en el cromatograma extrapolando la curva patrón.

ANEXO II DIAGRAMA COMPLETO DE NEIGHBOR JOINING DE LAS CEPAS AISLADAS. SE MUESTRAN LOS GÉNEROS BACTERIANOS ASOCIADOS A CACTÁCEAS, ASÍ COMO LAS PROPIEDADES PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EVALUADAS. TAMBIÉN SE MUESTRA UBICACIÓN EN LA SEMILLA DONDE FUERON AISLADOS, ES DECIR, SI SON ENDOSEMINALES (CACTUS NEGRO) O EPISEMINALES (CACTUS VERDE).

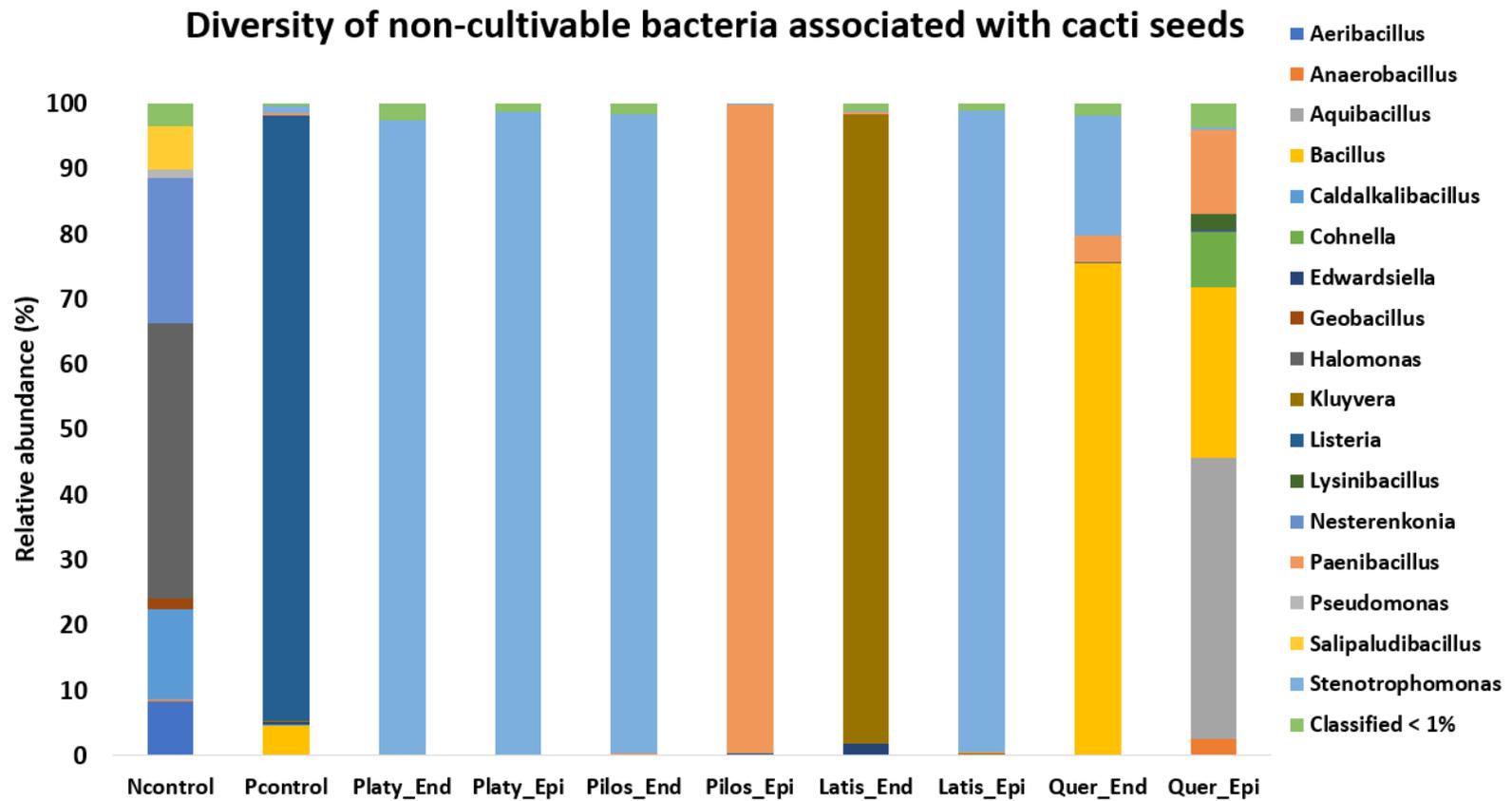


ANEXO III. TABLA DE CEPAS AISLADAS, SU IDENTIFICACIÓN Y LAS CAPACIDADES PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL QUE REALIZAN

