



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

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

***Caracterización del vigor de las semillas de diferentes
especies del género Amaranthus***

Tesis que presenta

Alberto Antonio Lomelí Bernal

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Dr. Alfredo Heriberto Herrera Estrella

San Luis Potosí, S.L.P., julio del 2022



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Caracterización del vigor de las semillas de diferentes especies del género *Amaranthus*” presentada para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Alberto Antonio Lomeli Bernal y aprobada el 27 del junio del 2022 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Codirectora de la tesis

Dr. Alfredo Heriberto Herrera Estrella
Codirector de la tesis

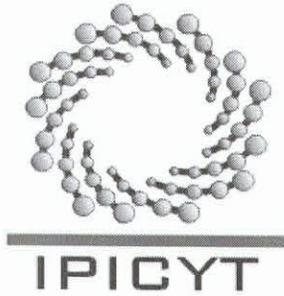
Dr. Antonio De León Rodríguez
Asesor



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa y la Dr. Alfredo Heriberto Herrera Estrella.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 1080042) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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

Acta de Examen de Grado

La Secretaría Académica del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 234 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 11 días del mes de julio del año 2022, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Antonio De León Rodríguez	Presidente	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Secretaria	IPICYT
Dr. Alfredo Heriberto Herrera Estrella	Sinodal externo	CINVESTAV

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Alberto Antonio Lomelí Bernal

sobre la Tesis intitulada:

*Caracterización del vigor de las semillas de diferentes especies del género **Amaranthus***

que se desarrolló bajo la codirección de

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Dr. Alfredo Heriberto Herrera Estrella (CINVESTAV)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 18:09 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe la Secretaria Académica 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 11 días del mes de julio de 2022.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Secretaria Académica



Agradecimientos

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Alfredo Heriberto Herrera Estrella por sus comentarios y orientación en el proyecto.

Al Dr. Antonio De León Rodríguez por permitirme usar sus equipos y por sus comentarios y aportaciones.

A los técnicos, el M. C. Alberto Barrera Pacheco y el Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández por su asesoría y orientación en el laboratorio.

A todos mis compañeros del laboratorio 2, por sus consejos, orientación y apoyo.

A todos los profesores y el personal del IPICYT por otorgarme una buena experiencia y muchas enseñanzas a lo largo de la maestría.

Al CONACYT y al IPICYT por la beca otorgada.

A mis amigos, Oscar Romo, Juan José Almanza, Raquel Castorena y Jesús Barrera por su apoyo y compañía.

A mis padres y a mi hermano por todo su apoyo emocional y económico.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	i
Créditos institucionales	ii
Acta de examen de grado	iii
Agradecimientos	iv
Lista de Figuras	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
Introducción	1
Las semillas y el vigor	1
RFOs y vigor	3
miRNAs y vigor	4
Endófitos de semilla y vigor	6
Las semillas de amaranto	7
Objetivos	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Materiales y métodos	10
Material vegetal	10
Envejecimiento Acelerado (EA)	10
Extracción, identificación y cuantificación de azúcares de semillas de amaranto	10
Germinación de semillas	11
Análisis estadístico	11
Resultados	12
Contenido de azúcares de las tres especies de del género <i>Amaranthus</i>	12
Perfil de azúcares en semillas de amaranto después del tratamiento de EA	13
Porcentaje de germinación de las semillas de amaranto	14
Discusión	17
<i>A. hypochondriacus</i> es la especie que mostró mayor tolerancia al EA	17
Conclusiones	20
Perspectivas	20
Endófitos de semilla	22
8. Referencias	25
Anexo 1 Curvas de concentración de los azúcares stock	31

Lista de Figuras

Fig. 1. Biosíntesis de los RFOs	3
Fig. 2. Biogénesis de los miRNAs	5
Fig. 3. Transmisión de los endófitos	8
Fig. 4. Azúcares de diferentes especies del género <i>Amaranthus</i>	12
Fig. 5. Relación Sacarosa/RFOs totales	13
Fig. 6. Azúcares en semillas de amaranto antes y después de EA	15
Fig. 7. Porcentaje de germinación a diferentes tiempos de EA	16
Fig. 8. Obtención de embriones de semilla de <i>A. hypochondriacus</i>	21
Fig.10. Aislamiento de microorganismos endófitos de <i>A. cruentus</i>	23

Resumen

Caracterización del vigor de las semillas de diferentes especies del género *Amaranthus*

El vigor de las semillas determina su potencial para crecer rápida y uniformemente bajo múltiples condiciones ambientales por lo que se considera como un indicador de su calidad. Para el estudio de vigor de semillas se ha desarrollado el método de envejecimiento acelerado (EA), el cual consiste en exponerlas a temperaturas y humedades relativas (HR) altas causando así una pérdida en el vigor. Un marcador del vigor que ha tomado gran relevancia es la concentración de azúcares de la familia de oligosacáridos de la rafinosa (RFOs). Otros factores relacionados con el vigor son los miRNAs y los endófitos de las semillas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el vigor de las semillas de amaranto para lo cual se compararon las especies cultivables *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* y la especie silvestre *A. hybridus*. Las concentraciones de los RFOs y otros azúcares importantes fueron cuantificados y el vigor fue medido como el porcentaje de germinación de las semillas control y semillas expuestas a EA. Los resultados mostraron que las semillas de *A. hypochondriacus* fueron las que presentaron el mayor vigor y las que contenían mayor concentración de glucosa y glicerol así como una relación alta de sacaros/RFOs totales; mientras que las semillas de *A. cruentus* fueron las que presentaron la mayor concentración de galactinol y rafinosa pero mostraron el menor vigor. Los datos mostraron que las semillas con vigor alto tienden a utilizar las reservas de carbohidratos para mantener viva a la semilla.

Palabras clave: *Amaranthus*, endófitos, miRNAs, RFOs, semillas, vigor

Abstract

Characterization of the vigor of seeds from different species of the genus *Amaranthus*

Seeds vigor determines their potential to grow rapidly and uniformly under several environmental conditions and is considered as an indicator of its quality. For the study of seed vigor, the accelerated aging (AA) method has been developed, which consists of exposing the seeds to high temperatures and relative humidity (RH), thus causing a loss in vigor. A vigor marker that has taken on great relevance is the concentration of sugars from the raffinose oligosaccharide family (RFOs). Other factors related to vigor are miRNAs and seed endophytes. The objective of this study was to evaluate the vigor of amaranth seeds, for which the cultivable species *A. hypochondriacus* and *A. cruentus* species, and the wild *A. hybridus* species were analyzed. RFOs and other important sugars in seeds were quantified and compared when they were subjected to AA treatment. Vigor was determined as percentage of seed germination. Results showed that *A. hypochondriacus* was the seed with the highest vigor and the one that contained the highest concentration of glucose and glycerol, as well as a high ratio of sucrose/total RFOs; while *A. cruentus*, which presented the highest concentration of galactinol and raffinose, showed the lowest vigor. Results showed that seeds with high vigor tend to use carbohydrate reserves during germination.

Keywords: *Amaranthus*, Endophytes, miRNAs, RFOs, Seed, vigor

Introducción

Las semillas y el vigor

Las semillas son el método de reproducción sexual más complejo y exitoso en plantas vasculares. Las plantas con semilla (*Spermatophyta*) comprende dos grupos principales: las *Acrogymnospermae* (gymnospermas; especies vivas c. 800) y las *Angiospermae* (angiospermas; especies vivas c. 250,000) (Cantino et al. 2007; Linkies et al. 2010). Su éxito fue tan grande que incluso Darwin describió su rápida diversificación durante el cretácico como un “un misterio abominable” (Linkies et al. 2010). Hace unos 10,000 años, los seres humanos aprendieron a domesticar diversas especies vegetales con el objetivo de satisfacer la demanda alimenticia de cada vez más seres vivos, dando inicio a la era del desarrollo de civilizaciones cada vez más complejas (Thor 2015). Hoy en día las semillas son la base de nuestra alimentación y de una gran parte de la economía mundial (Kozlowski y Gunn 1972).

Debido al cambio climático se han registrado incrementos de los periodos de sequía, de temperaturas altas, suelos salinos y de periodos climáticos anormales. Estos cambios ponen en riesgo la producción y la calidad de los alimentos. Los cambios climáticos han ocasionado erosión de suelos y a su vez la extinción de algunas especies (Kijak y Ratajczak 2020). El aumento en la población mundial junto con los cambios climáticos, llevan a una mayor demanda de los alimentos lo que a su vez incrementa los costos de la agricultura, lo cual representa un desafío para la seguridad alimentaria mundial. Una de las estrategias propuestas para mitigar la disminuida producción de alimentos por el cambio climático es la introducción de más variedad de cultivos, especialmente el uso de cultivos resistentes a sequías y a temperaturas extremas para asegurar que podrán sobrellevar las nuevas condiciones climáticas (Alemayehu et al. 2015).

Por otro lado, las semillas también han evolucionado para sobrellevar las condiciones de estrés y poder colonizar nuevos nichos. Para ello, han desarrollado una serie de mecanismos moleculares como son: el apagado metabólico, el sistema

antioxidante, la cubierta de la semilla y la acumulación de proteínas abundantes de la embriogénesis tardía conocidas como LEAs (Kijak y Ratajczak 2020).

Un aspecto importante de la calidad de las semillas es el vigor que se define como las propiedades de las semillas que determinan el potencial para una emergencia rápida, uniforme y un desarrollo normal de las plántulas bajo una amplia variedad de condiciones (AOSA, 1929). El vigor de las semillas es una propiedad compleja que cambia su potencial dependiendo de las condiciones ambientales. Las semillas con vigor alto son aquellas que tienen la capacidad de conservar su potencial fisiológico y genético que asegure la germinación y el crecimiento de plántulas saludables (Rajjou et al. 2012). Como el vigor es un indicador de la calidad de la semilla, varios estudios se han enfocado en describir los mecanismos moleculares implicados en un mayor o menor vigor (de Los Reyes et al. 2003; Catusse et al. 2011; Xin et al. 2011).

Para el estudio de vigor de semillas se ha desarrollado el método de envejecimiento acelerado (EA), el cual consiste en exponerlas a temperaturas y humedades relativas (HR) altas causando así una pérdida en el vigor (González et al. 2014). El EA es una metodología ampliamente utilizada ya que permite exponer a las semillas a condiciones no óptimas, deteriorando la capacidad germinativa con mayor rapidez. Las semillas con un vigor pobre pierden su capacidad de germinación mientras que las semillas con un vigor alto tienden a mantener la capacidad germinativa por más tiempo (Fenollosa et al. 2020).

