



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas

Doctorado en Ciencias en Recursos Naturales y
Medio Ambiente en Zonas Áridas

**Expresión génica como indicador
de viviparidad en nogal pecanero
(*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch)**

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN
RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE
EN ZONAS ÁRIDAS

Presenta:

MAYELA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

Bajo la supervisión de: JESÚS GUADALUPE ARREOLA ÁVILA, Dr.



APROBADA



Bermejillo, Durango, México. Mayo del 2023



iniap

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, agrícolas y Pecuarias

**EXPRESIÓN GÉNICA COMO INDICADOR DE VIVIPARIDAD EN NOGAL
PECANERO (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch)**

Tesis realizada por **MAYELA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO
AMBIENTE EN ZONAS ÁRIDAS**

DIRECTOR:



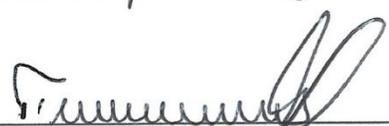
Dr. Jesús Guadalupe Arreola Ávila

CO-DIRECTOR:



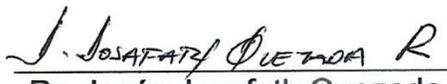
Dra. Verónica Ávila Rodríguez

ASESOR:



Dr. Fabián García González

ASESOR:



Dr. Jesús Josafath Quezada Rivera

LECTOR EXTERNO:



Dr. Urbano Nava Camberos

CONTENIDO

TEMA	PÁGINA
ABREVIATURAS USADAS	viii
DEDICATORIAS	xi
AGRADECIMIENTOS	xii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xiv
RESUMEN GENERAL.....	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I	1
1.INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.2. OBJETIVOS.....	3
1.2.1 Objetivo general.....	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
1.3. HIPÓTESIS.....	3
CAPÍTULO II	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Distribución y producción de nuez pecanera	4
2.2. Clasificación y morfología	5
2.3 Fenología del nogal pecanero.....	6
2.4 Factores que afectan la productividad de <i>Carya illinoensis</i>	7
2.5 Viviparidad	8
2.5.1 Factores que promueven la viviparidad de la nuez pecanera	9

2.6 Aspectos moleculares y expresión de genes asociados con la dormancia y germinación de las semillas	10
LITERATURA CITADA	14
CAPÍTULO III	20
RESUMEN.....	20
ABSTRACT.....	21
INTRODUCCIÓN	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Diseño <i>in silico</i> de los oligonucleótidos	24
Evaluación de la eficiencia de amplificación.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
Primers diseñados	27
Amplicones obtenidos por PCR de punto final.....	29
CONCLUSIONES	31
LITERATURA CITADA	32
CAPÍTULO IV	36
RESUMEN.....	37
ABSTRACT.....	37
INTRODUCCIÓN	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
RESULTADOS.....	43
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES	49

AGRADECIMIENTOS.....	49
LITERATURA CITADA	49
CAPÍTULO V	52
RESUMEN.....	52
ABSTRACT.....	53
INTRODUCCIÓN	54
MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
Material Vegetal.....	56
Extracción de ARN total.....	56
Análisis de expresión génica	57
Análisis estadístico	58
RESULTADOS.....	59
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES	66
LITERATURA CITADA	67

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
CAPÍTULO III	20
1. Lista de primers diseñados y seleccionados para el estudio molecular de la viviparidad en nuez pecanera.	27
2. Características de los primers diseñados y seleccionados para el estudio de la expresión de ABA y GA en nuez pecanera, mediante PCR punto final.	29
CAPÍTULO IV	36
1. Lecturas espectrofotométricas usadas para evaluar la cantidad del ARN total de tejidos embrionarios de nuez madura normal y nuez madura con embrión germinado de <i>Carya illinoensis</i>	44
2. Lecturas espectrofotométricas usadas para evaluar la calidad del ARN de tejidos embrionarios de nuez madura normal y nuez madura con embrión germinado de <i>Carya illinoensis</i>	44
CAPÍTULO V	52
1. Lista de primers utilizados para el análisis de la viviparidad en nuez pecanera mediante qRT-PCR.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
CAPÍTULO III	20
1. Amplificación de muestras de ADN de nuez pecanera germinada (G) y madura (M), con los primers ABA 8H, GA2ox2, ZEP, Actina, GA3ox1, ABA 2 y AOG..	30
CAPÍTULO IV	36
1. Electroforesis en gel de agarosa (2%) del ARN total obtenido del tejido embrionario de nuez pecanera madura (A) y nuez pecanera con embrión germinado (B) mediante ocho protocolos de extracción.	45
2. Evaluación de la eficiencia de la reacción de RT-PCR a partir de ARN obtenido del tejido embrionario de nuez pecanera madura (A) y con embrión germinado (B) de <i>Carya illinoensis</i> mediante ocho metodologías de extracción y el gen actina (266 pb).....	46
CAPÍTULO V	52
1. Observación morfológica durante el desarrollo del fruto y el proceso de viviparidad en nuez pecanera.	59
2. Expresión de genes relacionados con la biosíntesis de ácido abscísico y giberelinas durante el desarrollo y la viviparidad de <i>Carya illinoensis</i>	61

ABREVIATURAS USADAS

ABA	Ácido abscísico
ABA2	Zeaxanthin epoxidase chloroplastic
ABA8H	Abscisic acid 8'-hydroxylase
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AOG	Abscisate beta-glucosyltransferase
ARN	Ácido ribonucleico
Ct	Ciclo de umbral, es la intersección entre una curva de amplificación y una línea de umbral
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DNAasa	Desoxirribonucleasa
DEPC	Dietilpirocarbonato
EA	Estado acuoso
EC	Endurecimiento de cáscara
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GA	Giberelinas
GA3ox1	Gibberellin 3-beta-hydroxylase
GA2ox2	Gibberellin 2-beta-dioxidase 2-related
GE	Germinación del embrión
%GC	Porcentaje de Guanina y Citosina
IDF	Inicio del desarrollo del fruto
IDT	Integrated DNA Technologies
LN	Longitud Norte
LO	Longitud Oeste
LiCl	Cloruro de litio
ME	Madurez del embrión

MOPS	Buffer zwitteriónico morfolínico, utilizado como tampón de electroforesis para geles de agarosa desnaturalizados para ARN
mpm	Marcador de peso molecular
nm	Nanómetro, equivale a una milmillonésima parte de un metro
NaCl	Cloruro de sodio
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction)
pb	Pares de bases
PVP	Polivinilpirrolidona
qRT-PCR	PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (en inglés, Real Time Quantitative Reverse Transcription PCR)
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBE	Disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA, usada en el del de agarosa para separar ácidos nucleicos mediante electroforesis
Tm	Temperatura de fusión
UV	Ultravioleta
ZEP	Zeaxanthin epoxidase
2^{-ΔΔCT}	El método delta delta Ct es una forma conveniente de analizar los cambios relativos en la expresión génica a partir de experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real.

Francamente, no siempre creí en mí.

*Pero he sobrevivido a tantas guerras, ausencias, caídas y derrotas,
que hoy me siento más invencible que nunca.*

Francisco J. Zárate

DEDICATORIAS

A **Dios**, quien ha forjado mi camino y me ha dirigido por el sendero correcto.

A **mis padres**, por estar presentes en cada etapa de mi vida siendo apoyo e inspiración para seguir adelante.

A **Luis Gerardo**, por ser quien ilumina mi camino, apoyar mis sueños y ser parte de ellos a través de tus consejos, paciencia, apoyo y amor incondicional.

A **Simona**, por ser inspiración constante para ser mejor cada día.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por el financiamiento otorgado a través del Programa de Becas Nacionales, para el desarrollo y término de la presente investigación.

Al Programa de **Posgrado en Recursos Naturales y Medio Ambiente en Zonas Áridas**, de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, dependiente de la Universidad Autónoma Chapingo, por brindarme las herramientas para desarrollarme personal y profesionalmente.

A la **Facultad de Ciencias Biológicas de la UJED** por permitirme el espacio y equipo necesarios para poder llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

A mi Comité Asesor:

Dr. Jesús G. Arreola Ávila, por su apoyo y confianza en la realización de este trabajo y desarrollo de mi formación profesional.