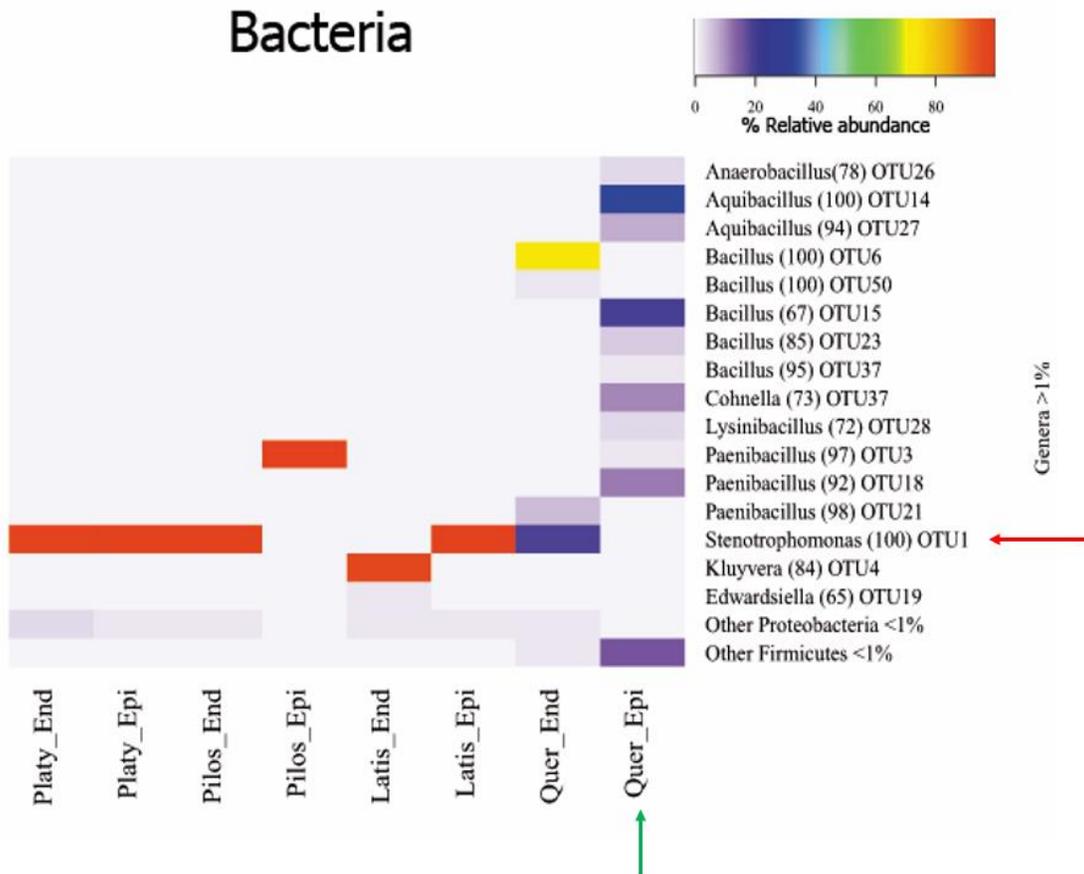
Especie	# Cepa	Ubicación en semilla	Género	pH	AIA	Sideróforos	A. Quitinolítica	ARA	Identidad %	Acceso NCBI referencia
					(mg/mL)		Halo/Colonia	nmol/día/ml		
<i>E. platyacanthus</i>	69	Exterior	<i>Bacillus</i>	5.77	-	2.01	-	-	100	KX301312.1
	74	Exterior	<i>Curtobacterium</i>	6.13	11.163	-	1.9	0.124	97	LC038166.1
	78	Exterior	<i>Enterobacter</i>	4.38	1.646	1.10	-	-	99	CP019113.1
	98	Exterior	<i>Enterobacter</i>	6.13	0.235	-	-	-	100	CP019113.1
	87	Exterior	<i>Burkholderia</i>	4.39	1.866	1.85	1.8	-	100	MF285777.1
	77	Interior	<i>Burkholderia.</i>	4.44	1.063	2.33	2.6	-	86	KY407748.1
	91	Interior	<i>Burkholderia</i>	6.18	0.534	-	-	-	97	CP021069.1
	93	Interior	<i>Burkholderia</i>	6.27	2.133	1.82	-	0.197	98	CP021069.1
	97	Interior	<i>Burkholderia</i>	6.16	-	-	-	-	98	KM501594.1
	67	Interior	<i>Stenotrophomonas.</i>	6.31	0.711	-	1.2	-	99	KM287528.1
	73	Interior	<i>Stenotrophomonas.</i>	6.5	1.304	1.54	1.6	0.084	99	KM287528.1
<i>F. pilosus</i>	71	Exterior	<i>Enterobacter</i>	4.55	3.647	1.67	2.6	-	99	CP019113.1
	76	Exterior	<i>Paenibacillus.</i>		-	-	-	0.100	99	MH782073.1
	82	Exterior	<i>Enterobacter</i>	4.44	2.080	-	2.0	-	98	CP019113.1
	83	Exterior	<i>Enterobacter</i>	6.36	-	1.35	1.9	-	97	CP019113.1
	70	Exterior	<i>Achromobacter</i>	6.45	-	1.19	1.4	-	97	JQ724537.1
	95	Exterior	<i>Achromobacter</i>	6.41	-	-	2.0	-	100	KF951064.1
	101	Exterior	<i>Achromobacter</i>	6.42	0.464	1.30	-	-	100	KF951064.1
	81	Interior	<i>Stenotrophomonas</i>	6.47	0.959	-	1.3	-	98	MH538940.1
	88	Interior	<i>Burkholderia</i>	6.29	3.103	-	-	-	98	CP021069.1
94	Interior	<i>Burkholderia</i>	6.45	2.509	-	1.8	-	100	MH022722.1	
<i>F. latispinus</i>	27	Exterior	<i>Enterobacter</i>	4.42	2.986	-	3.2	-	97	KC413033.1
	33	Exterior	<i>Enterobacter</i>	4.5	5.975	2.31	-	0.094	95	CP019113.1