El vigor se forma gradualmente durante el desarrollo de la semilla hasta alcanzar su punto más alto en la maduración fisiológica. Sin embargo, empieza a decaer mediante procesos de envejecimiento naturales durante el periodo de almacenamiento o dormancia hasta la germinación. Algunos de los mecanismos de control de los procesos celulares relacionados con un vigor alto que ha tomado relevancia en los últimos años es la red de interacciones de los microRNAs (miRNAs), los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOs) y las bacterias endófitas de semilla (Muzquiz et al. 1999; Nishizawa et al. 2008; Gong et al. 2015; Huang et al. 2020; Zhou et al. 2020; Pal et al. 2022).

RFOs y vigor

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (Raffinose Family Oligosaccharides o RFOs), son α -galactósidos derivados de la sacarosa que se acumulan en las semillas como carbohidratos de almacenamiento y están ampliamente distribuidos en plantas superiores (Muzquiz et al. 1999; Arunraj et al. 2020). Una de las funciones de los RFOs es proveer una fuente de energía para la germinación, pero también son necesarios para la maduración de la semilla y establecer la tolerancia a la desecación (Arunraj et al. 2020). La ruta de síntesis de los RFOs inicia con la síntesis de galactinol (1-O- α -D-galactopiranosil-L mioinositol) que sirve como donante de galactosilo y proporciona galactosa a la sacarosa para la síntesis de rafinosa (Figura 1).

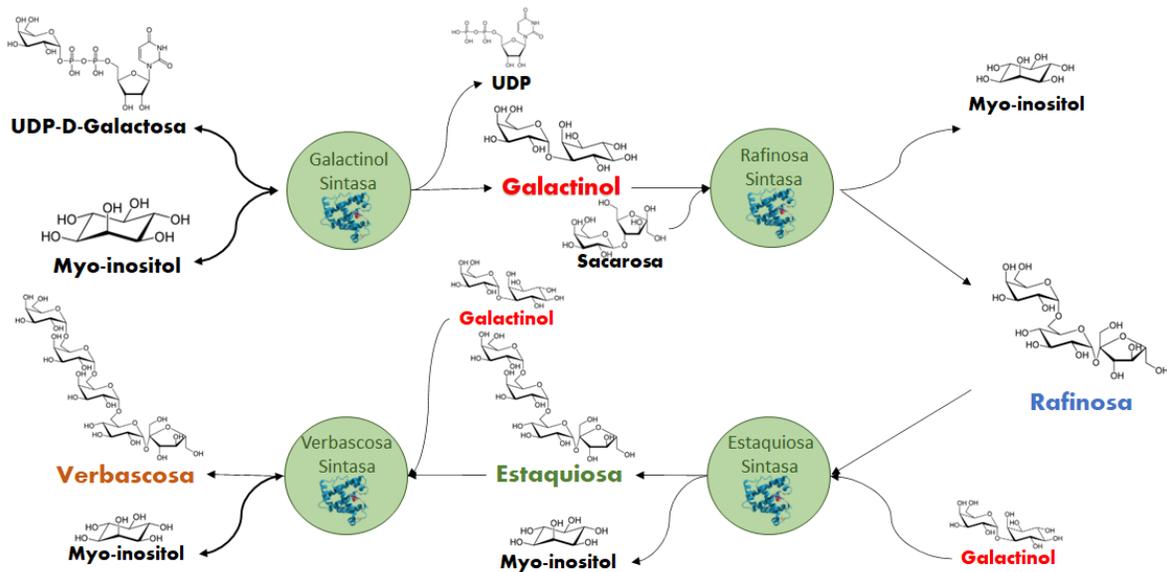


Fig. 1. Biosíntesis de los RFOs. La ruta de biosíntesis de los RFOs empieza con la síntesis de galactinol a partir de UDP-D-galactosa y mio-inositol por la Galactinol Sintasa (GoS). Posteriormente el galactinol proporciona galactosa a la sacarosa para la síntesis de rafinosa por la Rafinosa Sintasa (RS). De allí se genera estaquirosa en la Estaquirosa Sintasa (StS) con rafinosa y galactinol. Por último, a la estaquirosa se le agrega otra galactosa para generar verbascosa por la Verbascosa Sintasa (VbS). Modificado de Arunraj et al. (2020); Muzquiz et al. (1999).

Se ha propuesto que la acumulación de RFOs en la maduración de las semillas sirve para ralentizar el metabolismo de las células limitando la habilidad de las

moléculas de moverse libremente por el citoplasma. Esto se logra debido a que por la acumulación de RFOs el citoplasma pasa a un estado “vidrioso” reemplazando los enlaces de hidrógeno requeridos para mantener la conformación de las proteínas y de la membrana plasmática (Kijak y Ratajczak 2020).

Los RFOs se han propuesto como marcadores del vigor. En este sentido, Li et al. (2017) interrumpieron los genes de la rafinosa sintasa en *Zea mays* obteniendo una expresión menor de estas enzimas y una disminución de la concentración de RFOs. Como resultado las semillas presentaron una disminución del vigor, perdiendo la capacidad germinativa después del tratamiento de EA con mayor facilidad comparando con semillas silvestres. En otro estudio en garbanzo (*Cicer arietinum*), se identificó y se caracterizó a la galactinol sintasa, enzima que cataliza la primera reacción de la biosíntesis de RFOs. Con líneas sobre expresantes de esta enzima en *Arabidopsis thaliana* se pudo comprobar la acumulación de RFOs y esto dio como resultado que las semillas fueran resistentes al tratamiento de EA, por lo tanto, un mayor vigor (Nishizawa et al. 2008). Además, se ha observado que entre más galactinol tiene una semilla mayor longevidad de esta (de Souza Vidigal et al. 2016).

miRNAs y vigor

Los miRNAs son una clase de RNAs pequeños no codificantes (smRNAs), típicamente de 21- 24 nt, que reducen la expresión de un gen diana debido a la unión específica o semi-específica a un mRNA (Bartel 2009). Los miRNAs son transcritos de un gen MIR por la RNA polimerasa II (Pri-miRNA). Este transcrito primario se pliega en un lazo de tallo imperfecto (horquilla pre-miRNA). El pre-miRNA se reconoce y se procesa por un complejo proteínico que contiene una DCL1-like RNasa y proteínas HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) y SERRATE (SE) dejando un smRNA que consiste en el miRNA y otro miRNA complementario. El miRNA maduro (típicamente de 20-21 nt) es incorporado a proteínas Argonauta (ARGONAUTE AGO) que luego se une al complejo silenciador inducido por RNA (RNA Induced Silencing Complex RISC) para regular a él o los genes diana en trans por un mecanismo de complementación de bases (Figura 2). En plantas, la unión

de un miRNA a su gen diana desencadena la degradación del mRNA y la represión traduccional (Brodersen et al. 2008; Curaba et al. 2012; Dhaka and Sharma 2021).

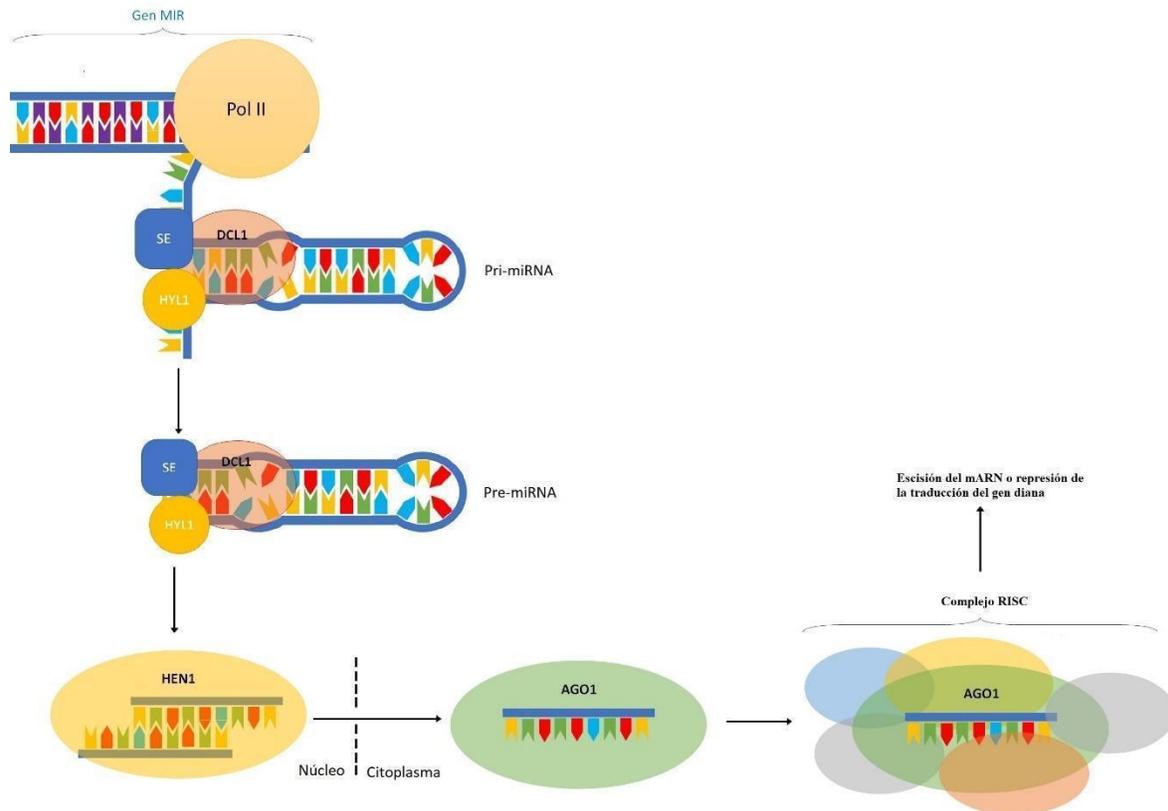


Fig. 2. Biogénesis de los miRNAs. La biogénesis empieza cuando los miRNAs se transcriben de un gen MIR por la RNA polimerasa II (Pol II). El transcrito primario que se pliega en un lazo de tallo imperfecto (horquilla pre-miRNA). El pre-miRNA es reconocido y procesado por un complejo proteínico que contiene una DCL1-like RNasa (DCL1), proteínas HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) y SERRATE (SE) dejando un smRNA que consiste en el miRNA y otro miRNA complementario. Dejando el núcleo con ayuda de HEN1. En el citoplasma, el miRNA inmaduro es incorporado a la proteína Argonauta 1 (ARGONAUTE 1 AGO1). AGO1 tiene un dominio PAZ para la unión de RNA de una sola hebra y un dominio RNaseH-like PIWI que cataliza la escisión o la represión traduccional del mRNA. AGO1 luego se une al complejo silenciador inducido por RNA (RNA Induce Silencing Complex RISC) para regular a él o los genes diana. Modificado de Brodersen et al., 2008; Curaba et al., 2012; Dhaka and Sharma, 2021.