Dr. J. Josafath Quezada Rivera, por su orientación, conocimiento, enseñanza y colaboración durante el progreso de esta investigación.

Dra. Verónica Ávila Rodríguez, por compartirme sus conocimientos y apoyo en el desarrollo de esta investigación.

Dr. Fabián García González, por su tiempo y experiencia en la mejora de este trabajo.

Al lector externo, **Dr. Urbano Nava Camberos**, por su participación y disposición al revisar esta Tesis Doctoral.

A **María S. Mota Ituarte** y **Edén A. Luna Zapien** por su amistad y apoyo incondicional.

De manera especial a **Elieel Rocha Galván**, **Benjamín Nava Reyes** y **Arturo Salcido Adame** del Laboratorio de Biología Molecular FCB-UJED, por compartir sus ideas, conocimiento y tiempo en el desarrollo y mejora de este trabajo.

A mis compañeros de generación, **Bonifacio**, **Citlalli**, **Edén**, **José Manuel**, **María**, **Margarito** y **Sergio**, por las experiencias compartidas durante nuestra estancia en el Doctorado.

A **Cecilia Rangel** y **Adrián Nevárez**, por ser constante motivación y sobre todo por siempre estar.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Mayela Rodríguez González

Fecha de nacimiento: 6 de abril de 1992

Lugar de nacimiento: Cuauhtémoc, Cuencamé Dgo, México

CURP: ROGM920406MDGDNY00

Profesión: Ingeniero en Sistemas Agrícolas



Desarrollo académico

Preparatoria: Capacitación para el área de Informática. EMSAD07 (2007-2010).

Licenciatura: Ingeniero en Sistemas Agrícolas por la Universidad Autónoma Chapingo, en la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas (2010-2015).

Cédula profesional: 10588769.

Maestría: Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente en Zonas Áridas en el Posgrado en RNyMAZA de la URUZA-UACH (2016-2017).

Cédula profesional: 12361938.

Desarrollo científico

Autor de dos artículos científicos sobre la viviparidad en nuez pecanera, coautor de un artículo sobre caracterización micro-regional de cultivos y autor de una nota científica sobre fauna silvestre. Participación como ponente en congresos nacionales e internacionales, dentro de los que destacan el Congreso Internacional de Manejo de Pastizales, Congreso de Investigación CIESLAG, Primer Foro Regional de Investigación en Ciencias Biológicas y Ambientales, Congreso Internacional Agrigenomics for Food and Health y el Congreso sobre Recursos Bióticos de Zonas Áridas.

Colaboración en diversos comités de revisión de tesis de Licenciatura de la URUZA-UACH y la Universidad Tecnológica de Rodeo.

RESUMEN GENERAL

Expresión génica como indicador de viviparidad en nogal pecanero (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch)

La viviparidad en *Carya illinoensis* se refiere al desarrollo específico de la nuez en la que se minimiza la etapa de latencia y germina antes de ser cosechada. Este problema fisiológico ha sido estudiado y reportado en diferentes especies vegetales. Sin embargo, en nuez pecanera la información sobre los mecanismos genéticos implicados en el desarrollo y la viviparidad siguen siendo insuficientes. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de genes relacionados con las fitohormonas ácido abscísico y giberelinas durante diferentes etapas fenológicas de la nuez, con el fin de contribuir en el conocimiento a nivel molecular de los mecanismos de expresión génica durante el desarrollo y viviparidad de la nuez pecanera, en el Norte de México. Con apoyo de herramientas bioinformáticas se diseñaron primers adecuados para ser utilizados en el estudio de la viviparidad de la nuez. Mediante diferentes protocolos se evaluó la extracción de ARN a partir del tejido embrionario de la nuez, obteniendo un protocolo eficaz en el aislamiento de ARN de calidad para ser usado en ensayos de PCR. Finalmente, fue posible realizar ensayos de PCR tiempo real y evaluar la expresión génica en diferentes etapas fenológicas de la nuez pecanera. Estos resultados son un acercamiento para dilucidar aún más el mecanismo molecular del desarrollo y viviparidad de la nuez pecanera.

Palabras clave: *Carya illinoensis*, fitohormonas, germinación prematura, PCR tiempo real.

Tesis de doctorado en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente en Zonas Áridas, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Mayela Rodríguez González

Director de Tesis: Dr. Jesús Guadalupe Arreola Ávila

ABSTRACT

Gene expression as an indicator of viviparity in pecan nut (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch)

Viviparity in *Carya illinoensis* refers to the specific development of the nut in which the latency stage is minimized and it germinates before being harvested. This physiological problem has been studied and reported in different plant species. However, information on the genetic mechanisms involved in development and viviparity remains insufficient in pecan nut. This study aimed to evaluate the expression of genes related to phytohormones abscisic acid and gibberellins during different phenological stages of the nut, to contribute to molecular-level knowledge of gene expression during the development and viviparity of pecan nut, in northern Mexico. With support from bioinformatics tools, appropriate primers were designed for use in the studying nut viviparity. Through different protocols, RNA extraction was evaluated from the embryonic tissue of the nut, obtaining an effective protocol for isolating quality RNA to be used in PCR assays. Finally, it was possible to perform real-time PCR assays and evaluate gene expression at different phenological stages of pecan nut. These results are an approach to further elucidate the pecan nut's molecular mechanism of development and viviparity.

Keywords: *Carya illinoensis*, phytohormones, premature germination, real-time PCR.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El nogal pecanero (*Carya illinoensis*) es la especie más importante de su género. Se cultiva principalmente por su fruto, que es rico en aceites y proteínas, y por su madera de buena calidad (Casales et al., 2018), convirtiéndose en un cultivo de importancia económica a nivel mundial.

México es el séptimo país productor de nuez pecanera en el mundo, con 135,947 toneladas en el último ciclo agrícola (FAO, 2023), siendo el estado de Chihuahua la principal entidad productora (77,826 t), seguido de los estados de Coahuila, Sonora, Durango y Nuevo León, siendo un fruto con gran potencial comercial (SIAP, 2023). Al desarrollarse en estas regiones con veranos y otoños cálidos y con baja precipitación durante todo el año, los principales problemas que enfrenta durante su manejo y cosecha son la brotación irregular, la caída de flores y frutos, y la germinación prematura (viviparidad); lo cual afecta considerablemente la rentabilidad (Vieira et al., 2015).

En cuanto a la viviparidad, esta se presenta como un mecanismo de sobrevivencia que han desarrollado las especies nativas, para asegurar su perpetuidad. Consiste en la germinación de la semilla al momento de alcanzar la madurez del fruto, aun cuando se encuentra en el seno de la planta madre (Wood, 2015). Involucrando la falta de latencia en la semilla, por la falta de mecanismos de control en el crecimiento del embrión el cual emerge a través de la testa antes de la abscisión del fruto (Casillas-Álvarez et al., 2018). Dicho fenómeno es contrario a los intereses comerciales, dado que la calidad de la nuez se ve reducida al desarrollar sabores amargos y oscurecimiento en la almendra, que disminuyen el precio de compra del producto y generan pérdidas económicas postcosechas para los productores (García-Moreno et al., 2020).

Estudios previos sobre viviparidad en especies de plantas como maíz, sorgo, trigo, cebada, arroz y *Arabidopsis thaliana* indican que el grado de latencia y

susceptibilidad a la germinación prematura depende de la interacción de una serie de factores de tipo genético-ambiental (Wells, 2017) relacionado con el balance entre la acción de las fitohormonas ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA) (Wood, 2015). Considerando que el balance hormonal está determinado por las concentraciones endógenas de estas hormonas y/o por la sensibilidad de los tejidos a estos compuestos (Villa, 2006), así como de las condiciones climáticas como la temperatura del ambiente y la humedad que imperan en una región (León, 2014).