	37	Exterior	<i>Enterobacter</i>	4.48	4.644	-	-	0.270	99	CP019113.1
	39	Exterior	<i>Enterobacter</i>	4.66	2.605	-	2.4	-	99	KX694407.1
	41	Exterior	<i>Burkholderia</i>	6.27	3.215	-	-	-	100	MH022722.1
	45	Interior	<i>Paenibacillus</i>	4.61	3.004	1.35	2.0	0.373	99	KP330261.1
	51	Interior	<i>Enterobacter</i>	4.61	-	-	-	-	97	KC413033.1
	57	Interior	<i>Stenotrophomonas</i>	4.51	1.120	-	2.9	-	97	MH538940.1
S. <i>queretaroensis</i>	43	Exterior	<i>Enterobacter</i>	6.46	2.764	-	2.3	-	99	CP019113.1
	10	Exterior	<i>Burkholderia</i>	6.32	1.381	-	1.8	-	97	MH298779.1
	17	Exterior	<i>Burkholderia</i>	6.31	0.413	-	-	0.214	98	CP021069.1
	20	Exterior	<i>Burkholderia</i>	6.33	1.540	-	-	0.116	98	KM501594.1
	21	Exterior	<i>Burkholderia</i>	6.26	-	4.76	-	-	99	MF285777.1
	24	Exterior	<i>Burkholderia</i>	6.33	0.033	1.88	-	-	100	MF285777.1
	12	Exterior	<i>Achromobacter</i>	6.6	0.380	-	1.6	-	99	NR_117706.1
	47	Interior	<i>Enterobacter</i>	4.46	2.424	1.94	-	-	96	CP019113.1
	50	Interior	<i>Enterobacter</i>	4.41	1.264	1.47	-	-	97	CP019113.1
	59	Interior	<i>Enterobacter</i>	4.67	1.971	-	1.3	0.062	99	CP019113.1
	60	Interior	<i>Enterobacter</i>	4.42	3.764	2.98	-	0.140	99	CP019113.1
	58	Interior	<i>Burkholderia</i>	5.81	2.415	-	-	0.053	100	LC192499.1
	42	Interior	<i>Stenotrophomonas</i>	6.4	1.433	-	1.9	-	98	LC192499.1
	44	Interior	<i>Stenotrophomonas</i>	4.51	4.344	1.19	2.8	-	90	JQ266279.1
	53	Interior	<i>Stenotrophomonas</i>	6.36	0.251	-	1.3	-	98	LC192499.1
	54	Interior	<i>Stenotrophomonas</i>	4.52	2.116	-	3.0	-	99	LC192499.1

ANEXO IV. COMPARACIÓN ENTRE LA DIVERSIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LAS LIBRERÍAS DE LOS TRATAMIENTOS CONTROL Y LA ENCONTRADA EN LAS CACTÁCEAS DE NUESTRO ESTUDIO

