



Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Fitomejoramiento
Tema estratégico (ANA/PEP):	Biotecnología Agrícola				
Línea de investigación:	Caracterización de Recursos Fitogenéticos				
Título del proyecto:	Niveles de ploidía, morfología y germinación de semillas en especies del género <i>Opuntia</i> del estado de Coahuila				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$50,000.00	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	x
Tipo de investigación:	Básica	x	Aplicada	Tecnológica	e-mail del responsable
Vinculación:	Si	No	x	Fondos concurrentes:	godramf@gmail.com
Cooperante(s):					
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo, Arteaga, Ramos Arizpe, General Cepeda y Parras		
Localidades:	Saltillo, Arteaga, Ramos Arizpe, General Cepeda y Parras				
A realizar durante el(los) año(s):	2016, 2017, 2018				

Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma
Responsable	Dra. Francisca Ramírez Godina	0203	1145	
Colaborador:	Dr. M. Humberto Reyes Valdés	0203	2174	
Colaborador:	Dr. Valentín Robledo Torres	1029	3031	
Colaborador:	Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez	3614	4104	
Colaborador:	Dr. Alfonso López Benítez	0203	0797	
Colaborador:				
		Grado por obtener	Matrícula	Firma
Tesista:	MP. Areli González Cortes	Doctorado	61091165	
Programa Docente:	Doctorado en Ciencias en Recursos Fitogenéticos para Zonas Áridas (REFIZA)			
Tesista:				
Programa Docente:				
Tesista:				
Programa Docente:				

Vo. Bo.		Autoriza	
Firma y sello	  DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO		
Nombre	Dr. Alfonso López Benítez Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación

Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

Protocolo para Proyecto de Investigación Ene-Dic 2018

Título del proyecto

Niveles de ploidía, morfología y germinación de semillas en especies del género *Opuntia* del estado de Coahuila

Introducción

El género *Opuntia* por su capacidad de adaptación a ambientes de altas temperaturas y falta de agua, es uno de los recursos fitogenéticos de mayor relevancia en las zonas áridas y semiáridas, que ocupan actualmente más del 60% del territorio mexicano. Se reportan más de 20 usos del nopal entre los que sobresalen alimenticios, medicinales y forrajeros. Debido a esto, muchas especies de nopal están siendo objeto de diversos estudios para encontrar nuevas técnicas que ayuden a garantizar la conservación del acervo genético y por lo tanto aprovechar de manera sustentable este recurso fitogenético de gran valor para las zonas áridas y semiáridas del país.

Se cree que el proceso evolutivo de *Opuntia* puede ser por hibridación entre especies, seguido por el incremento de ploidía (Grant, 1982), por lo que los estudios citogenéticos a través de la caracterización cromosómica y citometría de flujo han sido de gran apoyo, ya que son herramientas eficaces para distinguir entre especies y determinar poblaciones ancestrales, contribuyendo a resolver problemas taxonómicos basadas en análisis de caracteres externos. Dado el papel relevante de las especies del género *Opuntia* en la ecología de las zonas áridas y semiáridas, en la agricultura y a su valiosa diversidad, se planteó el siguiente objetivo: evaluar los niveles de ploidía y caracterización morfo-fisiológica de semillas de seis especies del género *Opuntia* que se distribuyen en el estado de Coahuila, con la finalidad de agrupar o diferenciar especies de nopal distribuidas en Coahuila a partir de sus números cromosómicos, nivel de ploidía y diferencias morfológicas de semilla y así contribuir a la ordenación del género *Opuntia*, conocer la biodiversidad, establecer una línea de mejoramiento genético en nopal y generar estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*.

Objetivos

Evaluar y comparar los niveles de ploidía, caracterización morfológica y fisiológica de semillas de seis especies del género *Opuntia* distribuidas en Coahuila.