Las variaciones en las concentraciones de dichas fitohormonas pueden ser resultado de la expresión diferencial de alguno de los genes que codifican para alguna enzima regulatoria en la ruta biosintética de estas. Sin embargo, a pesar de la importancia económica y agronómica del nogal pecanero en la región Norte de México, se sabe muy poco acerca de los mecanismos moleculares en el proceso de maduración y viviparidad de la nuez. Los estudios de expresión génica constituyen una estrategia útil para el entendimiento, a nivel molecular, de los patrones de expresión bajo una condición determinada (Martínez, 2019). Por lo anterior, resulta importante evaluar la expresión de genes de interés relacionados con las fitohormonas ABA y GA durante diferentes etapas fenológicas del desarrollo de la nuez.

El presente documento de Tesis de Investigación Doctoral incluye dos primeros capítulos sobre el estado del arte del proceso de desarrollo y viviparidad de la nuez pecanera; conteniendo información sobre los cambios fisiológicos y moleculares que ocurren en el fruto durante su maduración y germinación. En el capítulo III, se describe el proceso de diseño y selección de primers candidatos para el estudio de la viviparidad en nuez pecanera. El capítulo IV corresponde al primer artículo derivado de la presente Investigación Doctoral, el cual aborda la evaluación de protocolos de extracción de ARN total a partir del tejido embrionario de nuez pecanera. Finalmente, el capítulo V refiere la evaluación de los niveles de expresión relativa de algunos genes relacionados con el desarrollo y la viviparidad de la nuez pecanera.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Contribuir en el conocimiento a nivel molecular de los mecanismos de expresión génica del desarrollo y la viviparidad de la nuez pecanera, en el Norte de México.

1.2.2 Objetivos específicos

- i) Establecer un protocolo de extracción de ARN efectivo para ser utilizado en el tejido embrionario de la nuez pecanera.
- ii) Identificar genes candidatos, para evaluar la expresión génica de la viviparidad en nuez pecanera, mediante uso de herramientas bioinformáticas.
- iii) Evaluar la expresión de los genes involucrados en la viviparidad en nogal pecanero mediante técnicas de biología molecular.

1.3. HIPÓTESIS

- i) Un protocolo de extracción que incluya buffer CTAB como agente lítico, fenol: cloroformo como agente de extracción y cloruro de litio e isopropanol como agente de precipitación garantiza obtener ARN total de calidad a partir del tejido embrionario de nuez pecanera.
- ii) El diseño *in silico* de primers para la amplificación de genes relacionados con ácido abscísico y giberelinas es factible y permitirá el estudio de la viviparidad en nuez pecanera.
- iii) Los genes ABA 8H, AOG, GA2ox2 y GA3ox1 están involucrados positivamente en los factores de transcripción que promueven la viviparidad en nogal.

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Distribución y producción de nuez pecanera

El género *Carya* de la familia Juglandaceae, comprende más de 20 especies, de las cuales trece son nativas de Estados Unidos de América, y siete son cultivadas por sus nueces, siendo el nogal pecanero [*Carya illinoensis* (Wangenh). K. Koch] el único con importancia económica a nivel mundial (Casales et al., 2018). Sin bien, la nuez pecanera es una especie originaria de América del Norte, también se cultiva en China, Turquía, Chile, Australia, Brasil, Canadá, México, Israel y Sudáfrica (FAO, 2023; Castillo et al., 2019). La distribución de la especie *Carya* en esta extensa zona geográfica es el resultado de su gran capacidad de adaptación a las diferentes condiciones ambientales como la precipitación anual, la humedad ambiental y las temperaturas extremas (Urrea y Urzúa, 2016).

El nogal pecanero es una especie perenne altamente valorada por sus nueces, ya que estas forman parte de la dieta de un gran número de animales, al igual que de los humanos quienes la aprovechan por su valor nutricional (Urrea y Urzúa, 2016). A nivel nacional, impulsado por el incremento de la demanda internacional, ha experimentado un crecimiento acelerado en los últimos años (Tarango-Rivero et al., 2019), con una superficie plantada de 146,239 ha y una producción total de 135,947 t con un rendimiento promedio de 1.22 t·ha⁻¹ las cuales son cosechadas entre los meses de octubre a diciembre (SIAP, 2023). Convirtiéndose en una de las principales actividades económica en el norte de México y sur de los Estados Unidos, en donde las principales variedades comerciales son Western y Wichita (Tarango-Rivero, 2004).

Como los demás frutales, el nogal pecanero, está constantemente expuesto a condiciones externas que, dependiendo de su intensidad y duración, puede inhibir su crecimiento, desarrollo y producción. A estas condiciones que limitan la expresión del potencial de rendimiento genético se les define como estrés y

varían dependiendo de la susceptibilidad de cada especie. La respuesta de las plantas ante las condiciones de estrés generalmente implica un consumo energético que busca garantizar principalmente la supervivencia de la planta pero que puede afectar negativamente el rendimiento. Tanto las condiciones de estrés como de exceso hídrico pueden tener un efecto significativo en el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas. Estas condiciones pueden determinar la distribución geográfica de las especies, al generar una presión selectiva en la evolución de una población determinada (Urrea y Urzúa, 2016).

Este cultivo, se desarrolla en regiones donde se presentan condiciones extremas de temperaturas altas y bajos registros de precipitación durante todo el año, en comparación con aquellas áreas en las que el cultivo se desarrolla de forma nativa. Estas condiciones extremas ocasionan problemas fisiológicos como brotación irregular, caída de flores y frutos y viviparidad que afectan el rendimiento, calidad y rentabilidad de la nuez (Vieira et al., 2015).

2.2. Clasificación y morfología

El nogal pecanero se clasifica bajo el Reino *Plantae*; clase, *Magnoliopsida*; Orden, *Juglandales*; Familia, *Juglandaceae* y género, *Carya*. El género *Carya* se compone de aproximadamente 25 especies, de las cuales *Carya illinoensis* es el cultivo económicamente más viable (Casales et al., 2018).

De acuerdo con Urrea y Urzúa (2016), es una planta angiosperma dicotiledónea leñosa de hábito arbóreo, en su hábitat natural llega a medir de 30 a 55 metros de alto con un dosel de más de 2 metros de diámetro, caducifolio con hojas compuestas sésiles imparipinnadas que varían en longitud y color dependiendo del cultivar. Es una especie monoica con flores unisexuales, estaminadas y pistiladas en el mismo árbol, con dicogamia y polinización anemófila (Casales et al., 2018).

Su fruto es drupáceo, monospermo dehiscente con endocarpio endurecido, su forma y dimensión varía de un cultivar a otro y la maduración ocurre en el otoño de la misma temporada (Poletto et al., 2019). La nuez es un órgano de

almacenamiento de minerales, carbohidratos, aceites, aminoácidos y proteínas (Flores-Cordova, 2017; Reyes-Vázquez, 2016) que sirven al embrión para la respiración, germinación e incluso en las primeras etapas de desarrollo de la planta hasta que se vuelve autosuficiente. El desarrollo de la nuez comienza con la polinización y termina con el endurecimiento de la cáscara. El tiempo de cosecha depende del área de cultivo y se realiza tan pronto como la nuez está madura fisiológicamente, el ruzno se seca, se abre y permite la caída de la nuez. Las nueces se recogen manual o mecánicamente, utilizando un agitador hidráulico de troncos y una cosechadora mecánica (Urrea y Urzúa, 2016).

2.3 Fenología del nogal pecanero

La fenología hace referencia al estudio de las reacciones de los organismos vivos, frente a los cambios estacionales y climáticos en su ambiente. El estudio fenológico del nogal permite conocer las fechas de inicio y término de los estadios importantes como la brotación y floración tanto femenina como masculina, en relación con las limitantes climáticas de cada región. Así mismo, permite definir el momento oportuno de los tratamientos sanitarios para la prevención y control de plagas y enfermedades, fertilización, momentos de mayor susceptibilidad a heladas, manejo de problemas fisiológicos, entre otros (Fernández, 2021).

De acuerdo con Godoy *et al.* (2000) y Almeida (2001), en el nogal pecanero se observan siete etapas de desarrollo:

1) Endoletargo. Durante esta fase, la fuente de inhibición está localizada dentro de las yemas, esta etapa puede ser considerada como una expresión de inhibición endógena. Su intensificación se produce generalmente en el otoño y disminuye a finales de dicha estación, y en el invierno, cuando los requerimientos de frío por parte de los tejidos vegetales están pronto a cumplirse.