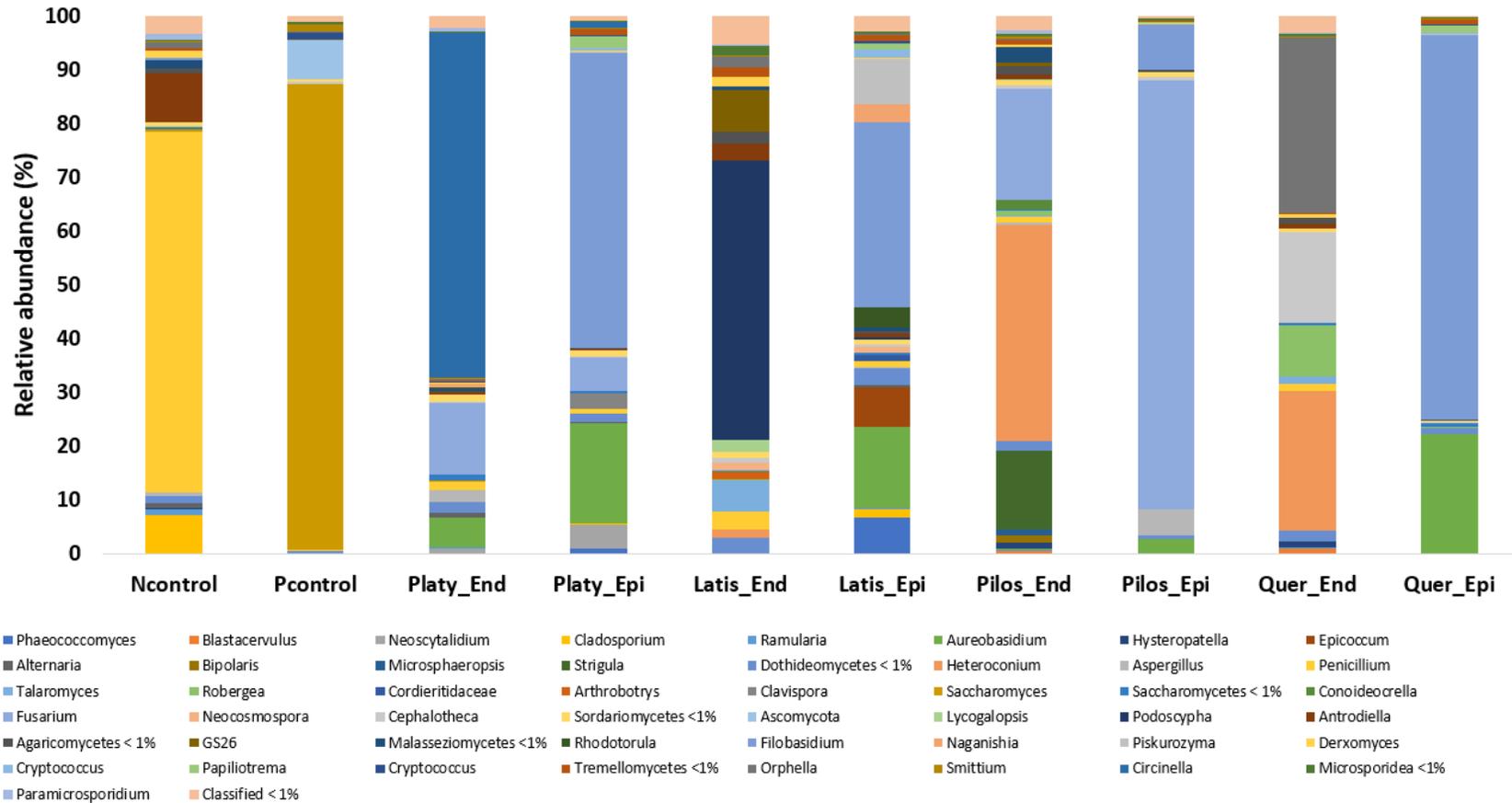


ANEXO V. HEATMAP A NIVEL DE OTU DE LAS BACTERIAS ASOCIADAS A SEMILLAS DE CACTÁCEAS. LA FLECHA ROJA INDICA EL OTU MÁS DOMINANTE EN CUATRO ESPECIES DE CACTÁCEAS, MIENTRAS QUE LA LÍNEA VERDE INDICA LA ESPECIE Y LA REGIÓN DE LAS SEMILLAS QUE PRESENTÓ MAYOR DIVERSIDAD.



ANEXO VI. COMPARACIÓN ENTRE LA DIVERSIDAD FÚNGICA PRESENTE EN LAS LIBRERÍAS DE LOS TRATAMIENTOS CONTROL Y LA ENCONTRADA EN LAS CACTÁCEAS DE NUESTRO ESTUDIO

Diversity of non-cultivable fungi associated with cacti seeds



REFERENCIAS

- Achal, V., Savant, V. V., & Reddy, M. S. (2007). Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), 695–699.
- Agarwal, L., Qureshi, A., Kalia, V. C., Kapley, A., Purohit, H. J., & Singh, R. N. (2014). Arid ecosystem: Future option for carbon sinks using microbial community intelligence. *Current Science*, 106(10), 1357–1363.
- Alcorn, S., & Kurtz, E. (1959). Some Factors Affecting the Germination of Seed of the Saguaro Cactus (*Carnegiea gigantea*). *American Journal of Botany*, 46(7), 526–529. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/>
- 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*, 23(35), 109–131.
- Aragón-Gastélum, J. L., Flores, J., Yáñez-Espinosa, L., Reyes-Olivas, Á., Rodas-Ortiz, J. P., Robles-Díaz, E., & González, F. J. (2017). Advantages of vivipary in *Echinocactus platyacanthus*, an endemic and protected Mexican cactus species. *Journal of Arid Environments*, 141, 56-59.
- Araya, E., Gomez, L., Hidalgo, N., & Valverde, R. (2000). Efecto de La Luz y del Acido Giberelico sobre la germinacion in vitro de Jaul (*Alnus acuminata*). *Revista Agronomia Costarricense*, 24(001), 75–80.
- Arriaga-Ruiz, M. C., Neri-Luna, C., Pimienta, E. y Sánchez-Martínez, J. (2015). El fruto del pitayo silvestre (*Stenocereus queretaroensis* (Weber) Buxbaum), una alternativa alimenticia, nutricional y socioeconómica en época de estiaje. *Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 2, 362-367
- Azevedo, L., & Quecine, C. (Eds.). (2017). *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*.
- Bacon, C. W., & White, J. F. (2016). Functions , mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. *Symbiosis*, 68(1–3), 87–98. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0350-2>
- Bandoni, R. J., Oberwinkler, F., & Bandoni, A. A. (1991). On Species of *Filobasidium* Associated with *Yuccas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 14(1), 98–101. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80368-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80368-1)
- Barberá, G. G., Navarro-Cano, J. A., & Castillo, V. M. (2006). Seedling recruitment in a semi-

- arid steppe: The role of microsite and post-dispersal seed predation, *67*, 701–714.
<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.03.019>
- Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Préveaux, A., Valière, S., & Bouchez, O. (2015). Emergence Shapes the Structure of the Seed Microbiota, *81*(4), 1257–1266.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03722-14>
- Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Préveaux, A., Valière, S., Bouchez, O., ... Jacquesa, M. A. (2015). Emergence shapes the structure of the seed microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(4), 1257–1266. <https://doi.org/10.1128/AEM.03722-14>
- Barrios, D., Flores, J., González-torres, L. R., & Palmarola, A. (2015). The role of mucilage in the germination of *Leptocereus scopulophilus* (Cactaceae) seeds from Pan de Matanzas, Cuba. *Botany*, *93*(4), 251–255. <https://doi.org/10.1139/cjb-2014-0242>
- Barthlott, W., & Hunt, D. (2000). Seed diversity in the Cactaceae, subfamily Cactoideae (Succulent Plant Research vol. 5). *Sherborne: David Hunt*, 173.
- Bashan, Y., Hernandez, J. P., Leyva, L. A., & Bacilio, M. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, *35*(5), 359–368. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0481-5>
- Baskin, J.M., Baskin, C.C., 1977. Seed and seedling ecology of *Opuntia compressa* in Tennessee cedar glades. *J. Tenn. Acad. Sci.* *52*, 118–122.
- Baskin, J. M., Baskin, C. C., & Li, X. (2000). Taxonomy , anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*, *15*, 139–152.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2014. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*, Second ed. Academic Press, San Diego.
- Bautista Celis, L. X., & Gallardo, I. R. (2008). *Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos*. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.
- Beltrán Pineda, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu*, *15*(1), 101–113.
- Berner, D. K., Schaad, N. W., & Völksch, B. (1999). Use of ethylene-producing bacteria for stimulation of *Striga* spp. seed germination. *Biological Control*, *15*(3), 274–282.
<https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0718>
- Bottini, R., Cassán, F., & Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*(5), 497–503. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1696-1>
- Bouwmeester, H. J., Roux, C., Lopez-Raez, J. A., & Bécard, G. (2007). Rhizosphere

- communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science*, 12(5), 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.03.009>
- Bowers, J. E., & Pierson, E. A. (2001). Implications of seed size for seedling survival in *Carnegiea gigantea* and *Ferocactus wislizeni* (Cactaceae). *The Southwestern Naturalist*, 272-281.
- Bregman, R., & Bouman, F. (1983). Seed germination in Cactaceae. *Botanical journal of the Linnean Society*, 86(4), 357-374.
- Bregman, R. (1988). Forms of seed dispersal in Cactaceae. *Acta Botánica Neerlandica*, 37(3), 395-402.
- Bregman, R., & Graven, P. (1997). Subcuticular secretion by cactus seeds improves germination by means of rapid uptake and distribution of water. *Annals of Botany*, 80(4), 525–531. <https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0483>
- Brencher, W., Stange, L., & Zimmer, K. (1978). Ersatz des Lichts bei der Keimung von Kakteensamen durch Gibberellinsäure / Compensation of Light for Germination of Cactus Seeds by Gibberellic Acid. *Die Gartenbauwissenschaft*, 43(2), 91–94.
- Brons, J. K., & van Elsas, J. D. (2008). Analysis of Bacterial Communities in Soil by Use of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Clone Libraries , as Influenced by Different Reverse Primers □, 74(9), 2717–2727. <https://doi.org/10.1128/AEM.02195-07>
- Cabrera Rodríguez, A. (2012). *Metales Pesados En Sedimentos Del Río Santiago Y Tanque Tenorio Y Su Efecto En El Crecimiento De Frijol Y Maíz*. Retrieved from <http://ninive.uaslp.mx/jspui/handle/i/3381>
- Carranza, C., Castellanos, G., Deaza, D., & Miranda, D. (2016). Efecto de la aplicación de reguladores de crecimiento sobre la germinación de semillas de badea (*Passiflora quadrangularis* L.) en condiciones de invernadero. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 284–291. <https://doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.5791>
- Celaya, H., & Castellanos, A. (2011). Nitrogen mineralization on arid and semi-arid land soil. *Terra Latinoamericana*, 343–356. Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/20123049100.html>
- Chao, A., Gotelli, N. J., Hsieh, T. C., Sander, E. L., Ma, K. H., Colwell, R. K., & Ellison, A. M. (2014). Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: A framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs*, 84(1), 45–67. <https://doi.org/10.1890/13-0133.1>

- Contreras-Quiroz, M.R., Pando-Moreno, M., Flores, J., Jurado, E., 2016. Effects of wetting and drying cycles on the germination of nine species of the Chihuahuan Desert. *Bot. Sci.* 94, 221-228.
- Cooke, W. B. (1959). An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 12(1), 1–45. <https://doi.org/10.1007/BF02118435>
- Cope-Selby, N., Cookson, A., Squance, M., Donnison, I., Flavell, R., & Farrar, K. (2017). Endophytic bacteria in *Miscanthus* seed: implications for germination, vertical inheritance of endophytes, plant evolution and breeding. *GCB Bioenergy*, 9(1), 57–77. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12364>
- Corrales Ramírez, L. C., Arévalo Galvez, Z. Y., & Moreno Burbano, V. E. (2014). Solubilización de fosfatos : una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova*, 12(21), 67–79.
- Criollo, P. J., Obando, M., Sánchez M, L., & Bonilla, R. (2012). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 189–195. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-87062012000200009&lng=en&nrm=iso
- Debeaujon, I. M. K. (2000). Gibberellin Requirement for *Arabidopsis* Seed Germination Is Determined Both by Testa Characteristics and Embryonic Abscisic Acid. *Plant Physiology*, 122(2), 415–424. <https://doi.org/10.1104/pp.122.2.415>
- Delgado-Sánchez, P., Ortega-Amaro, M. A., Jiménez-Bremont, J. F., & Flores, J. (2011). Are fungi important for breaking seed dormancy in desert species? Experimental evidence in *Opuntia streptacantha* (Cactaceae). *Plant Biology*, 13(1), 154–159. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00333.x>
- Deno, N.C., 1994. The critical role of gibberellins in germination and survival of certain cacti. *Cact. Succ. J. (US)* 66, 28–30.
- Díaz Herrera, S., Grossi, C., Zawoznik, M., & Groppa, M. D. (2016). Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiological Research*, 186–187, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.03.002>
- Díaz Vargas, P.; Ferrera Cerrato, R.; Alvarez Suarez, J.J.; Alcantar Gonzalez, G. (2001). Inoculation of Plant Growth-promoting Bacteria in Lettuce. *Terra Latinoamericana*,

19(004), 327–335.