El desarrollo de las semillas está altamente regulado por los miRNAs y sus transcritos diana. Semillas mutantes de *A. thaliana* a las que les faltan componentes

esenciales de la biogénesis, procesamiento y/o función de los miRNAs presentan defectos en el desarrollo (Martin et al. 2012). En *Oryza sativa* se identificaron varios miRNAs importantes en la regulación del vigor de las semillas tales como miR164c y miR168a (Zhou et al. 2020), los cuales tienen el efecto contrario sobre el vigor de las semillas. Empleando RNA de interferencia (RNAi) se obtuvieron líneas transgénicas donde se silenció la expresión de miR164 y miR168 y fueron denominadas MIM164c y MIM168a, respectivamente. Por otra parte, se obtuvieron líneas sobre-expresantes de osa-miR164c y osa-miR168a denominadas OE164c y OE168a. El porcentaje de germinación después del tratamiento de EA y de 8 meses de envejecimiento natural de semillas transgénicas fue menor en OE164c y MIM168a, en cambio fue mayor en OE168a y MIM164c comparando contra el control. Por lo tanto, se concluyó que la sobreexpresión de miR168a y la represión de miR164c conduce a un aumento del vigor de las semillas (Zhou et al. 2020).

Endófitos de semilla y vigor

Las plantas están habitadas por comunidades de microorganismos que le otorgan beneficios. Recientemente las interacciones entre la planta y las comunidades de microorganismos han tomado relevancia como factores importantes para mantener las funciones de una planta sana, su crecimiento y protección contra patógenos (Aglar et al. 2016; Durán et al. 2018). En la naturaleza, las plantas están expuestas a diversos microorganismos que pueden ser benéficos y colonizan la rizosfera, el rizoplasma, la endosfera y la filósfera, por ello es que son considerados como un genoma secundario de la planta (Kumar y Dubey 2020). Los endófitos se definen como microorganismos no patógenos que pueden crecer dentro de la planta sin causar ningún daño. La relación planta-endófito evolucionó hace unos 60 millones de años y tuvo un papel importante en la colonización de la tierra por las plantas (Dubey et al. 2019, 2020; Tyc et al. 2020; Kumar and Dubey 2020). Los endófitos se pueden transmitir de la planta madre a las semillas (transmisión vertical) pero también del ambiente pueden obtener algunas bacterias (transmisión horizontal) (Figura 3). Siendo la transición vertical la más generalizada e interesante al ser las semillas el primer proveedor de bacterias endófitas (Hodgson et al., 2014; Li et al., 2019). Puede ocurrir que las bacterias que fueron pasadas

verticalmente permanezcan a lo largo de todo el ciclo de vida colonizando toda la planta o que colonicen una zona en especial donde habitualmente crecen (Li et al, 2019).

Los microorganismos que habitan las semillas han tomado relevancia en los últimos años, debido a su rol crucial durante el proceso de germinación y de establecimiento de la plántula (Pal et al. 2022). Los endófitos verdaderos resultan en una plántula saludable proveyendo de cuidados prenatales y le confiere una mejora en el vigor de la semilla, germinación y una resistencia general al estrés (Vujanovic and Germida 2017; Li et al. 2019). También se ha relacionado a que las semillas con una buena composición y diversidad de comunidades de microorganismos afecta el vigor de las plántulas y la adecuación de la planta adulta (Kim and Lee 2021). Siendo esta otra característica que se puede utilizar para intentar predecir el vigor de las semillas, observado su perfil de endófitos de semilla.

Las semillas de amaranto

El género *Amaranthus* comprende plantas herbáceas anuales que pertenecen a la familia Amaranthaceae. Se distribuyen en regiones tropicales o templadas en hábitats abiertos. Los granos de amaranto tienen el potencial para adaptarse a diferentes tipos de estrés tales como altas temperaturas, sequía, suelos pobres y algunas enfermedades ocasionadas por fitopatógenos (Alemayehu et al. 2015). El amaranto presenta mecanismos moleculares en respuesta a diversos tipos de estrés generando su resistencia natural, por lo tanto, tiene el potencial de ser fuente de genes o proteínas que pueden ser utilizados para el desarrollo de la agrobiotecnología (Bojórquez-Velázquez et al. 2021).

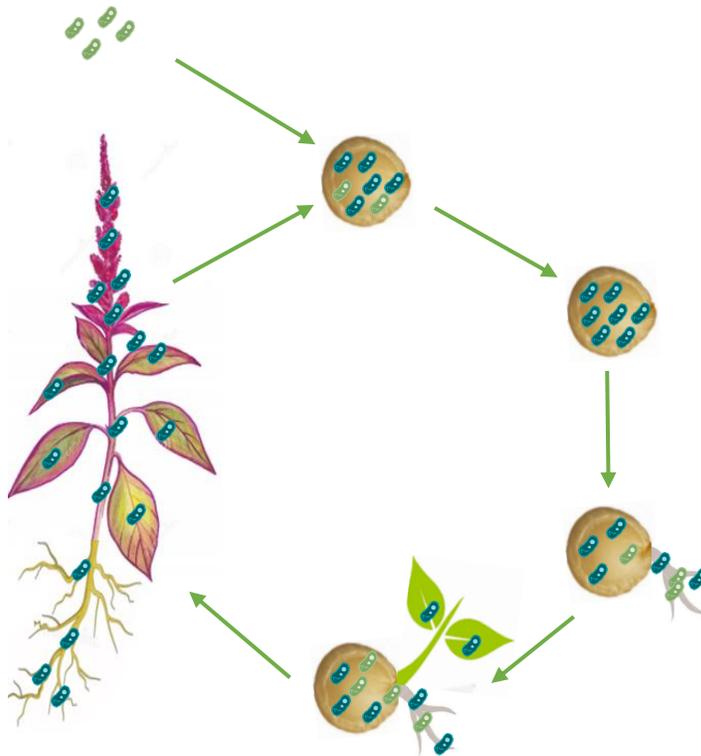


Fig. 3. Transmisión de los endófitos. Los endófitos de semilla se transmiten de dos formas de la planta madre a la semilla (verticalmente) o del ambiente a la semilla (horizontalmente). Las bacterias azules provienen de la planta madre y las bacterias verdes del ambiente y las que son benéficas son seleccionadas. Los endófitos transmitidos horizontalmente pueden ser seleccionados si cumplen algún papel benéfico a la planta y son transferidos a la siguiente generación. Modificado de Li et al. (2019).

Existen diversas especies silvestres de amaranto distribuidas en toda la República Mexicana entre las que destacan *A. hybridus* que se considera junto a *A. powellii* como ancestro de las especies cultivadas *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*, las cuales tienen su origen en México y, son las especies más usadas para la obtención de grano para consumo humano (Bojórquez-Velázquez et al. 2021). Las especies silvestres, en especial *A. hybridus*, se caracteriza por crecer en suelos altamente salinos. Las semillas de amaranto son lisas, brillantes y ligeramente aplanadas. Las especies silvestres son color negro y una testa dura, mientras las especies cultivadas tienen un color crema ligero y tienen la testa blanda (Bojórquez-Velázquez et al. 2021). Los granos de amaranto tienen ventajas comparados con

los cereales convencionales, son altamente nutritivos ricos en proteínas que tienen un contenido equilibrado de aminoácidos esenciales y son fuente de péptidos bioactivos con valor nutracéutico (Silva-Sánchez et al., 2008). Además, carecen de gluten y es una de las principales fuentes vegetales ricas en escualeno (7 -11%) (Viljoen et al. 2018).

Como se ha mencionado los RFOs, los miRNAs, y los endófitos de semilla han tomado un papel importante en el vigor de las semillas, por lo tanto, las investigaciones están enfocadas en entender la relación que existe entre estas moléculas y los endófitos en el vigor y capacidad de germinación de las semillas, así como su desarrollo temprano (Li et al. 2017; Huang et al. 2020; Zhou et al. 2020; Pal et al. 2022). Existe poca información con relación a los contenidos de RFOs, miRNAs y endófitos en semillas silvestres y cultivadas de amaranto y su relación con su potencial de germinación, por lo tanto, es de gran interés generar información de estas moléculas en amaranto y el vigor.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar los cambios moleculares de RFOs en tres especies de semillas de amaranto bajo envejecimiento artificial (EA) y la relación con el vigor.

Objetivos específicos

- Comparar el vigor de semillas de especies silvestres y cultivables de amaranto.
- Determinar el efecto del envejecimiento acelerado en el contenido de RFOs y el vigor de las semillas de amaranto.
- Comprobar si el contenido de RFOs son marcadores moleculares del vigor en semillas de diferentes especies de amaranto.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron 3 especies de amaranto, una especie silvestre *A. hybridus* la cual crece en suelos altamente salinos y las especies empleadas para la producción de semilla, *Amaranthus cruentus* cv amaranteca, y *A. hypochondriacus* cv nutrisol. Todos los granos fueron obtenidos de la cosecha 2020. El material vegetal fue donado por el Dr. Eduardo Espitia Rangel del Campo Experimental Valle de México-INIFAP y se almacenaron en una cámara fría a 4°C.

Envejecimiento Acelerado (EA)

Se siguió el protocolo modificado de Rosa et al. (2018) y Fenollosa et al. (2020), con algunas modificaciones. Brevemente, las semillas de amaranto se guardaron en sobres de aluminio sellado y se colocaron sobre cajas de plástico sellado con agua en el fondo. Se midió la humedad y temperatura dentro de la caja hasta alcanzar el 100% de humedad a 41 °C. Dentro del sobre la humedad relativa fue de 70-90%. Muestras de semillas fueron retiradas del sobre de aluminio cada 24 h durante 6 días.