2) Brotación. La brotación de la yema primaria varía según el clima prevaleciente al inicio del año. Se ha observado que el nogal pecanero requiere exposición al frío (400-800 horas frío) durante el periodo invernal para tener una

brotación uniforme y regular. Este proceso ocurre entre la segunda y tercera semana de marzo.

3) Floración. La flor se forma en las primeras etapas del crecimiento del brote en la primavera; cuando aún permanecen bajo la cubierta de las yemas primarias. Sin embargo, la aparición de las flores no siempre ocurre simultáneamente (dicogamia) y tienen diferentes duración: dos o tres semanas la flor femenina y una o dos semanas la emisión de polen.

4) Estado acuoso. Ocurre a los 66 días después de la receptividad del estigma, alrededor de la segunda a tercera semana de junio.

5) Máximo estado acuoso. Coincide con el inicio del endurecimiento de la cáscara en el fruto, se alcanza la primera semana de julio cuando el fruto ha alcanzado 85% de la longitud y ancho final.

6) Inicio del llenado de fruto. Comienza ocho días después de haberse iniciado el endurecimiento de la cáscara.

7) Fin del llenado de fruto. Desde el inicio del llenado del fruto hasta que se complete el llenado del fruto, se requieren alrededor de 45 días. La almendra alcanza su tamaño total alrededor de la segunda semana de septiembre.

2.4 Factores que afectan la productividad de *Carya illinoensis*

En los últimos años, la producción de nuez pecanera ha tomado importancia debido al incremento de la superficie plantada. Además, en el manejo de este cultivo se ha observado la evolución de las prácticas agronómicas que influyen en gran medida en el desarrollo de la planta desde su establecimiento, así como en la cantidad y calidad de los frutos (Esquer, 2010).

Sin embargo, a pesar de la evolución en el manejo del cultivo para la obtención de mayores rendimientos, este cultivo presenta pérdidas por diferentes factores, tanto bióticos como abióticos, como insectos plaga y enfermedades; la temperatura, precipitación y la humedad relativa del ambiente (Martínez, 2014). Además, existen desequilibrios fisiológicos, como la alternancia de producción y viviparidad, que perturban el desarrollo normal de la nuez pecanera y que potencialmente limitan la productividad (Ramírez-Estrada et al., 2020).

2.5 Viviparidad

A través del tiempo las plantas han desarrollado adaptaciones asociadas a la supervivencia y reproducción; las primeras están basadas en la tolerancia al cambio climático y al ambiente en que se desarrollan, y las reproductivas en adaptaciones embriológicas como la germinación vivípara, brotado precosecha o viviparidad (Pérez-González et al., 2015).

La viviparidad puede presentarse en plántulas capaces de traspasar el pericarpio y liberarse o bien cuando la plántula permanece encriptada hasta la dehiscencia del fruto o hasta que la pared del fruto es perforada por los consumidores. En cualquiera de los casos, ocurre antes de la dispersión de las semillas, cuando estas están maduras y continúan activas fisiológicamente dentro del fruto, lo que conlleva al crecimiento continuo del embrión y la germinación (Pérez-González et al., 2015). Aun cuando el fruto haya alcanzado la madurez o la dehiscencia y abscisión de la planta madre, en el proceso, el embrión aprovecha la humedad del fruto para continuar el desarrollo (Cota-Sánchez, 2008).

Los ejemplos más conocidos de viviparidad son el mangle (*Rhizophora mangle*) (Qiao et al., 2020), nogal (*Carya illinoensis*) (Lagarda, 2012), cebada (*Hordeum vulgare*) (Gualano, 2011), maíz (*Zea mays*) (Márquez Ortiz & Ortiz Cereceres, 1984), trigo (*Triticum aestivum*) (Bainotti et al., 2009), chayote (*Sechium edule*) (Vernieri et al., 1989) y algunas cactáceas (*Echinocactus platyacanthus*) (Pérez-González et al., 2015), en los cuales se han realizado diversos estudios fisiológicos y moleculares para determinar la causa de este problema.

Particularmente, en nogal pecanero ha sido reportada desde el establecimiento de las primeras huertas cultivadas, presentándose durante la época de maduración y cosecha de las nueces. Ocurre en las regiones nogaleras con veranos y otoños cálidos, como son el estado de Sonora, norte de Coahuila, La Comarca Lagunera y Sur de Chihuahua (Barrera et al., 2017; Wood, 2015). Siendo un problema de consideración ya que, al disminuir la calidad de la nuez

se disminuye los precios de venta del producto y generan pérdidas económicas postcosechas para los productores (García-Moreno et al., 2020).

2.5.1 Factores que promueven la viviparidad de la nuez pecanera

De acuerdo con Wells (2017), en nogal pecanero la viviparidad se presenta como resultado de la relación de una serie de factores de tipo genético-ambiental que coinciden para promover la germinación de la nuez antes de cosecharla.

1) *Varietades susceptibles*. Existen algunas variedades de nogal susceptibles a la viviparidad, aparentemente la controlan mediante la presencia de condiciones ambientales adversas al crecimiento, en especial con las temperaturas mínimas inferiores a los 17 °C al tiempo de alcanzar la maduración de la nuez.

2) *Temperaturas altas* durante el periodo de maduración de la nuez. La germinación prematura se presenta bajo condiciones ambientales que ocurren durante la época de maduración y apertura del ruezno (15 de septiembre-15 de octubre), en especial cuando la temperatura es alta tanto en el día como en la noche (> 17 °C).

3) Presencia de *periodos de sequía* durante el desarrollo de la nuez. La humedad del suelo es muy importante para disparar el fenómeno de la germinación prematura; en especial si los riegos no coinciden con el desarrollo de la almendra, donde se ha demostrado que la falta de agua durante este periodo aumenta la germinación de la nuez antes de la cosecha.

4) *Periodo de cosecha*. En el Norte de México, la época de cosecha ocurre a los 20-25 días después del inicio de apertura del ruezno, cuando el 95% de las nueces desprende el ruezno de la cáscara de la nuez; se considera en forma general que inicia en los primeros días de octubre (Lagarda, 2012).

5) *Condiciones de carga que tenga el árbol*. La carga de cosecha que deben tener los árboles en producción debe ser controlada para lograr buena calidad, y producción, así como para prevenir la germinación prematura de nuez. Considerando los hábitos de fructificación de los nogales, el balance de producción más favorable es cuando éstos alcanzan a tener 50% de los brotes

con racimo; sin embargo, dicho balance en árboles maduros difícilmente se logra en forma natural, por lo que sólo se puede lograr con el aclareo de frutos mediante la poda o con la vibración de árboles durante el mes de junio (Lagarda, 2012).

6) *Hormonales*. Existen fitohormonas como el ácido abscísico y las giberelinas que se encuentran asociadas directamente a los procesos de germinación de las semillas (Lagarda, 2012).

2.6 Aspectos moleculares y expresión de genes asociados con la dormancia y germinación de las semillas

El desarrollo, latencia y germinación de las semillas son procesos productivos compartidos con la mayoría de las especies vegetales (Fernández, 2009). En las plantas “vivíparas”, el desarrollo de las semillas se salta la latencia y procede directamente a la fase de germinación donde los embriones, a través de un proceso genético innato, continúan creciendo y germinando en hipocótilos extensos antes de la dispersión (Qiao et al., 2020). Este modelo reproductivo reportado en diferentes especies vegetales se caracteriza por ser una adaptación necesaria para que las semillas crezcan y se desarrollen en la planta madre, con el fin de asegurar su supervivencia (Batygina, 2005).

Las hormonas vegetales, en particular, las giberelinas y el ácido abscísico han sido relacionados directamente con los procesos de latencia y germinación de semillas en todas las especies de plantas; las primeras como estimulantes y las segundas como inhibidores (Gómez-Castañeda et al., 2003; Fernández-Arbaizar et al., 2002).

Algunos estudios realizados, han generado información acerca del comportamiento de estas fitohormonas, como el ácido abscísico (ABA); que dentro de sus funciones y efectos fisiológicos en las plantas induce al proceso del letargo.