- Dicht, R., Lüthy, A., 2005. *Coryphantha*: Cacti of Mexico and southern USA. Springer-Verlag, Berlin.
- Elmer, W. H. (2001). Seeds as vehicles for pathogen importation. *Biological Invasions*, 3(3), 263–271. <https://doi.org/10.1023/A:1015217308477>
- Esser, K. (2004). *The mycota: A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. (D. McLaughlin & J. W. Spatafora, Eds.) (2 da). Berlin.
- Etesami, H., & Alikhani, H. A. (2016). Suppression of the fungal pathogen *Magnaporthe grisea* by *Stenotrophomonas maltophilia*, a seed-borne rice (*Oryza sativa* L.) endophytic bacterium. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62(9), 1271–1284.
- Flores, J., Jurado, E., Arredondo, A., 2006. Effect of light on germination of seeds of Cactaceae from the Chihuahuan Desert, Mexico. *Seed Sci. Res.* 16, 149–155.
- Flores, J., Jurado, E., Jiménez-Bremont, J.F., 2008. Breaking seed dormancy in specially protected *Turbincarpus lophophoroides* and *Turbincarpus pseudopectinatus* (Cactaceae). *Plant Spec. Biol.* 23, 43–46.
- Flores, J., & Jurado, E. (2011). Germinación De Especies De Cactáceas En Categoría De Riesgo Del Desierto Chihuahuense. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 2(8), 59–70. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v2i8.539>
- Flores, J., Jurado, E., Chapa-Vargas, L., Ceroni-Stuva, A., Dávila-Aranda, P., Galíndez, G., Gurvich, D., León-Lobos, P., Ordóñez, C., Ortega-Baes, P., Ramírez-Bullón, N., Sandoval, A., Seal, C.E., Ullian, T., Pritchard, H.W., 2011. Seeds photoblastism and its relationship with some plant traits in 136 cacti taxa. *Environ. Exp. Bot.* 71, 79–88.
- Flores, J., González-Salvatierra, C., Jurado, E., 2016. Effect of light on seed germination and seedling shape of succulent species from Mexico. *J. Plant Ecol.* 9, 174–179.
- Flores, G. J. A., & Macías, C. G. V. (2008). Importancia de las cactáceas como recurso natural en el noreste de México. *CIENCIA-UANL*, 11(1), 1.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Goettsch, B., Hilton-Taylor, C., Cruz-Piñón, G., Duffy, J.P., Frances, A., Hernández, H.M., ..., Gaston, K.J., 2015. High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nat. Plants* 1, 15142.
- Gómez-Merino, F. C., Vidal-Morales, B., Trejo-Téllez, L. I., & Silva, C. (2010). Escarificación y germinación in vitro de semillas de heliconias. *Universidad y ciencia*, 26(3), 293-297.

- González Medrano, F. (2012). *Las zonas áridas y semiáridas de México y su vegetación*. (I. N. de Ecología, Ed.). México, D.F.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L. L., & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, *5*(4), 355–377. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0241-x>
- Hanshew, A. S., Mason, C. J., Raffa, K. F., & Currie, C. R. (2013). Minimization of chloroplast contamination in 16S rRNA gene pyrosequencing of insect herbivore bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods*, *95*(2), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.007>
- Hardoim, Pablo R., Hardoim, C. C. P., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2012). Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. *PLoS ONE*, *7*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030438>
- Hardoim, Pablo Rodrigo, Andreote, F. D., Reinhold-hurek, B., Sessitsch, A., Overbeek, L. S. Van, & Elsas, J. D. Van. (2011). Rice root-associated bacteria – insights in community structures across ten cultivars, *77*(1), 154–164. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01092.x>.Rice
- Harris, W. (1983). On the Development of Macrosclereids in Seed Coats of *Pisum sativum* L. *American Journal of Botany*, *70*(10), 1528–1535. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2443351>
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology*, *60*(4), 579–598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- Huang, Y., Kuang, Z., Wang, W., & Cao, L. (2016). Exploring potential bacterial and fungal biocontrol agents transmitted from seeds to sprouts of wheat. *Biological Control*, *98*, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.013>
- Hung, R., & Lee Rutgers, S. (2016). *Applications of Aspergillus in Plant Growth Promotion. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00018-X>
- Hunt, D., 2006. *The New Cactus Lexicon: Descriptions and Illustrations of the Cactus Family*. DH Books, Milborne Port, England.
- Johnston-Monje, D., & Raizada, M. N. (2011). Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS ONE*, *6*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020396>

- Khan, A. L., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., & Lee, I. (2013). Endophytic fungi : resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(1), 1–13. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.800018>
- Khidir, H. H., Eudy, D. M., Porrás-Alfaro, A., Herrera, J., Natvig, D. O., & Sinsabaugh, R. L. (2010). A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. *Journal of Arid Environments*, 74(1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.07.014>
- Kim, W. Y., Park, S. G., & Park, H. K. (2017). *U.S. Patent No. 9,801,920*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Kirkpatrick, B. L., & Bazzas, F. A. (1979). Influence of Certain Fungi on Seed Germination and Seedling Survival of Four Colonizing Annuals. *Journal of Applied Ecology*, 16(2), 515–527.
- Klaedtke, S., Jacques, M., Raggi, L., Prévieux, A., Bonneau, S., Negri, V., ... Barret, M. (2016). Terroir is a key driver of seed-associated microbial assemblages. *Environmental Microbiology*, 18(6), 1792–1804. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12977>
- Kucera, B., Cohn, M.A., Leubner-Metzger, G., 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15, 281–307.
- Kumar Verma, S., & Francis White, J. (2019). *Seed Endophytes Biology and Biotechnology*. *Seed Endophytes*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4>
- Kutschker, A. M., Hechem, M. V., Codesal, P., Rafael, M., López, S. N., & Silva, P. V. (2015). Diversidad de plantas exóticas en áreas sometidas a distintos disturbios en el Parque Nacional Los Alerces, Chubut (Argentina).
- Khurana, E., Singh, J.S., 2001. Ecology of seed and seedling growth for conservation and restoration of tropical dry forest: a review. *Environ. Conserv.* 28, 39–52.
- Lateur, A., 2002. *Las semillas y los frutos*. *Palma de Mallorca*. Disponible en el URL: <http://www.sinix.net/paginas/>
- Lima, A.T., Meiado, M.V. 2017. Discontinuous hydration alters seed germination under stress of two populations of cactus that occur in different ecosystems in Northeast Brazil. *Seed Sci. Res.* 27, 292–302.
- Links, M. G., Demeke, T., Grafenhan, T., Hill, J. E., Hemmingsen, S. M., & Dumonceaux, T. J. (2014). Simultaneous profiling of seed-associated bacteria and fungi reveals antagonistic interactions between microorganisms within a shared epiphytic microbiome on Triticum and Brassica seeds. *New Phytologist*, 202, 542–553.