Extracción, identificación y cuantificación de azúcares de semillas de amaranto

Se siguió el protocolo propuesto por Li et al. (2011) con algunas modificaciones. La semilla de amaranto se pulverizó con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se pesaron 200 mg del polvo, se colocaron en un tubo eppendorf y se le agregó 600 µL de etanol al 80%. La mezcla se calentó a 80 °C por 10 min, se dejó enfriar por 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 15,000 xg por 5 min y se recuperó el sobrenadante. Se repitió el mismo procedimiento con etanol al 80%, luego con etanol al 20% dos veces y por último dos veces con agua destilada (dH₂O). Todos los sobrenadantes se colectaron en el mismo tubo, se secó y se re-suspendió en 1 mL de dH₂O. La solución se filtró con membranas de nilón de 45 µm y 10 µL fueron inyectados a un sistema HPLC marca Agilent Technologies 1200 series (Agilent,

Santa Clara, CA, EUA) con la columna SUGAR SP0810 de la marca Shodex (Showa Denko, Tokio, Japón). La concentración de los azúcares fue determinada empleando curvas estándar de glucosa, sacarosa, galactinol, rafinosa, estaquiosa y glicerol (ANEXO 1). Se determinaron los tiempos de retención y la concentración empleando curvas estándar para cada carbohidrato.

Germinación de semillas

Las semillas fueron colocadas en una charola de germinación en Peat Moss turba de Sphagnum de la marca Berger (Les Tourbières Berger Ltée, Saint-Modeste, Quèbec, Canadá). Se colocaron en una cámara bioclimática a 25°C a un tiempo de luz/oscuridad de 12 h dejando la tierra siempre húmeda durante 7 días y se contó la germinación de las semillas cada 24h.

Análisis estadístico

Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para determinar si los valores seguían una distribución normal. Se utilizó ANOVA paramétrica (si pasaban el test de Shapiro-Wilk) y Kruskal-Wallis (si no pasaban el test de Shapiro-Wilk) para determinar la desviación significativa entre los valores promedio. Se utilizó el test de tukey ($P < 0.01$) para los valores paramétricos y el de Dunn's ($P < 0.01$) para los no paramétricos. Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism 8.0.2 (Dotmatics, Boston, Massachusetts, E.U.) para realizar las pruebas y obtener los gráficos

Resultados

Contenido de azúcares de las tres especies de del género *Amaranthus*

Los azúcares de la familia de los RFOs fueron cuantificados en las tres especies de amaranto. Los resultados mostraron que la sacarosa es el azúcar de mayor concentración y no hay diferencias significativas entre las especies. Sin embargo, *A. hypochondriacus* tiene una concentración significativamente mayor de glucosa y glicerol mientras que *A. cruentus* tiene una concentración significativamente mayor de galactinol y de rafinosa solo en comparación con *A. hypochondriacus* pero valores similares a los presentes en *A. hybridus* (Figura 4).

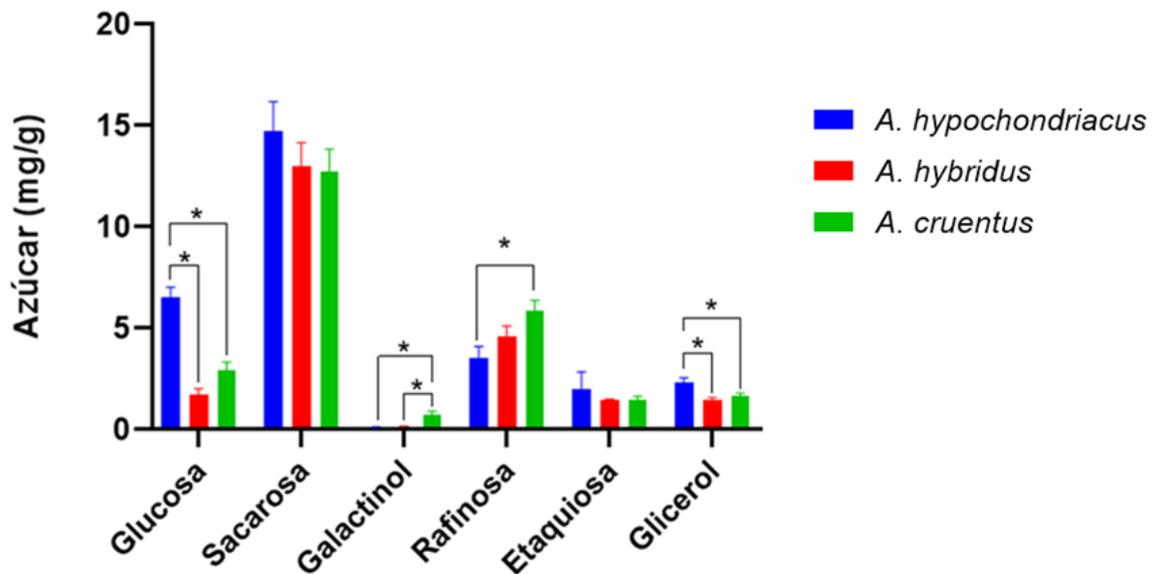


Fig. 4. Contenido de azúcares de diferentes especies del género *Amaranthus*. La concentración de azúcares en mg de azúcar/g de semilla de las especies de *A. hypochondriacus*, *A. hybridus* y *A. cruentus*. Las barras muestran el promedio con desviación estándar. Los asteriscos muestran diferencias significativas a $P < 0.01$ ($n=3$).

Se ha reportado que la relación sacarosa/RFOs totales sirve para predecir cuál de las semillas tiene un vigor más alto (Li et al. 2017). Se puede observar que la semilla con la mayor relación sacarosa/RFOs totales es *A. hypochondriacus*

seguida por *A. hybridus*. La menor relación sacarosa/RFOs totales significativa fue detectada en *A. cruentus* (Figura 5).

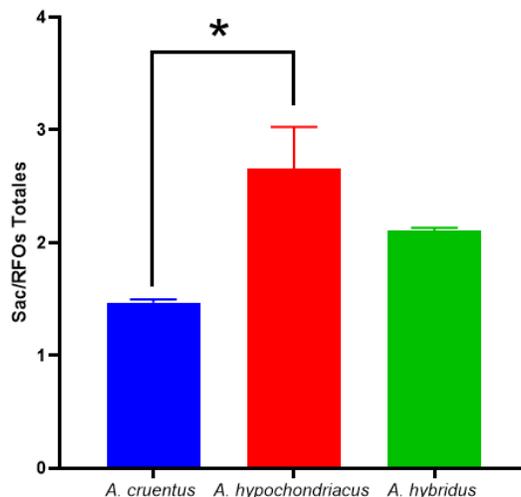


Fig. 5. Relación Sacarosa/RFOs totales. La relación de Sacarosa/RFOs totales en gr de semilla/mg de semilla de las tres especies del género *Amaranthus*. Los asteriscos muestran diferencias significativas a $P < 0.01$ ($n=3$).

Perfil de azúcares en semillas de amaranto después del tratamiento de EA

Los cambios en la concentración de azúcares de las semillas de amaranto se analizaron durante el envejecimiento artificial (EA) (Figura 6). En semillas de *A. cruentus* (Figura 6A) se puede observar que la única diferencia significativa es entre el día tres y el día seis de EA. Mientras que hay una tendencia de glucosa y la rafinosa a acumularse conforme más días pasan bajo el tratamiento.

El perfil de azúcares *A. hypochondriacus* durante el EA (Figura 6B) mostró que la glucosa disminuyó significativamente al tercer día. Por otra parte, la sacarosa disminuyó significativamente con el tratamiento de EA pero con el envejecimiento natural parece mantenerse muy similar. Por último, la rafinosa y la estaquiosa parecen tener una tendencia a disminuir con el tratamiento. *A. hybridus* acumuló significativamente glucosa, sacarosa, rafinosa, estaquiosa y glicerol con el tratamiento de EA (Figura 6C).

Porcentaje de germinación de las semillas de amaranto

Los datos mostraron que *A. hybridus* es la especie de amaranto que presentó el mayor porcentaje de germinación (Figura 7A), mostrando que desde el día cuatro alcanzó el 50% de germinación y al día siete el 80%. Entre *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* no existieron diferencias significativas en el porcentaje de germinación y al día siete ambas mostraron solo un 40% de germinación (Figura 7A).

A los tres días de EA, se observó que *A. hybridus* y *A. cruentus* perdieron su capacidad de germinación sin embargo *A. hypochondriacus* permaneció aún con 50% de germinación como las semillas control (Figura 7B). A los seis días de EA, *A. hypochondriacus* mostró la menor reducción de su capacidad de germinación pasando de 50% al 30%. *A. hybridus* mostró el mayor efecto por el EA pasando del casi 80% a tan solo 20% después de seis días de EA (Figura 7C), mientras que *A. cruentus* mostro una gradual perdida de germinación llegando a tan solo el 10% después de seis días de EA (Figura 7C). Estos datos muestran que *A. hypochondriacus* es la semilla que presenta mayor vigor y resistencia al EA.