El ABA es una hormona involucrada en la dormancia de semillas para muchas especies favoreciendo la latencia, inhibiendo la germinación y las fases de

absorción de agua (Rodríguez, 2019; Beraud et al., 2016). Tiende a incrementarse con la maduración del fruto y puede estar involucrado en la prevención de la viviparidad y en la inducción de latencia en las semillas. Dicho compuesto es antagónico o contrarresta los efectos de las giberelinas, se presenta en altas concentraciones en las cubiertas seminales y desaparece con la estratificación; tratamiento pre germinativo para semillas en letargo, en el cual las semillas embebidas de agua son sometidas a un periodo de enfriamiento para que se efectúe la postmaduración del embrión y así eliminar esta latencia (De la Cruz et al., 2013), no obstante, la desaparición no necesariamente coincide con el inicio de la germinación (Hartman y Kester, 2001). El contenido de ácido abscísico en las semillas es muy bajo durante la embriogénesis temprana, se incrementa a un máximo hacia la etapa media y tardía del desarrollo del embrión, y después disminuye con la maduración de estas. Aunado a esto, el aumento estándar del contenido de ácido abscísico al inicio y durante la etapa media del desarrollo de la semilla controla la acumulación de proteínas de reserva (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

En mangles, la viviparidad coincide con una reducción de la concentración de ácido abscísico y proteínas (dehidrinas) que protegen las membranas celulares de la desecación, incrementando el transporte de agua al embrión y reduciendo el estrés osmótico, cambios requeridos para el crecimiento continuo y precocidad en el desarrollo de la plántula (Qiao et al., 2020; Hong et al., 2018). En el caso del maíz, existen activadores y represores de proteínas, como el activador transcripcional para viviparidad (VP1), cuya acción es inducir genes específicos, la producción de ácido abscísico, promover la tolerancia a la desecación, reducir el crecimiento del embrión y propiciar la madurez tardía (Carrari, 2001). En *Arabidopsis* la latencia de las semillas se asegura a través de al menos dos procesos secuenciales de desarrollo: la detención del crecimiento embrionario regulado por los genes de tipo FUS3/LEC, y la latencia embrionaria regulada por ABI3 y ácido abscísico (Raz et al., 2001). También, mutantes de *Arabidopsis thaliana*, deficientes de GAs, indican que la biosíntesis de giberelinas activas está regulada negativamente durante el desarrollo de la semilla, evitando así la

germinación precoz (viviparidad) (Raz et al., 2001). Así mismo, se han correlacionado los niveles de expresión de algunos genes como NCED (Nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase), ABA8'-hidroxilasa, ZEP/ABA1 (Zeaxanthin epoxidase/ ABA Deficient 1), SDR/ABA2, AA0, ABA3, ABI3, ABI4 y ABI5 con el mantenimiento y liberación de la dormición, vía catabolismo del ABA (Chen et al., 2020; Fernández, 2009; Cadman et al., 2006; Millar et al., 2006; Xiong & Zhu, 2003).

Por su parte, las giberelinas (GAs) son fitohormonas esenciales en los procesos de desarrollo de la planta, tales como la germinación de semillas, la elongación del tallo, expansión de las hojas, floración y germinación de las semillas. Estando presentes en muchos tejidos vegetativos y florales en bajas concentraciones (Hedden y Phillips, 2000).

Estudios previos han comprobado que los procesos de desarrollo, mediados por giberelinas, están regulados en parte por el cambio de la concentración en las células de GAs activas. Esto indica que las concentraciones de GAs deben ser cuidadosamente moduladas, tal vez mediante la integración de varias señales endógenas y externas (Hedden y Phillips, 2000; Kasahara et al., 2002).

Las giberelinas estimulan la germinación mediante la inducción de la expresión de enzimas hidrolíticas que debilitan las paredes celulares en los tejidos que se oponen a la emergencia radicular (endospermo y cubierta seminal), movilizan las sustancias de reserva de la semilla y estimulan la expansión del cotiledón y la radícula, favoreciendo la vía de transición del desarrollo embriogénico al vegetativo. Dicha estimulación podría estar mediada, por el factor de remodelación de la cromatina PICKLE (PKL) o por la proteína de identidad embrionaria FUSCA3 (FUS3), la cual estimula positivamente la síntesis de ABA y regula negativamente la síntesis de GAs (Narro, 2014; Hernando, 2012; Fernández, 2009).

Algunos estudios, en la vía del metabolismo de las giberelinas, han reportado una serie de genes que controlan su nivel; KS, KO, KAO, GA20ox, GA3ox y GA2ox

(He et al., 2020; Hedden & Thomas, 2012). En *Arabidopsis* GA3ox2, uno de los principales genes implicados en la producción de giberelinas bioactivas (GA1 y GA4), aumenta en semillas almacenadas en seco; mientras que GA2ox1, enzima implicada en la desactivación de giberelinas, es más alta en semillas durmientes (Alejandre, 2020). En algunos cereales se han identificado algunos QTLs (Quantitative Trait Loci) ligados al carácter de la dormancia (SD1 a SD4) y relacionados con el que codifica el enzima GA20 oxidasa, que es la clave en la síntesis de GAs activos (Li et al., 2004). Así mismo, la ruta de señalización de la GAs está mediada por las proteínas DELLA, cuyo nombre deriva de la secuencia de aminoácidos conservada que poseen (D, aspártico; E; glutámico; L, leucina; A, alanina), son proteínas represoras que, en presencia de giberelinas, son degradadas por el proteasoma. En cultivos de cebada, trigo y arroz se han identificado cinco genes que codifican proteínas DELLA: RGA, GAI, RGL1, RGL2 y RGL3, de los cuales RGL2 parece ser el que tiene un mayor papel en la regulación de la germinación (Hernando, 2012; Li et al., 2004).

De acuerdo con los diferentes estudios sobre el desarrollo y germinación de semillas, el grado de latencia y susceptibilidad a la viviparidad es consecuencia del balance entre giberelinas y ácido abscísico y la acción concertada de varios genes. Sin embargo, en nuez pecanera esta información aun es limitada por lo que resulta interesante considerar el estudio de la expresión diferencial de algunos genes durante el desarrollo y la viviparidad de *Carya illinoensis* y dilucidar sobre el papel funcional de dichas fitohormonas.

LITERATURA CITADA

- Alejandro, M. A. (2020). *Interacción entre SPATULA y giberelinas en la determinación del número de óvulos en Arabidopsis thaliana*. <http://hdl.handle.net/10251/136728>
- Almeida G., J. A. (2001). *Efecto de la longitud de brote sobre la viviparidad en la nuez pecanera (Carya illinoensis Koch) variedades Western Schley y Wichita*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna. Coahuila.
- Azcón-Bieto, J. & Talón, M. (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. 2 ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Bainotti, C., Cuniberti, M., Masiero, B., Donaire, G., Gómez, D., Reartes, F., Salines, J., Formica, M., Fraschina, J., Nisi, J., Mir, L. & Berra, O. (2009). Caracterización de cultivares de trigo por brotado en precosecha. *Agriscientia*, 26(1), 29-33.
- Barrera, A. A. A., Guillen, J. A. A., Tamargo, E. M., Rangel, P. P., & Murrieta, A. L. (2017). Efecto de la longitud de los brotes fructíferos de nogal pecanero sobre la producción, calidad de almendra y viviparidad de la nuez. *Agrofaz: publicación semestral de investigación científica*, 17(1), 35-42.
- Batygina, T. B. (2005). Sexual and asexual processes in reproductive systems of flowering plants. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47(1), 51-60.
- Beraud, M. R., Vásquez, N. H., Durán, X. A., Pérez, J. T., Marambio, V. L., & Rubio, C. C. (2016). Effects of gibberellic acid, benzylaminopurine and fluridone on the in vitro germination of *Ugni molinae Turcz* (Myrtaceae). *Gayana. Botánica*, 73(1), 77.
- Cadman, C. S., Toorop, P. E., Hilhorst, H. W., & Finch-Savage, W. E. (2006). Gene expression profiles of *Arabidopsis* Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *The Plant Journal*, 46(5), 805-822. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02738.x>
- Carrari, F. O. (2001). *Participación de los genes VP1 y GA20-oxidasa en el control hormonal de la germinación de semillas* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Casales, F. G., Van der Watt, E., & Coetzer, G. M. (2018). Propagation of pecan (*Carya illinoensis*): a review. *African Journal of Biotechnology*, 17(18), 586-605. doi: 10.5897/AJB2017.16183
- Casillas-Álvarez, P., Reyes-Olivas, Á., Sánchez-Soto, B. H., García-Moya, E., Lugo-García, G. A., & Soto-Hernández, R. M. (2018). Differential germination associated with facultative vivipary in *Stenocereus thurberi*