<https://doi.org/10.1111/nph.12693>

- Lopez, B. R., Tinoco-Ojanguren, C., Bacilio, M., Mendoza, A., & Bashan, Y. (2012). Endophytic bacteria of the rock-dwelling cactus *Mammillaria fraileana* affect plant growth and mobilization of elements from rocks. *Environmental and Experimental Botany*, 81, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.02.014>
- Loredo-Osti, C., López-Reyes, L., & Espinosa-Victoria, D. (2004). Bacterias Promotoras Del Crecimiento Vegetal Asociadas Con Gramíneas: Una Revisión. *Terra Latinoamericana*, 22(2), 225–239.
- Loza-Cornejo, S., Terrazas, T., López-Mata, L., 2012. Fruits, seeds and germination in five species of globose Cactaceae (Cactaceae). *Interciencia* 37, 197-203.
- Maiti, R. K., J. L. Hernández-Piñero and M. Valdés-Marroquín. 1994. Seed ultrastructure and germination of some species of Cactaceae. *Phyton - International Journal of Experimental Botany* 55: 97-105.
- Mano, H., Tanaka, F., Nakamura, C., Kaga, H., & Morisaki, H. (2006). Culturable Endophytic Bacterial Flora of the Maturing Leaves and Roots of Rice Plants (*Oryza sativa*) Cultivated in a Paddy Field. *Microbes and Environments*, 22(2), 175–185. <https://doi.org/10.1264/jsme2.22.175>
- Marques, F.R.F., Meiado, M.V., Castro, N.M.C.R., Campos, M.L.O., Mendes, K.R., Santos, O.O., Pompelli, M.F., 2015. GerminaQuant: a new tool for germination measurements. *J. Seed Sci.* 37, 248-255.
- McDonough, W.T., 1964. Germination responses of *Carnegieia gigantea* and *Lemaireocereus thurberi*. *Ecology* 45, 155–159.
- Miransari, M., Smith, D.L., 2014. Plant hormones and seed germination. *Environ. Exp. Bot.* 99, 110–121.
- Muria-gonzalez, M. J., Chooi, Y., Breen, S., & Solomon, P. S. (2015). The past , present and future of secondary metabolite research in the Dothideomycetes. *Molecular Plant Pathology*, 16(1), 92–107. <https://doi.org/10.1111/mpp.12162>
- Naveed, M., Mitter, B., Reichenauer, T. G., Wieczorek, K., & Sessitsch, A. (2014). Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by Burkholderia phytofirmans PsJN and Enterobacter sp. FD17. *Environmental and Experimental Botany*, 97, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.014>
- Nelson, E. B. (2017). The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil*, 1–28. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3289-7>

- Nobel, P.S., 1988. *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. Cambridge University Press, New York.
- Ochoa, M. J., González-Flores, L. M., Cruz-Rubio, J. M., Portillo, L., & Gómez-Leyva, J. F. (2015). Effect of substrate and gibberellic acid (GA3) on seed germination in ten cultivars of *Opuntia* spp. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 17(September 2015), 50–60.
- Okunishi, S., Sako, K., Mano, H., Imamura, A., & Morisaki, H. (2005). Bacterial Flora of Endophytes in the Maturing Seed of Cultivated Rice (*Oryza sativa*). *Microbes and Environments*, 20(3), 168–177. <https://doi.org/10.1264/jsme2.20.168>
- Orozco-Segovia, A., Márquez-Guzmán, J., Sánchez-Coronado, M. E., Gamboa De Buen, A., Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2007). Seed anatomy and water uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). *Annals of Botany*, 99(4), 581–592. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm001>
- Ortega-Baes, P., & Rojas-Aréchiga, M. (2007). Seed germination of *Trichocereus terscheckii* (Cactaceae): Light, temperature and gibberellic acid effects. *Journal of Arid Environments*, 69(1), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.09.009>
- Ortega-Baes P. et al. (2010) Diversity and Conservation in the Cactus Family. In: Ramawat K. (eds) *Desert Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg
- Pontón, J., Moragues, M., Gené, J., Guarro, J., & Quindós, G. (2002). *Aureobasidium Pullulans* (de Bary) Arnaud. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6247-8_900
- Porrás-Alfaro, A., & Bayman, P. (2011). Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 291–315. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081831>
- Powell, J. T., Chatziefthimiou, A. D., Banack, S. A., Cox, P. A., & Metcalf, J. S. (2013). Desert crust microorganisms, their environment, and human health. *Journal of Arid Environments*, 112, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2013.11.004>
- Puente, M. E., Bashan, Y., Li, C. Y., & Lebsky, V. K. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology*, 6(5), 629–642. <https://doi.org/10.1055/s-2004-821100>
- Puente, M. Esther, Li, C. Y., & Bashan, Y. (2009a). Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.04.007>