Específicos

Obtener el número cromosómico de seis especies del género *Opuntia* distribuidas en Coahuila

Determinar los niveles de ploidía por citometría de flujo en seis especies del género *Opuntia*

Caracterizar morfológicamente los caracteres externos (tamaño, peso, forma, color, textura, forma y posición de hilium) e internos (tamaño, forma, color, disposición y tipo de embrión) de las semillas de seis especies del género *Opuntia*.

Evaluar las características fisiológicas (germinación) de las semillas de seis especies del género *Opuntia* distribuidas en Coahuila

Analizar la asociación entre morfología de semilla y especies

Hipótesis

Existen diferentes números cromosómicos y niveles de ploidía entre especies del género *Opuntia*, distribuidas en Coahuila. Hay diferencias en la morfología y fisiología en semillas, de las especies de *Opuntia* estudiadas.

Revisión de Literatura

Las cactáceas representan a una familia de plantas nativas del Continente Americano, con un número estimado de 1500 especies (Bravo-Hollis, 1978). En México en la región centro-norte, se encuentra la mayor diversidad de los géneros *Opuntia* y *Mammillaria*, los cuales comprenden cerca del 20% del total de la familia. Se reconocen 93 especies silvestres de nopales (Scheinvar, 2010), dando relevancia a los desierto Sonorense y Chihuahuense. En el estado de Coahuila se encuentran distribuidas veinticinco especies de dicho género (Villarreal, 2001). *Opuntia* comprende plantas perenes, suculentas, simples o cespitosas, arborescentes, arbustivas o rastreras; tronco bien definido o con ramas desde la base, erectas, extendidas o postradas; artículos globosos, claviformes, aplanados (cladodios), muy carnosos o leñosos. La mayoría de las especies de este género presentan un alto rango de poliploidía encontrándose una serie que va desde los diploides ($2n=22$) hasta los octoploides ($2n=88$) (Sosa, 1964). Los sistemas reproductivos de *Opuntia* son principalmente de tipo asexual en condiciones naturales debido a que es una respuesta de adaptación al bajo rango de germinación y depredación de semilla (Del Castillo, 1999), lo que provoca poblaciones densas; otro tipo de reproducción es la sexual la cual está relacionada con la hibridación natural entre distintas especies de *Opuntia*, aumentando el nivel de ploidía y diversidad (Bobich y Nobel, 2001; Reyes-Agüero *et al.*, 2006; Nattero y Malerba, 2011). Se han citado numerosos ejemplos de niveles de ploidia, introgresiones, formaciones de poblaciones híbridas y trihíbridas y también hibridaciones entre especies de áreas geográficamente aisladas (Del Castillo, 1999). La identificación de diferentes especies de la familia Cactaceae es afectada por el polimorfismo, hibridación e influencia del hombre en la selección de genotipos específicos, lo cual altera las características iniciales de la especie (Rebman y Pinkava, 2001, Grimaldo-Juárez *et al.*, 2007). La alternativa para identificar correctamente las plantas es a través de la integración de información cromosómica (citogenética), misma que tiende a ser constante entre individuos de la misma especie, lo que facilita la delimitación de especies, géneros y relaciones filogenéticas (Dubcovsky *et al.*, 1989; Grimaldo-Juárez *et al.*, 2007). Según Gibson y Nobel (1986), Cota y Wallace (1996) el estudio de los cromosomas en las cactáceas es escaso, lo que se atribuye al tamaño pequeño de éstos, a la presencia de mucílago en los tejidos y a los cristales de oxalato de calcio y látex, lo cual complica la técnica de aplastado y dificulta su observación. En algunas especies del género *Opuntia*, en donde se han estudiado características de los cromosomas, se coincide en indicar que su número básico es de $x=11$ y que se tienen variaciones poliploides. Una de las disciplinas que estudia la morfología y el comportamiento de los cromosomas durante la mitosis y meiosis es la citogenética (Schubert 2007). Los clásicos estudios citológicos han permitido mediante la tinción de la cromatina contribuir al actual entendimiento de la diversidad de cromosomas en diferentes especies. Estas aproximaciones metodológicas han permitido explicar alteraciones en el cariotipo tales como cambios en el número de cromosomas o en su morfología, y dar una visión sobre el conocimiento del comportamiento de los cromosomas (Chester *et al.*, 2010). Los cromosomas, se caracterizan por poseer características morfológicas distinguibles (número, tamaño, posición de su centrómero), estas características están sometidas a cambios evolutivos y por tanto podrán variar entre y dentro de las especies (Schubert 2007; Guerra 2008). Otra forma de determinar el nivel de ploidía es con el uso de la citometría de flujo (CF), este método permite conocer la identidad de los genomas de una determinada especie y evaluar las variaciones intra e interespecíficas. El principio de la CF es analizar la intensidad de la fluorescencia de partículas o núcleos teñidos con fluorocromos, que son forzadas hidrodinámicamente a pasar por una cámara que recibe un haz de luz intensa, y por medio de un detector óptico separado por filtros convierte el haz en pulsos eléctricos, los cuales son amplificados y digitalizados por un sistema computarizado que muestra los