- (Cactaceae): Climatic correlations in marginal populations in Sinaloa, Mexico. *Acta botánica mexicana*, (123), 51-66. doi: 10.21829/abm123.2018.1250.
- Castillo, I. O., Sangerman-Jarquín, D. M., Vázquez, M. G. C., Jesús Espinoza Arellano, J. D., & Moreno, J. H. N. (2019). The production and commercialization of pecan nut in Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(8), 1797-1808.
- Cota-Sánchez, J. H. (2008). *Evolución de cactáceas en la región del Golfo de California, México*. Estudios de las islas del Golfo de California. Universidad Autónoma de Sinaloa, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Gobierno del Estado de Sinaloa, Culiacán, México, 67-79.
- Chen, K., Li, G., Bressan, R. A., Song, C., Zhu, J. & Zhao Y. (2020). Dinámica, señalización y funciones del ácido abscísico en las plantas. *Journal of Integrative Plant Biology* 62: 25–54. doi: 10.1111/jipb.12899
- De la Cruz C., J., López M., E., Zavaleta S., C., Mendoza M., W. y Gonza C., A. (2013). Efecto de la estratificación en la germinación de semillas del ciruelo europeo, *Prunus domestica*. *Revista REBIOLEST*, 1(1), 49-53.
- Esquer P., L.A. (2010). *Factores que influyen en la productividad del nogal pecanero*. En: XI Simposio Internacional de nogal pecanero 2010.Memoria. Ed. Núñez M., J. H., Grageda G., J., Sabori P., R. y Maldonado N., L.A. (2010). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Hermosillo, Sonora.
- FAO. (2023). *Top 20 Countries Production of Nueces de nogal con cáscara 2021*. FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Consultado en https://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity
- Fernández, R. I. (2009). *El cross-talk etileno/giberelinas y la rotura de la dormición de semillas de Sisymbrium officinale L. provocada por el after-ripening*. Univ Santiago de Compostela.
- Fernández, D. (2021). *Guía fenológica del nogal*. EEA Alto Valle, INTA. 27 (89). Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12123/11105>
- Fernández-Arbaizar, D. O. A., Albertos-Arranz, P., Javier, J., & Regalado, O. L. (2002). *Aislamiento y caracterización de factores transcripcionales relacionados con la germinación y su implicación en la señalización de ácido abscísico y óxido nítrico*. Universidad de Salamanca. Salamanca, España.
- Flores-Córdova, M., Muñoz-Márquez, E., Ojeda-Barrios, D. L., Soto-Parra, J. M., & Preciado-Rangel, P. (2017). Phytochemical composition and antioxidant capacity in Mexican pecan nut. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(5), 346—350. doi: 10.9755/ejfa.EJFA-2016-08-1075.
- García-Moreno, B. Y., Báez-Sañudo, R., Mercado-Ruiz, J. N., García-Robles, J. M., & Núñez-Moreno, J. H. (2020). Bioregulación de la germinación

prematura de nuez pecanera mediante aplicaciones precosecha con ácido 2-hidroxibenzoico. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 21(2).

- Godoy A., C., Reyes J., I., Torres E., C. A., Huitrón R., M. V., Cristian C., J. y Morales V., J. (2000). *Tecnología de riego en nogal pecanero. Etapas y periodos fenológicos del nogal y sus requerimientos de agua*. CELALA, CIRNOC, INIFAP. Matamoros, Coahuila.
- Gómez-Castañeda, J. A., Ramírez, H., Benavides-Mendoza, A., & Encina-Rodríguez, L. I. (2003). Germinación y crecimiento de plántula en chincuya (*Annona purpurea* Moc y Sessé) y su relación con los niveles de giberelinas y ácido abscísico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 9(2), 243-253.
- Gualano, N. A. (2011). *Brotado pre-cosecha y pre-germinado en cebada cervecera: predicción de la susceptibilidad del cultivo basada en el ambiente y manejo pos-cosecha de los granos dañados*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. Argentina.
- Hartman, H. T., & Kester, D. E. (2001). *Propagación de plantas: principios y prácticas*. 8ª reimpresión. Compañía Editorial Continental. México, DF, 64.
- He, J., Xin, P., Ma, X., Chu, J., & Wang, G. (2020). Gibberellin metabolism in flowering plants: an update and perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 11, 532. doi: 10.3389/fpls.2020.00532
- Hedden, P., & Thomas, S. G. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal*, 444(1), 11-25. doi: 10.1042/BJ20120245
- Hedden, P. y Phillips, A. (2000). Gibberellins metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*. 5: 523-530. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01790-8
- Hernando A., S. (2012). *Caracterización molecular del mutante riso 1508 de cebada: modificaciones transcripcionales y posttranscripcionales en el desarrollo de la semilla*. Doctoral dissertation. Centro de Biotecnología y Genómica de plantas. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid.
- Hong, L., Su, W., Zhang, Y., Ye, C., Shen, Y., & Li, Q. Q. (2018). Transcriptome profiling during mangrove viviparity in response to abscisic acid. *Scientific Reports*, 8(1), 1-12. doi: 10.1038/s41598-018-19236-x
- Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y., & Yamaguchi, S. (2002). Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 45188-45194. doi: 10.1074/jbc.M208659200

- Lagarda M., A. (2012). *La germinación prematura de la nuez pecanera (viviparidad)*. Memoria científica, XIII Simposio Internacional de Nogal Pecanero. Hermosillo, Sonora. Pp.58.
- León, G. V. (2014). *Ácido abscísico-giberelinas como indicador de viviparidad en nogal pecanero (Carya illinoensis K.)*. Hermosillo, Sonora, México: CIAD.
- Li, C., Ni, P., Francki, M., Hunter, A., Zhang, Y., Schibeci, D., Li, H., Tarr, A., Wang, J., Carik, M., Yu, J., Bellgard, M., Lance, R. & Appels, R. (2004). Genes controlling seed dormancy and pre-harvest sprouting in a rice-wheat-barley comparison. *Functional & integrative genomics*, 4, 84-93. doi: 10.1007/s10142-004-0104-3
- Martínez T., M. A., Vargas A., I., Aispuro H., E., Corrales M., C., Soto C., F., Vallejo C., S., León G., V. y Núñez M., H. (2014). *Alternativas para el control de la germinación (viviparidad) en la nuez, en la región costera del Estado*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora.
- Martínez G., M. E. (2019). *Análisis de expresión diferencial de genes durante la maduración del fruto de guanábana (Amona Muricata L.) en manejo postcosecha*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nayarit. Xalisco, Nayarit.
- Márquez Ortiz, J., & Ortiz Cereceres, J. (1984). Germinación prematura del maíz *Zea mays* L., en la zona centro de Puebla. *Revista Chapingo*, 9(43-44), 79-86.
- Millar, A. A., Jacobsen, J. V., Ross, J. J., Helliwell, C. A., Poole, A. T., Scofield, G., Reid, J. B. & Gubler, F. (2006). Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *The Plant Journal*, 45(6), 942-954. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2006.02659.x
- Narro D., L. (2014). *Papel de Early Bolting in Short Days (EBS) en la regulación de la dormición de semillas en Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología.
- Pérez-González, S. B., Reyes-Olivas, A., García-Moya, E., Romero-Manzanares, A., García-Nava, J. R., Lugo-García, G. A., & Sánchez-Soto, B. (2015). Seed storage and germination of *Stenocereus thurberi*, a cactus with optional viviparity. *Botanical Sciences*, 93(2), 273-282. doi: 10.17129/botsci.227.
- Poletto, T., Fantinel, V. S., Muniz, M. F. B., & Dutra, A. F. (2019). Tamanho de amostra para caracterização de frutos de *Carya illinoensis*. *Agropecuaria Científica no Semiárido*, 14(2), 103-107.
- Qiao, H., Zhou, X., Su, W., Zhao, X., Jin, P., He, S., Hu, W., Fu, M., Yu, D., Hao, S., Zhang, Y., Wang, W., Ye, C., Li, Q. y Shen, Y. (2020). The genomic

and transcriptomic foundations of viviparous seed development in mangroves. *bioRxiv*. doi:10.1101/2020.10.19.346163