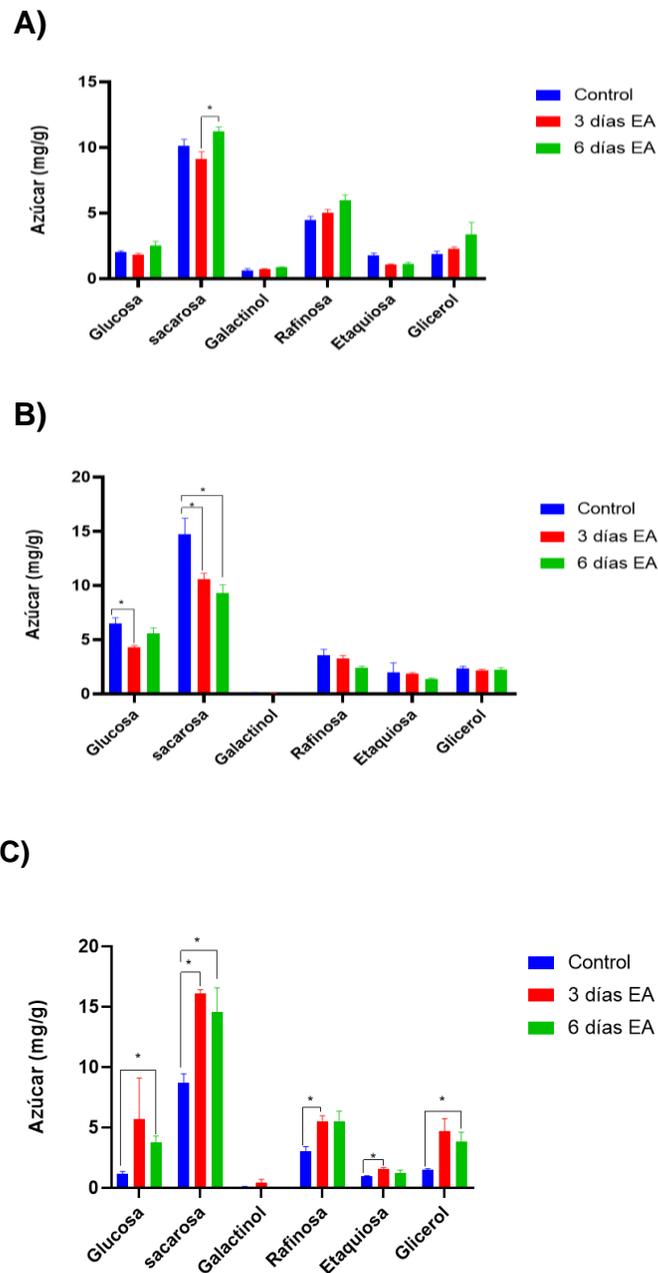


Fig. 6. Contenido de azúcares en semillas de amaranto antes y después de envejecimiento acelerado. A) *A. cruentus*, B) *A. hypochondriacus*, C) *A. hybridus*. Barras azules sin tratamiento (Control), barras rojas a los 3 días bajo del tratamiento de EA y barras verdes a los 6 días bajo de EA. Las barras muestran el promedio con desviación estándar. Los asteriscos muestran diferencias significativas a $P < 0.01$.

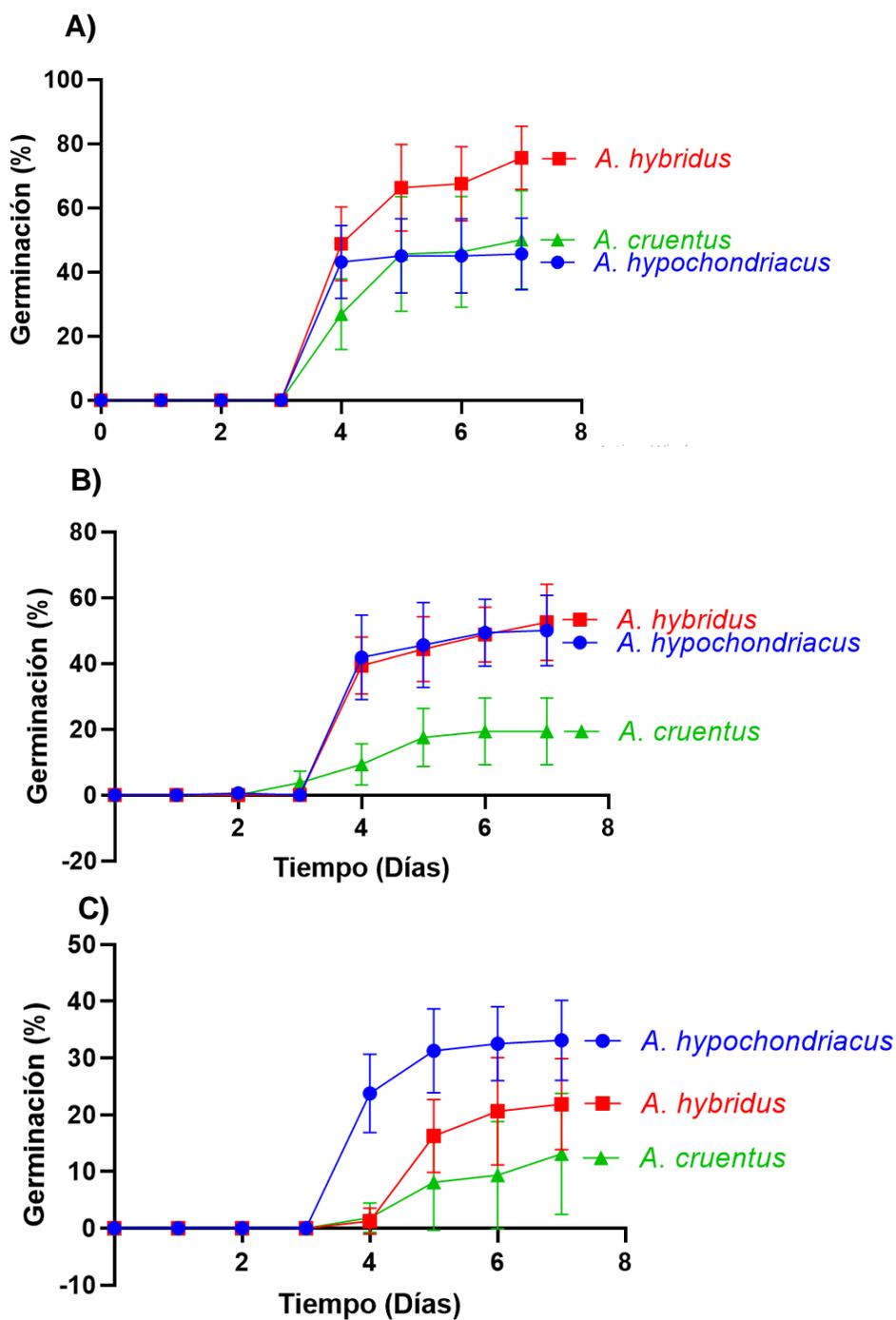


Fig. 7. Porcentaje de germinación a diferentes tiempos de EA. A) semillas control sin ningún tratamiento, B) semillas expuestas a 3 días en las condiciones de EA y C) semillas expuestas a 6 días en las condiciones de EA.

Discusión

***A. hypochondriacus* es la especie que mostró mayor tolerancia al envejecimiento acelerado**

Varios autores han señalado que la concentración de galactinol es un indicador del vigor (Nishizawa et al. 2008; Li et al. 2017; Jing et al. 2018) y la longevidad de las semillas (de Souza Vidigal et al. 2016). Li et al. (2017) reportaron que no es solo la concentración de galactinol, si no que la acumulación de RFOs en general es la causa del aumento en el vigor y la longevidad de las semillas. Sin embargo, estos estudios se han enfocado en la misma semilla alterando la concentración de RFOs con mutantes sobreexpresantes o silenciadores de las enzimas de la vía de síntesis de los RFOs como la galactinol sintasa (Gols). En el presente estudio se compara la concentración de RFOs en tres especies diferentes de semillas del género *Amaranthus*.

A. cruentus fue la semilla con una mayor concentración de galactinol y rafinosa (Figura 1) y de acuerdo a los reportes es la especie que debería de tener una mayor capacidad de resistencia a las condiciones adversas y por lo tanto mayor germinación. Sin embargo, a pesar de que *A. cruentus* mostró el porcentaje de germinación similar a *A. hypochondriacus*, al ser expuesta a condiciones de EA la germinación cayó rápidamente en *A. cruentus* hasta alrededor de un 20% después de solo tres días de EA (Figura 7B). Mientras que *A. hybridus* y *A. hypochondriacus* mantuvieron aproximadamente 50% de germinación aun después de tres días bajo EA (Figura 7B). A los seis días de EA, *A. hypochondriacus* mostró un 30% de germinación mientras que *A. hybridus* declinó a 20% y *A. cruentus* al 13% (Figura 7C). Por lo tanto, *A. cruentus* fue la especie analizada de menor vigor reflejado en su pobre germinación antes y después del tratamiento de EA.

La semilla que mostró el mejor vigor fue *A. hypochondriacus* porque a pesar de no tener la germinación más alta resultó ser la semilla con la resistencia más alta a las condiciones de EA, pasando de un porcentaje de germinación promedio máxima del 50% al 30% a los seis días, pero sin ser estadísticamente significativa

la diferencia (Figura 7A y B). Sin embargo, es la semilla con una menor concentración de galactinol y rafinosa comparada con *A. cruentus*, y la semilla con la mayor concentración de glicerol y glucosa comparada con las otras dos especies (Figura 4) y una alta relación sacarosa/ RFOs totales (Figura 5).

El glicerol es parte del metabolismo central debido a que es centro, donador y aceptor de moléculas de todas las vías especializadas, como la síntesis de pared celular o el metabolismo de lípidos (Buchanan y Jones 2000; Wiebach et al. 2020). La acumulación de glicerol se ha correlacionado negativamente con el vigor del arroz (Chen et al. 2022). Otro estudio mostró que las semillas con una germinación baja tendían a acumular glicerol junto con otros dos productos relacionados con el glicerol. Estos dos compuestos son el glicerol-3-fosfato, y el glicerol-2-fosfato, parece que se acumulan porque no están cumpliendo su función celular, lo cual, indica la importancia del metabolismo de lípidos en las semillas (Wiebach et al. 2020).

La glucosa es un monosacárido aldósico central en procesos fotosintéticos y de respiración. Es uno de los compuestos más críticos para la vida, es combustible para la glucólisis y las vías río abajo para la generación de energía para un crecimiento adecuado y la reproducción (Galant et al. 2015). Se ha correlacionado que la acumulación de glucosa en la semilla tiene un efecto negativo en la germinación del trigo (Wiebach et al. 2020). La glucólisis es central para el vigor de las semillas Xin et al. (2011) descubrieron que las semillas de maíz con un vigor alto tienden a acumular enzimas relacionadas con la glucólisis como la fosfoglucomutasa, y 3-fosfoglicerato isomerasa, además, de una menor concentración de 1,3-bifosfoglicerato y piruvato. Se ha reportado que la glucosa puede ser un azúcar señal primario que regula muchos procesos fisiológicos como es la senescencia, crecimiento y desarrollo de la raíz, y la germinación de las semillas (Dekkers et al. 2004; Zhu et al. 2009). Se ha observado que al añadir glucosa exógena se retrasa la germinación (Dekkers et al. 2004) y aumenta la concentración de Ácido Abscísico (ABA) en las semillas mediante la supresión del catabolismo de ABA (Zhu et al. 2009). ABA es un regulador del crecimiento vegetal (RCV) que inhibe la germinación y mantiene la dormancia, regula el desarrollo y la respuesta al estrés en plantas (Katagiri et al. 2005). Además, se ha reportado que

la acumulación de ABA tiene como consecuencia una reducción en el vigor de las semillas (Gu et al. 2019).