resultados de la medición de la longitud de onda emitida por las partículas teñidas por medio de un histograma (Dolezel, 1991). La calidad del histograma se define por el valor del coeficiente de variación (CV), los valores de CV confiables para el contenido nuclear de ADN en plantas son los que no exceden de cinco (Dolezel, 1991 y Dolezel *et al.*, 1998). Para obtener CV entre 0.98 y 1.96, el citómetro de flujo debe estar calibrado (Palomino y Heras, 2001). Los análisis de cariotipo, comportamiento meiótico y poliploidías, permiten conocer la variación intra e inter específica, nivel adaptativo y ver inferencias sobre patrones de especiación (Poggio y Naranjo, 2004; Majure *et al.*, 2012).

Procedimiento Experimental

El presente trabajo de investigación se llevará a cabo durante el periodo 2016-2018. Se realizarán colectas de seis especies del género *Opuntia* en diferentes regiones del estado de Coahuila. Cada ejemplar colectado se georreferenciará y se anotarán sus características vegetativas, de las cuales se tomarán características descriptivas del hábitat, se colectarán tres cladodios y cinco frutos maduros de tres plantas diferentes de cada especie. Los cladodios colectados serán establecidos en condiciones de invernadero para obtener material fresco para las pruebas de laboratorio, los frutos se utilizarán en los análisis de semillas.

Etapas 1. Evaluación del número cromosómico y nivel de ploidía

1. Análisis de cromosomas en mitosis

La observación de los cromosomas se realizará en células mitóticas de ápices radiculares de cladodios, en láminas temporales preparadas por la técnica del squash (García, 1990). Las raíces de 1 a 2 centímetros de longitud serán pretratadas con solución acuosa saturada *p*-diclorobenceno durante 4 horas, después serán fijadas, utilizando la fórmula Farmer, en esta permanecerán los ápices por 24 horas, después se quitará el fijador, se enjuagará con agua destilada para la adición de colorante carmín-propionico y ahí permanecerán por una semana, después poniendo en portaobjetos un ápice radicular, con una gota de ácido propiónico al 45%, se macerará y colocará un cubreobjetos, presionando hasta obtener una preparación donde los cromosomas estén bien coloreados y separados; al lograr esto se procederá a la microfotografía.

Para la determinación del número cromosómico se evaluarán al menos 25 células en metafase por especie, considerando el número cromosómico básico (x), esta variable se obtendrá a partir de la microfotografía de células con cromosomas en metafase. Todas las observaciones se harán con el objetivo 100X en un microscopio compuesto Carl Zeiss con cámara digital Pixera Winder Pro.