- Ramírez-Estrada, C. A., Legarreta-González, M. A., Macías-López, B. C., Guerrero-Morales, S., & Terrazas-Gómez, M. I. (2020). Prevalencia de mortalidad en Nogal Pecanero, en la región centro sur del estado de Chihuahua. *Revista Biológico-Agropecuaria Tuxpan*, 8(2), 161–169. doi:10.47808/revistabioagro.v8i2.191
- Raz, V., Bergervoet, J. H., & Koornneef, M. (2001). Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development*, 128(2), 243-252. doi: 10.1242/dev.128.2.243
- Reyes-Vázquez, N. C. (2016). Aprovechamiento integral de la nuez pecanera como fuente de fitocompuestos. In Reyes Vázquez, N. C., & Urrea López, R. (Eds.), *Retos y oportunidades para el aprovechamiento de nuez pecanera en México* (pp. 96-109). Guadalajara, Jalisco, México: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Retrieved from https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b790138f4.pdf
- Rodríguez, H. R. (2019). *Efecto del ácido abscísico sobre fenotipo y calidad del fruto en vid Shiraz*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 6(16), 153-158.
- SIAP. (2023). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. Cierre de la producción agrícola por estado. Servicios de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultado en <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Tarango-Rivero, S. H. (2004). *Manejo del nogal pecanero con base en su fenología*. SAGARPA.
- Tarango-Rivero S. H., Olivas Tarango A. L., Rodríguez-Peña C., Longoria-Garza G. A., Santos-Moreno O. O., González-Rojas L. E. y Reyes-Vázquez N del C. (2019). *Problemáticas y acciones en el cultivo del nogal*. En: Reyes-Vázquez N del C. y Morales-Landa J. L. (2019). *Agronomía sustentable y aprovechamiento alternativo de la nuez*. México: CIATEJ.
- Urrea L., R. y Urzúa E., E. (2016). *Retos y oportunidades en la producción de nuez pecanera en México*. Cap. 1. pp. 1-53. En Reyes V., N. C. y Urrea L., R. 2016. *Retos y Oportunidades para el aprovechamiento de la Nuez pecanera en México*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). Guadalajara, Jalisco.
- Vernieri, P., Perata, P., Lorenzi, R., & Ceccarelli, N. (1989). Abscisic acid levels during early seed development in *Sechium edule* Sw. *Plant physiology*, 91(4), 1351-1355.
- Vieira de F., F. A., Chávez S., N., Núñez M., J. H., Valdez G., B., Pérez L., A., Velarde F., I., Tarango R., S. y Cuéllar V. E. (2015). *Avances en estudio fenológico sobre efecto del cambio climático en nogal pecanero*. Memoria

Científica No. 6. XVI Simposio Internacional de Nogal Pecanero.
Hermosillo, Sonora.

- Villa H., J. M. V. (2006). *Expresión de Sbv1 y SbGA20-oxidasa en las líneas de sorgo Redland b2 e is9530 cultivadas en México* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma Metropolitana). México, D. F.
- Wells, L. (2017). *Southeastern pecan growers' handbook*. Georgia, USA: Cooperative Extension Service, University of Georgia College of Agricultural & Environmental Sciences.
- Wood, B. (2015). Regulation of vivipary in pecan. *Acta Horticulturae*, 1070, 33–42. doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1070.3
- Xiong, L., & Zhu, J. K. (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant physiology*, 133(1), 29-36. doi: 10.1104/pp.103.025395

CAPÍTULO III

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE PRIMERS PARA ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA VIVIPARIDAD DE LA NUEZ PECANERA (*Carya illinoensis*)

RESUMEN

La mayoría de los trabajos de investigación relacionados con los perfiles de expresión génica evalúan la calidad de los oligonucleótidos utilizados. Por lo que es imprescindible su diseño, particularmente en ausencia de primers de referencia como es el caso de la nuez pecanera, en que los estudios existentes se han centrado principalmente en el mejoramiento genético y el análisis de genes relacionados con estrés salino, floración, flavonoides y alergenitos. En este sentido, el objetivo del presente estudio fue diseñar primers a partir de secuencias génicas relacionadas con las fitohormonas o precursores de la biosíntesis del ácido abscísico y las giberelinas que permitan el estudio de la viviparidad en nuez pecanera. Actualmente se cuenta con la secuencia del genoma completo de *Carya illinoensis* (CM028997.1), la cual en conjunto con herramientas bioinformáticas y técnicas de PCR se utilizó para el diseño y evaluación de primers adecuados para evaluar la expresión génica en el proceso de germinación prematura de la nuez. De los primers diseñados se seleccionaron aquellos que cumplieron con las características convenientes para ser usados en ensayos de PCR punto final: tamaño del primer, tamaño del producto amplificado, temperatura de alineamiento, contenido G/C, formación de estructuras secundarias y especificidad. Finalmente, fueron sintetizados químicamente para su posterior uso en ensayos de PCR. El uso de herramientas bioinformáticas permitió obtener primers con características propicias para ser utilizados en el estudio de la viviparidad de la nuez mediante ensayos de RT-PCR. La información descrita en este trabajo representa la base para futuras investigaciones sobre la expresión de genes implicados en la viviparidad de la nuez.

Palabras clave: ácido abscísico, bioinformática, ácido giberélico, oligonucleótidos.

Tesis de Doctorado en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente en Zonas Áridas, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Mayela Rodríguez González

Director de Tesis: Dr. Jesús Guadalupe Arreola Ávila

**DESIGN AND EVALUATION OF PRIMERS TO ESTIMATE GENE
EXPRESSION DURING VIVIPARITY OF THE PECAN (*Carya illinoensis*)**

ABSTRACT

Most of the research papers related to gene expression profiles evaluate the quality of the oligonucleotides used. Therefore, its design is essential, particularly in the absence of reference primers such as the pecan nut, in which existing studies have focused mainly on genetic improvement and the analysis of genes related to salt stress, flowering, flavonoids and allergens. In this sense, the objective of this study was to design primers from gene sequences related to phytohormones or precursors of the biosynthesis of abscisic acid and gibberellins that allow the study of viviparity in pecan nuts. Currently, the complete genome sequence of *Carya illinoensis* (CM028997.1) is available, which, together with bioinformatics tools and PCR techniques, was used for the design and evaluation of suitable primers to evaluate gene expression in the process of premature germination of the walnut. Of the designed primers, those that met the appropriate characteristics to be used in endpoint PCR assays were selected: primer size, amplified product size, alignment temperature, G/C content, formation of secondary structures, and specificity. Finally, they were chemically synthesized for their subsequent use in PCR assays. The use of bioinformatics tools allowed obtaining primers with favorable characteristics to be used in the study of pecan viviparity through RT-PCR assays. The information described in this work represents the basis for future research on the expression of genes involved in nut viviparity.

Keywords: abscisic acid, bioinformatics, gibberellic acid, oligonucleotides.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de PCR por su relativa facilidad para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos se han adoptado ampliamente en la investigación científica para el estudio de expresión génica en diversos organismos (Remans et al., 2014). Los niveles de expresión génica se pueden reportar de forma absoluta o relativa. En el primer caso se calcula el número de copias presente usando como referencia una curva estándar. En el segundo caso se toma como referencia uno o más genes calibradores, contra los cuales se compara la expresión de otros genes (Cuevas-Reyes et al., 2016).

La eficiencia y éxito de la PCR depende de componentes fundamentales como un pipeteo exacto y preciso, obtención de ácidos nucleicos de alta calidad, una estimación precisa de la concentración de ácidos nucleicos y el diseño adecuado de oligonucleótidos iniciadores o primers, fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN (De La Fuente et al., 2018), en los cuales debe haber un balance entre especificidad y eficiencia ya que actúan como punto de partida y unión para la polimerasa durante la síntesis de ADN del fragmento a amplificar (Hernández y Valdez, 2018). Cualquier variación en estos factores puede influir en la exactitud y precisión de los resultados.