En el perfil de azúcares de *A. cruentus* se observó que no hay cambio significativo en las concentraciones de azúcares durante el tratamiento de EA excepto por la sacarosa del día tres al seis (Figura 6A). La sacarosa es un disacárido compuesto de glucosa y fructosa. Tiene múltiples funciones en las plantas como regulador de la fotosíntesis y la respiración, también como compuesto de almacenamiento y ayuda a mantener la presión osmótica en el citoplasma (Xu and Wang; Teixeira 2005). La adición de sacarosa exógena retrasa la germinación (Xu and Wang). Además, se ha relacionado que una concentración alta de sacarosa y baja en RFOs (una relación Sacarosa/RFOs totales alta) tiene como resultado un vigor bajo de las semillas (Li et al. 2017). Como se puede observar *A. cruentus* es la especie con una mayor concentración de RFOs y una menor concentración de sacarosa por tener la relación Sacarosa/RFOs totales más baja (Figura 5), y con una tendencia a almacenar rafinosa y galactitol, y otros RFOs como la glucosa y el glicerol durante el tratamiento de EA (Figura 6A). Li et al (2017) explican que como los RFOs son azúcares derivados de la sacarosa las semillas con un vigor alto producen RFOs a partir de la sacarosa y por ello las semillas con un vigor alto tienen una relación Sacarosa/RFOs totales baja. En este caso, *A. hypochondriacus* tiene la mayor relación Sacarosa/RFOs totales (Figura 5), lo que indica que tiene una alta concentración de sacarosa y una baja concentración de RFOs característico de semillas con un vigor bajo. Sin embargo, *A. hypochondriacus* tiene el vigor más alto de las tres especies. Todo junto parece indicar que hay otros factores que influyen más sobre la germinación de las semillas que los perfiles de azúcares.

A diferencia de *A. cruentus*, *A. hypochondriacus* tiene cambios estadísticamente significativos en la concentración de glucosa y sacarosa, mostrando una tendencia de disminuir los RFOs durante el tratamiento de EA (Figura 6B). Se ha reportado que las semillas con un vigor alto tienen una alta utilización de glucosa (Abdul-Baki, 1969). Podría ser que las semillas con un vigor alto tienden a utilizar sus reservas para mantener a la semilla con vida. Mientras que las semillas con un vigor bajo no pueden utilizar de manera rápida y eficiente las reservas de energía.

Las semillas de la especie de *A. hybridus* se podría considerar con un vigor intermedio entre *A. hypochondriacus* y *A. cuneatus*. Debido a que, a pesar de que empiezan con la germinación más alta con alrededor del 70% terminan teniendo una germinación de alrededor de 20% después del tratamiento de EA (Figura 7A y C). *A. hybridus* parece que tiene una estrategia de respuesta al estrés opuesta a *A. hypochondriacus* al acumular glucosa, sacarosa, rafinosa y estaquirosa después del estrés causado por el tratamiento de EA. Parece, sin embargo, que es la única que sigue el patrón de disminuir el vigor junto con el aumento de glucosa, sacarosa y glicerol (Figura 6C).

Conclusiones

Los RFOs no son un buen marcador del vigor comparando entre especies debido a que *A. hypochondriacus* resultó tener el mejor vigor con la menor concentración de RFOs y una alta relación Sacarosa/RFOs totales. Parece que en realidad es la utilización de los azúcares durante las situaciones de estrés lo que produce un vigor alto, pero hacen falta más estudios para corroborar esto. Especialmente porque *A. hybridus* tiene el vigor intermedio entre las otras dos especies y tiene la estrategia opuesta a *A. hypochondriacus* aumentando la acumulación de glucosa, sacarosa, rafinosa y glicerol.

Perspectivas

Para complementar el trabajo es de gran interés conocer el perfil de miRNAs y de endófitos en las semillas de Amarantho y su posible función en la germinación, y establecimiento de la plántula.

Por lo tanto, se procedió a estandarizar las técnicas de extracción de ARNtotal para poder generar las genotecas de miRNAs y poder identificar posibles miRNAs relacionados aparte de corroborar si en amaranto los miR164c y miR168a tienen relación con el vigor. También, identificar si existen diferencias en los

endófitos que albergan las semillas cultivables y las semillas silvestres y el posible papel en el vigor de las semillas.

Separación de embriones de semillas de amaranto

Para la separación de los embriones, las semillas fueron remojadas por 1, 12 y 24 h (Figura 8). Con la ayuda de un estereoscopio ZEISS SteREO Discovery V8 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) y con la ayuda de unas pinzas quirúrgicas se presionó la semilla y el embrión fue recuperado y colocado inmediatamente a -70°C . Debido a que la semilla de *A. hypochondriacus* quien mostró mejores cualidades de germinación ante el EA aún después de 6 días, esta fue elegida para proceder con el estudio de los miRNAs. Por ello, se procedió a obtener los embriones de semilla (Figura 8). Se eligieron los tiempos de germinación con 1 h en agua para ablandar la semilla y poder obtener el embrión, 12 y 24 h de tiempo para observar los cambios en la expresión de miRNAs.

Una vez obtenidos los embriones se procederá a la extracción de ARNtotal para la construcción de genotecas de miRNAs y proceder con la secuenciación y análisis bionfirmáticos.

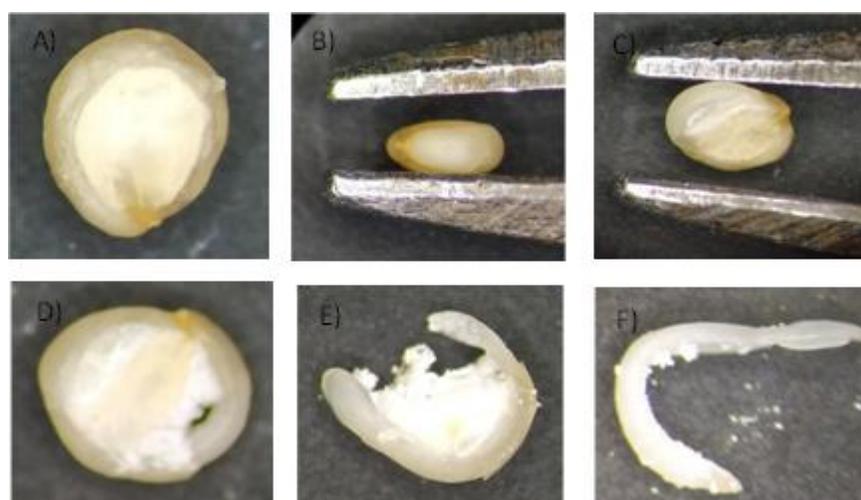


Fig. 8. Obtención de embriones de semilla de *A. hypochondriacus*. Procedimiento de obtención de embriones de semilla de amaranto. A) Semilla bajo el estereoscopio después de 1 hora en agua destilada se puede observar el embrión (amarillento) rodeando al

perispermo (blanco), B) Se toma la semilla del lado y se presiona suavemente sin dañar el embrión, C) se puede observar como el embrión sale por un lado de la semilla D) se coloca la semilla en la superficie y se presiona suavemente con las pinzas sobre la mitad de la semilla, E y F) con ayuda de las pinzas y una jeringa se separa el resto del perispermo del embrión.

Endófitos de semilla.

Las semillas se esterilizaron superficialmente siguiendo el protocolo modificado de Pal et al. (2022). Se pesaron 150 mg de semilla y se les agregó 1 mL una solución de Tween 20 al 1% y benzal al 0.5% por 10 min agitando constantemente. Bajo condiciones estériles, la solución fue descartada y las semillas se lavaron con dH₂O estéril, y con solución de etanol al 70% durante 3 min. Las semillas se lavaron con dH₂O estéril 5 veces y el último lavado se recuperó y se plaqueo en una caja Petri de Agar Nutritivo (3 gr de extracto de levadura, 3 g de extracto de carne, 5 g de peptona, 5g de NaCl y 1.5 g de agar en 1 L de agua a pH 6.8±2) y en Agar Dextrosa Papa (PDA), esta muestra se consideró como control negativo de contaminación por bacterias externas. Una vez lavadas las semillas, se molieron en un mortero y pistilo estériles, y los endófitos se recuperaron en PBS, pH 7. La solución recuperada se centrifugó a 10,000 *rpm* por 2 min y 300 µL del sobrenadante se plaquearon en cajas Petri con NA y otros 300 µl en caja con PDA. Las cajas fueron incubadas a 28 °C durante 2 días.

Hasta el momento se han aislado los endófitos de *A. cruentus*. Durante el procedimiento de esterilización se sembró el último lavado como control de eliminación de bacterias y hongos de la superficie. En estas placas no se observó el crecimiento en el medio PDA y una sola colonia en el medio NA. Después de la molienda de la semilla, se lograron aislar 13 colonias de bacterias endófitos y 3 de hongos (Figura 10).

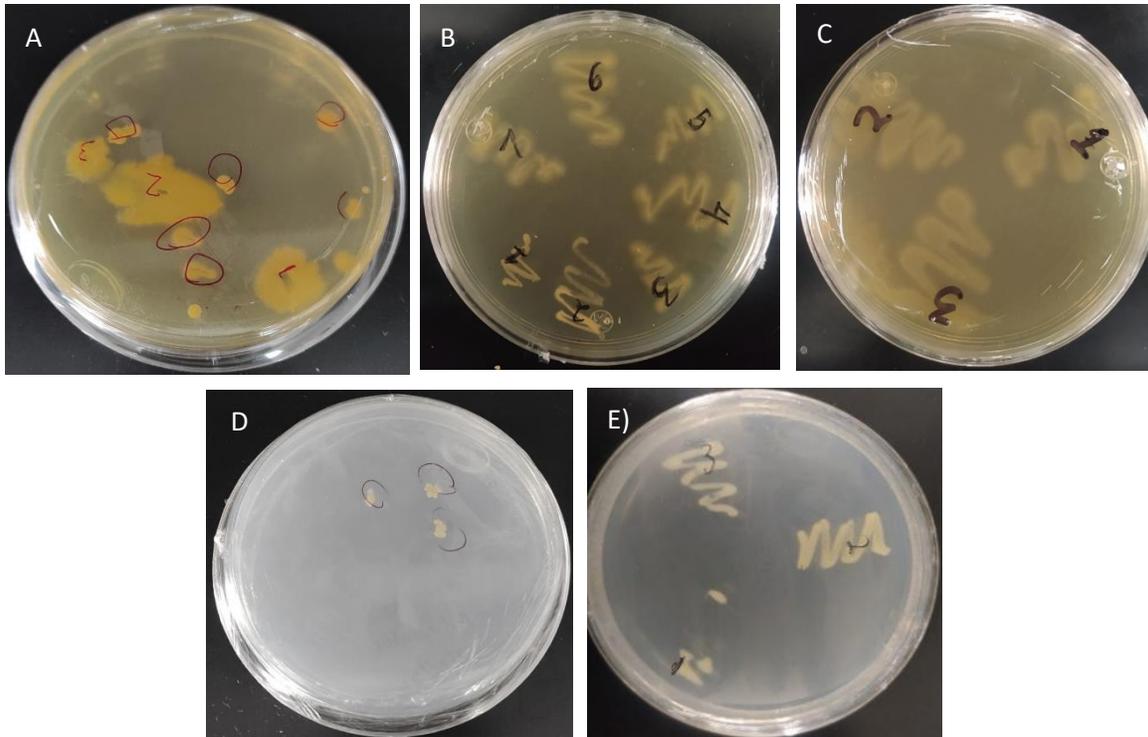


Fig.10. Aislamiento de microorganismos endófitos de semillas de *A. cruentus*. A) Plaqueo de bacterias endófitas en NA, B y C) Estriado de las bacterias aislados en NA, D) Plaqueo de hongos endófitos en PDA y E) Estriado de los hongos aislados en PDA