- Puente, M. Esther, Li, C. Y., & Bashan, Y. (2009b). Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environmental and Experimental Botany*, 66, 389–401. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.04.010>
- Puente, M. Esther, Li, C. Y., & Bashan, Y. (2009c). Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 389–401. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.04.010>
- Ranal, M.A., Santana, D.G.D., Ferreira, W.R., Mendes-Rodrigues, C., 2009. Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. *Braz. J. Bot.* 32, 849–855.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5), 319–339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)
- Rojas-Aréchiga, M., Orozco-Segovia, A., & Vázquez-Yanes, C. (1997). Effect of light on germination of seven species of cacti from the Zapotitlán Valley in Puebla, México. *Journal of Arid Environments*, 36(4), 571–578. <https://doi.org/10.1006/jare.1996.0218>
- Rojas-Aréchiga, M., & Vázquez-Yanes, C. (2000). Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments*, 44, 85–104. <https://doi.org/10.1006/jare.1999.0582>
- Rojas-Aréchiga, Mariana, Ma. Aguilar, K., Golubov, J., & Mandujano, M. C. (2011). Effect of Gibberellic Acid on Germination of Seeds of Five Species of Cacti From the Chihuahuan Desert, Northern Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 56(3), 393–400. <https://doi.org/10.1894/N01-DW-126.1>
- Rojas, E. C., Sapkota, R., Jensen, B., Jørgensen, H. J. L., Henriksson, T., Jørgensen, L. N., ... Collinge, D. B. (2019). Fusarium head blight modifies fungal endophytic communities during infection of wheat spikes Title. *Microbial Ecology*, Submitted.
- Sánchez-Salas, J., Flores, J., Muro-Peréz, G., Arias-Montes, S., & Jurado, E. (2015). Morfometría de semillas en la cactácea amenazada de extinción *Astrophytum myriostigma lemaire*. *Polibotánica*, 39, 119–131.
- Sánchez-Venegas, G., 1997. Germinación, viabilidad y características distintivas de la semilla de *Opuntia joconostle* Weber, forma cuaresmero. *Cact. Suc. Mex.* 62, 16–21.
- Seo, M., Nambara, E., Choi, G., & Yamaguchi, S. (2009). Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 463–472. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9429-y>

- Sánchez-Venegas, G., 1997. Germinación, viabilidad y características distintivas de la semilla de *Opuntia joconostle* Weber, forma cuaresmero. *Cact. Suc. Mex.* 62, 16–21.
- Shahzad, R., Khan, A. L., Bilal, S., Asaf, S., & Lee, I. (2018). What Is There in Seeds? Vertically Transmitted Endophytic Resources for Sustainable Improvement in Plant Growth. *Frontiers in Plant Science*, 9(January), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00024>
- Stefani, F. O. P., Bell, T. H., Marchand, C., E. de la Providencia, I., Yassimi, A. El, St-arnaud, M., & Hijri, M. (2015). Culture-Dependent and -Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon- Contaminated Soils. *PLoS ONE*, 10(6), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128272>
- Suárez, D., & Melgarejo, L. (2010). Biología y germinación de semillas. In *Experimentos en fisiología vegetal* (pp. 13–249).
- Suárez, L., Álvarez, A., & Ramírez, R. (2012). Revisión bibliográfica Apuntes sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico. *Cultivos Tropicales*, 33(3), 47–56.
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X., & Song, W. (2008). Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microbial Ecology*, 55(3), 415–424. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9287-1>
- Sun, Y., Tan, D. Y., Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2012). Role of mucilage in seed dispersal and germination of the annual ephemeral *Alyssum minus* (Brassicaceae). *Australian Journal of Botany*, 60(5), 439–449. <https://doi.org/10.1071/BT11314>
- Tarango Arámbula, L. A. (2005). Problemática Y Alternativas De Desarrollo De Las Zonas Áridas Y Semiáridas De México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/4555/455545052003.pdf>
- Taulé, C., Mareque, C., Barlocco, C., Hackembruch, F., Reis, V. M., Sicardi, M., & Battistoni, F. (2012). The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant Soil*, 356, 35–49. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1023-4>
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., & Vangronsveld, J. (2015). Bacterial seed endophytes: Genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*, 7(1), 40–50. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12181>
- Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2006). Microbial

- producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 117–126. <https://doi.org/10.1134/S0003683806020013>
- Usuki, F., & Narisawa, K. (2007). A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage. *Mycologia*, 99(2), 175–184. <https://doi.org/10.3852/mycologia.99.2.175>
- Van Den Heuvel, J. (1969). Effects of *Aureobasidium pullulans* on numbers of lesions on dwarf bean leaves caused by *Alternaria zinniae*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 75, 300–307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02015492>
- Verma, S. K., & White, J. F. (2018). Indigenous endophytic seed bacteria promote seedling development and defend against fungal disease in browntop millet (*Urochloa ramosa* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 764–778. <https://doi.org/10.1111/jam.13673>
- Vinale, F., Nicoletti, R., Lacatena, F., Marra, R., Sacco, A., Lombardi, N., ... Woo, S. L. (2017). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Talaromyces pinophilus*. *Natural Product Research*, 31(15), 1778–1785. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1290624>
- Vujanovic, V., & Germida, J. J. (2017). Seed endosymbiosis : a vital relationship in providing prenatal care to plants. *Canadian Journal of Plant Science*, 97, 972–981.
- Wang, E. L. H., & Bergeson, G. B. (1974). Biochemical Changes in Root Exudate and Xylem Sap of Tomato Plants Infected with *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 6(4), 194–202.
- weatherpark. (2019). Clima promedio en Girón, Colombia, durante todo el año - Weather Spark. 2019. <https://doi.org/Cada ser humano tiene una concepción distinta de lo que son los valores morales, lo que, para algunos es moral para otros puede ser inmoral>
- Western, T. L. (2012). The sticky tale of seed coat mucilages: production, genetics, and role in seed germination and dispersal. *Seed Science Research*, 22(01), 1–25. <https://doi.org/10.1017/S0960258511000249>
- Yang, X., Baskin, J. M., Baskin, C. C., & Huang, Z. (2012). More than just a coating: Ecological importance, taxonomic occurrence and phylogenetic relationships of seed coat mucilage. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 14(6), 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2012.09.002>
- Zhang, X., Lin, L., Chen, M., Zhu, Z., Yang, W., Chen, B., ... An, Q. (2012). A nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain enhances phytoextraction of heavy metals by the

hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. *Journal of Hazardous Materials*, 229–230, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.06.013>

Zimmer, K., Büttner, P., 1982. Ersatz des Lichtbedürfnisses bei der Keimung von Kakteensamen durch Gibberellinsäure. *Gartenbauwissenschaft* 47, 97–101.