2. Análisis con citometría de flujo

El nivel de ploidía será estimado por citometría de flujo en brotes jóvenes y en ápices radicular obtenidos de cladodios colectados. La extracción de los núcleos se llevará a cabo con 400 μ l de Buffer (CyStain UV Ploidy) de extracción, en el que se dejará incubar el tejido por 1 minuto. Una vez diseminado el tejido, se le añadirá 800 μ l de solución Buffer (CyStain UV Ploidy) de tinción con 1 mg/l de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2-fenilindole), (DAPI staining solution, Partec) que tiñe el ADN. Tras resuspender la mezcla, se filtrará a través de una malla de nylon de 50 μ m. La suspensión de núcleos se hará circular por el circuito de microtubos de un citómetro de flujo (BD AccuriTM C6) equipado con una lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 420 nm de longitud de onda, en respuesta, el fluorocromo DAPI fijado al ADN emite una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN en el núcleo, que es reconocida y captada por un fotoreceptor. El gráfico resultante ordenará los datos según el contenido nuclear de ADN en el eje de

abscisas, y contabilizará el número de núcleos de cada tipo en el eje de ordenadas. El sistema se calibrará previamente situando el pico correspondiente a un contenido de ADN igual a 2C (diploide) sobre el valor 100 de la escala de abscisas. En todos los casos las determinaciones se realizarán por triplicado, con plantas de control de ploidia conocida como referencia, para la calibración del CF. El patrón de ploidia en las seis especies de Opuntia se determinará según el área relativa (en porcentaje) de los picos correspondientes a las distintas poblaciones celulares (2C, 4C, 8C, etc.).

Etapa 2. Análisis morfo-fisiológico de las semillas

Pruebas de germinación

De forma aleatoria se seleccionarán 50 semillas con cuatro repeticiones por especie, las cuales se establecerán en seis tratamientos con tres niveles de temperatura (20, 25 y 30°C) y dos tipos de semillas (sin escarificar y con escarificación), se escarificarán sumergiéndolas dos veces en agua caliente (80°C) hasta llegar a temperatura ambiente y dejándolas en remojo por 24 horas (Mondragón, 2001). Posteriormente se desinfectarán con hipoclorito de sodio 10 % por 10 minutos y se enjuagarán finalmente con agua purificada, para ser sembradas en cajas Petri con papel filtro húmedo. Los ensayos se llevarán a cabo en cámaras de germinación, se registrará el número de semillas germinadas a los 4,8,12 y 15 días a partir de la siembra. El diseño experimental será completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Los datos se someterán a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para determinar el efecto de los tratamientos.

Caracterización morfológica de semillas

Se seleccionarán de forma aleatoria 50 semillas con 4 repeticiones de cada una de las especies y se evaluarán caracteres externos e internos como: tamaño, forma y color de la semilla, hilum, forma, tipo y disposición del embrión. Para determinar patrones de clasificación con los caracteres de semilla se utilizarán métodos no supervisados en R. Asimismo, se utilizarán técnicas supervisadas de aprendizaje de máquinas para predicción de especies.

Cronograma de actividades.

Actividad	2016						2017						2018					
	E-F	M-A	M-J	J-A	S-O	N-D	E-F	M-A	M-J	J-A	S-O	N-D	E-F	M-A	M-J	J-A	S-O	N-D
Elaboración de anteproyecto	X	X	X															
Colecta de material vegetal			X	X	X	X		X	X	X	X							
Análisis citogenético			X	X	X	X	X	X			X	X						
Análisis citometría de flujo			X	X	X		X	X	X									
Elaboración de artículo científico						X	X	X	X	X								
Análisis morfológico de semillas									X	X	X							
Análisis fisiológico de semillas									X	X	X	X	X	X				
Elaboración de artículo científico												X	X	X	X	X		
Elaboración de tesis					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
	Miles de pesos											
Coletas de especies de nopal en diferentes localidades		3	3				3	3				
Determinar el valor C y nivel de poliploidía por citometría de flujo entre especies del género <i>Opuntia</i> de Coahuila			5	5	5	5						
Análisis citogenético de seis especies del genero <i>Opuntia</i>				4	4	4			4			
Analizar la asociación entre morfología de semilla y especies								2				

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2016	Año estimado de conclusión	2019
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos esperados