Cabe destacar que *A. cruentus* mostró una pérdida de germinación cuando se está semilla era lavada-esterilizada antes de germinar, lo cual podría indicar que los microorganismos presentes en esta semilla son importantes para la germinación. Se han obtenido también 10 colonias de bacterias de las semillas de *A. cruentus*. Es un buen número de aislados tomando en consideración que el número varió mucho desde el abeto noruego (*Picea abies*) de donde se han logrado aislar 7 colonias (Cankar et al. 2005), 23 de tres variedades de maíz (*Zea mays*) (Pal et al. 2022), 64 de cacahuete (*Arachis hypogaea*) (Sobolev et al. 2013). En el caso de hongos también varía entre las especies reportadas como por ejemplo del bambú (*Phyllostachys edulis*) fueron identificadas 69 bacterias de 350 aislados (Shen et al. 2014). Mientras que solo 10 en semilla de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (Lupo et

al. 2001). Aquí se muestran 3 aislados de los cuales es necesario realizar su identificación para su clasificación filogenética.

8. Referencias

- Abdul-Baki AA (1969) Relationship of Glucose Metabolism to Germinability and Vigor in Barley and Wheat Seeds. *Crop Science* 9(6):732–737. <https://doi.org/10.2135/cropsci1969.0011183X000900060017x>
- Agler MT, Ruhe J, Kroll S, et al (2016) Microbial Hub Taxa Link Host and Abiotic Factors to Plant Microbiome Variation. *PLoS Biol* 14(1): e1002352. doi:10.1371/journal.pbio.1002352
- Alemayehu FR, Bendevis MA, Jacobsen SE (2015) The Potential for Utilizing the Seed Crop Amaranth (*Amaranthus* spp.) in East Africa as an Alternative Crop to Support Food Security and Climate Change Mitigation. *Journal of Agronomy and Crop Science* 201(5):321–329
- Arunraj R, Skori L, Kumar A, et al (2020) Spatial regulation of alpha-galactosidase activity and its influence on raffinose family oligosaccharides during seed maturation and germination in *Cicer arietinum*. *Plant Signaling and Behavior* 15(8):e1709707. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1709707>
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136(2):215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bojórquez-Velázquez E, Talamantes-Herrera FA, Valles S, et al (2021) Molecular Characterisation of Seed Storage Proteins (SSPs) in Grain Amaranth. 55–79. https://doi.org/10.1007/978-3-030-72365-1_5
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, et al (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* (1979) 320(5880):1185–1190. <https://doi.org/10.1126/science.1159151>
- Buchanan BB, Jones RL (2000) *Biochemistry & molecular biology of plants*. John Wiley & Sons, New York, NY. <https://doi.org/10.1023/A:1013849028622>
- Cankar K, Kraigher H, Ravnkar M, Rupnik M (2005) Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *FEMS Microbiology Letters* 244(2):341–345. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.008>
- Cantino PD, Doyle JA, Graham SW, et al (2007) Towards a phylogenetic nomenclature of Tracheophyta. *TAXON* 56(3):E1–E44. <https://doi.org/10.1002/tax.563001>
- Catusse J, Meinhard J, Job C, et al (2011) Proteomics reveals potential biomarkers of seed vigor in sugarbeet. *Proteomics* 11(9):1569–1580. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000586>

- Chen BX, Fu H, Gao JD, et al (2022) Identification of Metabolomic Biomarkers of Seed Vigor and Aging in Hybrid Rice. *Rice* 15(1):7. <https://doi.org/10.1186/s12284-022-00552-w>
- Curaba J, Spriggs A, Taylor J, et al (2012) miRNA regulation in the early development of barley seed. *BMC Plant Biol* 12(120):1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-120>
- de Los Reyes BG, Myers SJ, McGrath JM (2003) Differential induction of glyoxylate cycle enzymes by stress as a marker for seedling vigor in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Molecular Genetics and Genomics* 269(5):692–698. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0875-6>
- de Souza Vidigal D, Willems L, van Arkel J, et al (2016) Galactinol as marker for seed longevity. *Plant Science* 246:112–118. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.02.015>
- Dekkers BJW, Schuurmans JAMJ, Smeekens SCM (2004) Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218(4):579–588. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1154-9>
- Dhaka N, Sharma R (2021) MicroRNA-mediated regulation of agronomically important seed traits: a treasure trove with shades of grey! *Critical Reviews in Biotechnology* 41(4):594–608. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1873238>
- Dubey A, Kumar A, Abd_Allah EF, et al (2019) Growing more with less: Breeding and developing drought resilient soybean to improve food security. *Ecological Indicators* 105:425–437. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.03.003>
- Dubey A, Malla MA, Kumar A, et al (2020) Plants endophytes: unveiling hidden agenda for bioprospecting toward sustainable agriculture. *Critical Reviews in Biotechnology* 40(8):1210–1231
- Durán P, Thiergart T, Garrido-Oter R, et al (2018) Microbial Interkingdom Interactions in Roots Promote *Arabidopsis* Survival. *Cell* 175(4):973-983.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.020>
- Fenollosa E, Jené L, Munné-Bosch S (2020) A rapid and sensitive method to assess seed longevity through accelerated aging in an invasive plant species. *Plant Methods* 16(1):1–11. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00607-3>
- Galant AL, Kaufman RC, Wilson JD (2015) Glucose: Detection and analysis. *Food Chemistry* 188:149–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.071>
- Gojfo E, Pupel P, Lahuta LB, et al (2015) The acquisition of desiccation tolerance in developing *Vicia hirsuta* seeds coincides with an increase in galactinol synthase expression and soluble α -D-galactosides accumulation. *Journal of Plant Physiology* 184:37–48. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.06.013>

- Gong S, Ding Y, Huang S, Zhu C (2015) Identification of miRNAs and Their Target Genes Associated with Sweet Corn Seed Vigor by Combined Small RNA and Degradome Sequencing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(22):5485–5491. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00522>
- González RF, León GD, Borges GL, Pinzón LL, Magaña MM, Sangines GR, Urrestarazu GM. 2014. Envejecimiento acelerado sobre la calidad de semillas de maíz para producir germinados para forraje alternativo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8:1487–1493.
- Gu J, Hou D, Li Y, et al (2019) Integration of proteomic and genomic approaches to dissect seed germination vigor in *Brassica napus* seeds differing in oil content. *BMC Plant Biology* 19(1):1–20. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1624-7>
- Hodgson, S., de Cates, C., Hodgson, J., Morley, N. J., Sutton, B. C., & Gange, A. C. (2014). Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecology and Evolution*, 4(8), 1199–1208. <https://doi.org/10.1002/ece3.953>
- Huang K, Zhou S, Shen K, et al (2020) Elucidation of the miR164c-Guided Gene/Protein Interaction Network Controlling Seed Vigor in Rice. *Frontiers in Plant Science* 11: 589005. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.589005>
- Jing Y, Lang S, Wang D, et al (2018) Functional characterization of galactinol synthase and raffinose synthase in desiccation tolerance acquisition in developing *Arabidopsis* seeds. *Journal of Plant Physiology* 230:109–121. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.011>
- Katagiri T, Ishiyama K, Kato T, et al (2005) An important role of phosphatidic acid in ABA signaling during germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 43(1):107–117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02431.x>
- Kijak H, Ratajczak E (2020) What do we know about the genetic basis of seed desiccation tolerance and longevity? *International Journal of Molecular Sciences* 21(10):3612. <https://doi.org/10.3390/ijms21103612>
- Kim H, Lee YH (2021) Spatiotemporal Assembly of Bacterial and Fungal Communities of Seed-Seedling-Adult in Rice. *Frontiers in Microbiology* 12:708475. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.708475>
- Kozłowski TT, Gunn CR (1972) Importance and characteristics of seeds. In: *Seed Biology: Importance, Development, and Germination*, Volumen 1. pp 3, 4
- Kumar A, Dubey A (2020) Rhizosphere microbiome: Engineering bacterial competitiveness for enhancing crop production. *Journal of Advanced Research* 24:337–352
- Li H, Parmar S, Sharma VK, White JF (2019) Seed Endophytes and Their Potential Applications. In: *Seed Endophytes*. Springer International Publishing, Cham, pp 35–54