Tesis licenciatura, Tesis doctoral, Un artículo científico publicado, Un artículo científico enviado Presentación en un congreso

6.-Literatura citada

Bobich E. G., P. S. Nobel. 2001. Biomechanics and anatomy of cladode junctions for two <i>Opuntia</i> (Cactaceae) species and their hybrid. Am J Bot 88:391-400.
--

- Bravo - Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. 2ª ed Vol. 1 U.N.A.M. México
- Chester M., Leitch A. R., Soltis P. S. y Soltis D. E. 2010. Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/ hybridisation). *Genes* 1: 166-192.
- Cota H. J; Wallace, R. S. 1996. La citología y sistemática molecular en la familia Cactaceae. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 41(2): 27-45.
- Del Castillo R. F. 1999. Exploración preliminar sobre los sistemas de cruzamiento en *Opuntia*, en: R. J. R. Aguirre, J. A. Reyes-Agüero (eds.), *Memoria del VIII Congreso Nacional y III Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. pp. 360-389.
- Dolezel J. 1991. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochem Anal* 2:143-154
- Dolezel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysak M.A., Nardi L. y Obermayer R. 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: interlaboratory comparison. *Ann. Bot. Suppl.* 82, 1726.
- Dubcovsky J., Sosria M., Martínez A. 1989. Karyotype analysis of the Patagonian *Elymus*. *Botanical Gazette* 150(4): 462- 468.
- García V. A. 1990. Manual de Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal 3ra. Edición. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México. México. 144 p.
- Grant, V. 1982. Natural Pentaploids in the *Opuntia lindheimeri*-*phaeacantha* Group in central Texas *Bot. Gaz.* 140 (2). 208-215.
- Gibson A. C. y P. S. Nobel. 1986. *The Cactus Primer*. Harvard University Press, Cambridge.
- Grimaldo J. O., T. Terrazas, A. García V., M Cruz V., J. F. Ponce M. 2007. Morphometric analysis of 21 pitahaya (*Hylocereus undatus*) genotypes. *JPACD* 9:99-117.
- Guerra M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic Genome Research* 120: 339-350.
- Guzmán U., Arias S, Dávila P. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM/CONABIO, México. 315 pp
- Majure L. C., R. Puente, y D. J. Pinkava. 2012. Miscellaneous chromosome numbers in *Opuntia* DC. (Cactaceae) with a compilation of counts for the group. *Haseltonia*. 18:67-78.
- Mondragón J. C. 2001. Cactus pear breeding and domestication. *Plant Breeding Reviews* 20: 135-166.
- Nattero J. y Malerba, R. 2011. *Opuntia* quimilo K. Schum. *Kurtziana*, 36(1), 79-87. Consultado el 14 de abril de 2016, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-59622011000100006&lng=es&tlng=es.
- Palomino G. y Heras H. M. 2001. Karyotypic studies in *Opuntia cochineria*, *O. hyptiacantha*, and *O. streptacantha* (Cactaceae). *Caryologia* 54:147-154.
- Poggio L. y Naranjo, C. A. 2004. Citogenética. In: Echenique, V.; Rubinstein, C. & Mroginski, L. *Biología y mejoramiento vegetal*. Editorial INTA. Pp. 69-79
- Rebman J. P. y D.J. Pinkava. 2001. *Opuntia* cacti of North America-An Overview. *The Florida Entomologist*. 84:474-483
- Reyes-Agüero J.A., Aguirre R. J. R., Valiente-Banuet A. 2006. Reproductive biology of *Opuntia*: A Review. *Journal of Arid Environments* 64:549-585
- Scheinvar L., Olalde G., Filardo S. y Beckler P. 2010. Diez especies mexicanas productoras de xoconostles: *Opuntia* spp. y *Cylindropuntia imbricata* (Cactaceae). Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Schubert I. 2007. Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 109- 115.
- Villarreal, J. A. 2001. Flora de Coahuila. Listados florísticos de México. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 136 pp.