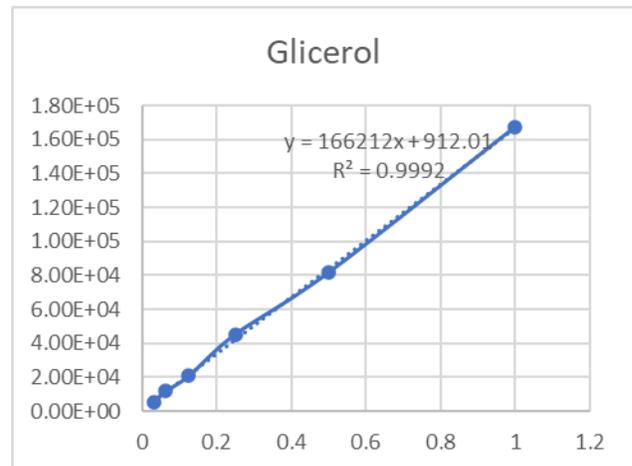
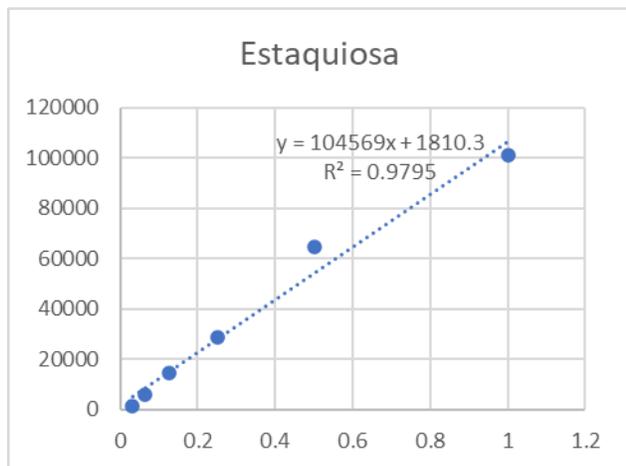
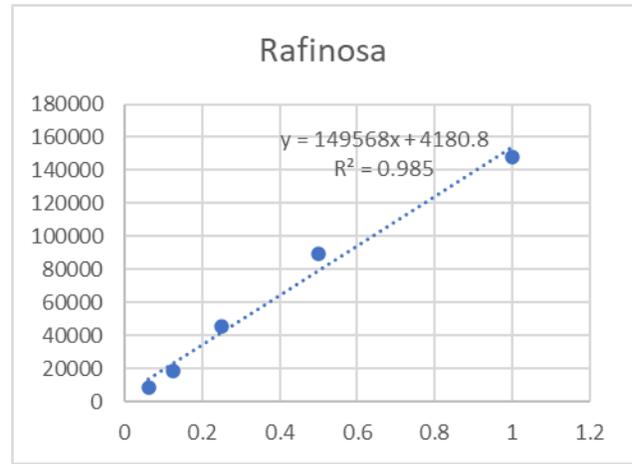
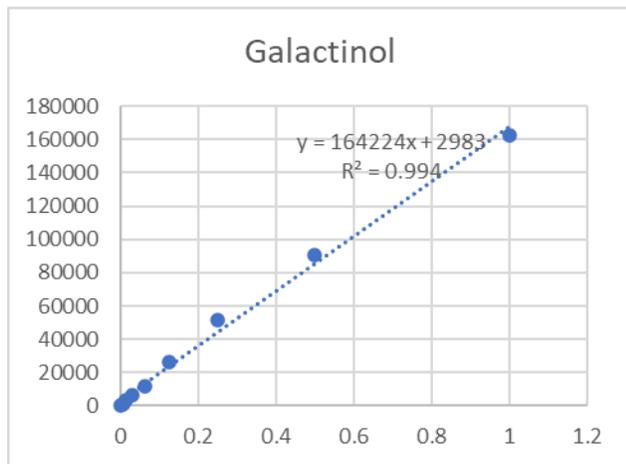
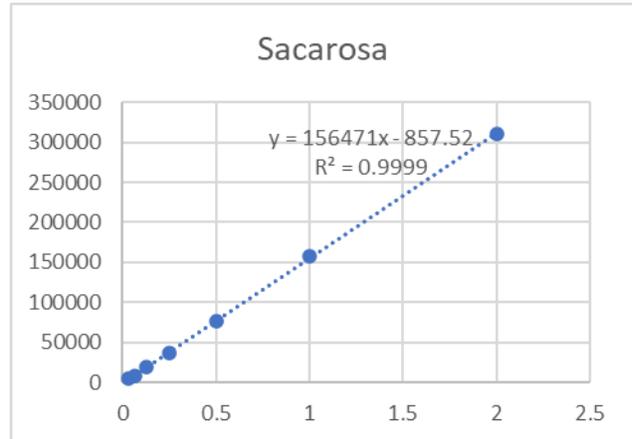
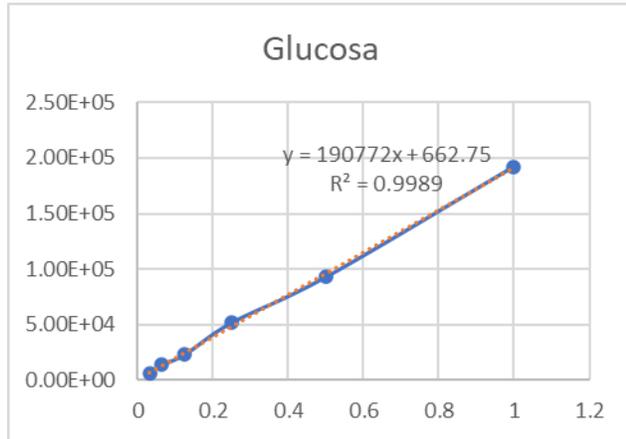
- Li T, Zhang Y, Wang D, et al (2017) Regulation of Seed Vigor by Manipulation of Raffinose Family Oligosaccharides in Maize and *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* 10(12):1540–1555. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.014>
- Li X, Zhuo JJ, Jing Y, et al (2011) Expression of a GALACTINOL SYNTHASE gene is positively associated with desiccation tolerance of *Brassica napus* seeds during development. *Journal of Plant Physiology* 168(15):1761–1770. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.04.006>
- Linkies A, Graeber K, Knight C, Leubner-Metzger G (2010) The evolution of seeds. *New Phytologist* 186(4):817–831. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03249.x>
- Lupo S, Tiscornia S, Bettucci L (2001) Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus*. 18: 38-41. 15482013
- Martin RC, Martínez-Andújar C, Nonogaki H. 2012. Role of miRNAs in Seed Development. In: Sunkar R, editor. *MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses.*, p 109–121.
- Muzquiz M, Burbano C, Pedrosa MM, et al (1999) Lupins as a potential source of raffinose family oligosaccharides. *Industrial Crops and Products* 9(3):183–188. [https://doi.org/10.1016/s0926-6690\(98\)00030-2](https://doi.org/10.1016/s0926-6690(98)00030-2)
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* 147(3):1251–1263. <https://doi.org/10.1104/pp.108.122465>
- Pal G, Kumar K, Verma A, Verma SK (2022) Seed inhabiting bacterial endophytes of maize promote seedling establishment and provide protection against fungal disease. *Microbiological Research* 255:126926. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126926>
- Rajjou L, Duval M, Gallardo K, et al (2012) Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology* 63:507–533. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>
- Rosa TDA, Nadal AP, Maldaner HR, et al (2018) Electrical conductivity and accelerated aging in amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) seeds 1 Condutividade elétrica e envelhecimento acelerado em sementes de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.). *Journal of Seed Science* 40(1):44–51
- Salvi P, Saxena SC, Petla BP, et al (2016) Differentially expressed galactinol synthase(s) in chickpea are implicated in seed vigor and longevity by limiting the age induced ROS accumulation. *Scientific Reports* 6: 35088. <https://doi.org/10.1038/srep35088>
- Shen X-Y, Cheng Y-L, Cai C-J, et al (2014) Diversity and Antimicrobial Activity of Culturable Endophytic Fungi Isolated from Moso Bamboo Seeds. *PLoS ONE* 9(4):e95838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095838>

- Silva-Sánchez, C., Barba De La Rosa, A. P., León-Galván, M. F., de Lumen, B. O., de León-Rodríguez, A., & González De Mejía, E. (2008). Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1233–1240. <https://doi.org/10.1021/jf072911z>
- Sobolev VS, Orner VA, Arias RS (2013) Distribution of bacterial endophytes in peanut seeds obtained from axenic and control plant material under field conditions. *Plant and Soil* 371(1-2):367–376. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1692-2>
- Teixeira RT (2005) Modified sucrose, starch, and ATP levels in two alloplasmic male-sterile lines of *B. napus*. *Journal of Experimental Botany* 56(414):1245–1253. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri120>
- Thor H (2015) Introduction: fierce energy. In: *The Triumph of Seeds: How Grains, Nuts, Kernels, Pulses, and Pips Conquered the Plant Kingdom and Shaped Human History*. Boston, USA, p 18
- Tyc O, Putra R, Gols R, et al (2020) The ecological role of bacterial seed endophytes associated with wild cabbage in the United Kingdom. *Microbiologyopen* 9(1):e00954. <https://doi.org/10.1002/mbo3.954>
- Viljoen, E., Odeny, D. A., Coetzee, M. P. A., Berger, D. K., & Rees, D. J. G. (2018). Application of Chloroplast Phylogenomics to Resolve Species Relationships Within the Plant Genus *Amaranthus*. *Journal of Molecular Evolution*, 86(3–4), 216–239. <https://doi.org/10.1007/s00239-018-9837-9>
- Vujanovic V, Germida JJ (2017) Seed endosymbiosis: A vital relationship in providing prenatal care to plants. *Canadian Journal of Plant Science* 97(2):971–981. <https://doi.org/10.1139/cjps-2016-0261>
- Wiebach J, Nagel M, Börner A, et al (2020) Age-dependent loss of seed viability is associated with increased lipid oxidation and hydrolysis. *Plant Cell and Environment* 43(2):303–314. c
- Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P (1997) Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *Biotechniques* 22(3):474–481. <https://doi.org/10.2144/97223st01>
- Xin X, Lin XH, Zhou YC, et al (2011) Proteome analysis of maize seeds: The effect of artificial ageing. *Physiologia Plantarum* 143(2):126–138. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01497.x>
- Xu F, Wang Z Effects of Sucrose on Germination and Seedling Development of *Brassica Napus*. 2(1):150-154. 10.5539/ijb.v2n1p150
- Zhou Y, Zhou S, Wang L, et al (2020) miR164c and miR168a regulate seed vigor in rice. *Journal of Integrative Plant Biology* 62(4):470–486. <https://doi.org/10.1111/jipb.12792>

Zhu G, Ye N, Zhang J (2009) Glucose-induced delay of seed germination in rice is mediated by the suppression of ABA catabolism rather than an enhancement of ABA biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* 50(3):644–651. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp022>.

Anexo 1

Curvas de concentración de los azúcares stock.



Anexo 1. Curvas de concentración de azúcares stock. Se grafica en el eje X la concentración del azúcar en gr/L en el eje Y se muestra el área del pico. Cada gráfica tiene en el título el nombre del azúcar que se midió, el valor de R y la ecuación de la recta con la que se obtuvo la concentración de azúcar en la muestra.