La eficiencia de los primers se refiere al nivel en que el proceso de amplificación ocurre de manera exponencial durante la reacción de PCR (Cuevas-Reyes et al., 2016). Los factores más importantes que se deben tener en cuenta son formación de dímeros o estructuras secundarias, autocomplementariedad en alguna base o el plegado inespecífico, Temperatura de fusión (T_m) entre oligonucleótidos y el porcentaje de Guaninas/Citosinas (BIOSOFT, 2023).

Carya illinoensis, es uno de los cultivos de mayor importancia económica en el Norte de México. Recientemente, la viviparidad o germinación prematura ha causado importantes pérdidas económicas debido a que se reduce la calidad de la nuez y disminuye el total de la producción (Wood, 2015). Este fenómeno ha

sido asociado a la interacción de una serie de factores de tipo genético-ambiental. Es decir, del balance que existe entre la acción de las fitohormonas ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA), entendiendo que el balance hormonal está determinado por las concentraciones endógenas de estas hormonas y por la sensibilidad de los tejidos a estos compuestos (Villa, 2006).

En los últimos años, la mayoría de las investigaciones sobre *Carya Illinoensis* se han centrado principalmente en su comportamiento con respecto a variables ambientales (Núñez-Colima et al., 2019), formas de propagación (Casales et al., 2018), extracción y composición de aceite de nuez (Rábago-Panduro et al., 2021), actividad antioxidante de la nuez (Kellett et al., 2019), efectos del uso de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas en el crecimiento y desarrollo de nogal (Shi et al., 2022) y la respuesta fisiológica, bioquímica y molecular del desarrollo y producción de nuez bajo estrés salino (Zhang et al., 2021).

Se sabe que el ácido abscísico y giberelinas, son hormonas vegetales involucradas en diferentes procesos fisiológicos de las plantas y pueden actuar como reguladores endógenos controlando diversos procesos del desarrollo como la germinación, la elongación del tallo, expansión de hojas, desarrollo de los tricomas y la inducción de flores y frutos (Carranza et al., 2016). Sin embargo, aunque estas hormonas, tienen un papel relevante en la germinación de semillas aún se desconocen la mayoría de los mecanismos implicados en su actuación. Las rutas de biosíntesis del ABA y las GA involucran la participación de muchas enzimas que intervienen en la síntesis de un compuesto a partir de otro, la expresión de genes que codifican para estas enzimas depende en gran parte del medio ambiente y condiciones de estrés en que se encuentre la planta (Jordán & Casaretto, 2006).

La función de los genes se puede predecir mediante el análisis de los perfiles de expresión génica (Yang et al., 2022). Diversos estudios han evaluado los perfiles de expresión génica frente al desarrollo y germinación de semillas (Rosabal et al., 2014; Matilla, 2008; Rubio-Somoza, 2005), sin embargo, en nuez pecanera

aún es limitada la información existente. La mayoría de los trabajos de investigación valoran la calidad de los oligonucleótidos utilizados. En algunos casos, con los reactivos utilizados y bajo condiciones de laboratorio se obtienen resultados distintos a los previamente reportados, por lo que resulta primordial evaluar cada par de oligonucleótidos bajo las condiciones de cada laboratorio, de manera que los resultados obtenidos reflejen de manera confiable la respuesta biológica que se está presentando durante la interacción de diversos organismos (Cuevas-Reyes et al., 2016).

Por lo tanto, con el objetivo de contar con primers con un desempeño adecuado para el estudio molecular de la viviparidad en nuez pecanera, a través de la secuencia genómica de *Carya illinoensis* y el uso de herramientas bioinformáticas se diseñaron primers relacionados con las fitohormonas ácido abscísico y giberelinas y se evaluaron mediante PCR punto final.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño *in silico* de los oligonucleótidos

Debido a que no existe información relacionada con los genes involucrados en la viviparidad de la nuez, se utilizó la secuencia del genoma completo de *Carya illinoensis* cultivar 87MX3-2.11 (CM028997.1) (Platts et al., 2021), obtenida a través del GenBank del Centro Nacional para la Información para Biotecnológica (NCBI). A partir de dicha secuencia se utilizaron seis secuencias codificantes para las enzimas ácido abscísico y giberelinas, además del gen de referencia actina, los cuales se muestran en el cuadro 1. El diseño de los primers fue a través de la herramienta PrimerQuest Tool disponible en la plataforma online IDT (Integrated DNA Technologies). De los primers creados se seleccionaron aquellos que cumplían con las características apropiadas: tamaño del producto amplificado, temperatura de alineamiento y contenido de guaninas y citosinas. Una vez elegidos, se procedió al análisis de calidad para descartar la formación de estructuras secundarias de cada oligonucleótido mediante la herramienta OligoEvaluatorTM dentro de la plataforma de Sigma Aldrich

(<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>). Para cada par de oligonucleótidos se evaluó su especificidad mediante el sitio web de Nucleotide-BLAST, para determinar la complementariedad de las bases nucleotídicas y considerar la homología con otros géneros o especies. Finalmente, los primers diseñados fueron sintetizados por la compañía IDT (Integrated DNA Technologies, Inc. USA).

Evaluación de la eficiencia de amplificación

Para evaluar la eficiencia de cada par de primers se realizó una validación mediante la amplificación de ADNc de primera cadena por RT-PCR. Dicho proceso se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Se inició con 100 mg de tejido embrionario de nuez madura y nuez germinada previamente homogeneizado mediante maceración con nitrógeno líquido. Las muestras de nuez pecanera utilizadas se obtuvieron de una plantación de nogal pecanero cv. Western, de 48 años. Las nueces fueron colectadas completamente al azar durante la etapa de maduración en septiembre del 2020. Para su análisis, las nueces fueron separadas del árbol, envueltas en papel aluminio y puestas en hielo inmediatamente, y almacenadas a -20 °C para su posterior uso.

La extracción de ARN total se realizó utilizando el método CTAB 4, reportado en Rodríguez-González *et al.* (2023). La concentración de ARN se cuantificó por espectrofotometría utilizando un equipo Nanodrop (Thermo scientific) mediante la densidad óptica a 260 nm. La pureza fue confirmada por la relación de los índices de absorbancia a 260 y 280 nm ($A_{260/280}$) así como a 260 y 230 nm ($A_{260/230}$) para evaluar la presencia de proteínas o compuestos fenólicos, respectivamente. Y la integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa-MOPS-formaldehído, a 50 volts durante 45 min, utilizando como tampón de electroforesis MOPS 1X. Se utilizó Gel Red® (Biotium, Hayward, CA, USA) para tinción del ARN. Los geles fueron visualizados con luz ultravioleta en un fotodocumentador UVP® MultiDoc It Imaging System. Conjuntamente, el ARN

fue tratado con DNasa I (libre de RNasa) (Invitrogen, Waltham, MA, USA) según las especificaciones del fabricante, para eliminar el ADN genómico restante.

La calidad del ARN total extraído se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR). Todas las muestras se trataron con DNasa I (libre de RNasa) (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) según las especificaciones del fabricante y luego se retrotranscribieron a ADNc de primera cadena mediante el uso de un cebador Oligo-(dT) y Transcriptasa Reversa M-MLV RT (Promega, Fitchburg, WI, EUA) siguiendo las indicaciones del proveedor. El ADNc se amplificó utilizando la enzima Taq polimerasa (Jena Bioscience, Dortmund, Alemania) con las especificaciones del fabricante. Se utilizaron los primers diseñados (Cuadro 1). Para una reacción estándar de RT-PCR de 25 μ L, se utilizaron 40 ng· μ L⁻¹ de ARN total. El programa de amplificación por PCR incluyó una desnaturalización inicial de 2 min a 92 °C; posteriormente, 35 ciclos que comprenden las etapas siguientes: desnaturalización a 95 °C durante 15 s, alineamiento 55 °C durante 15 s y extensión 72 °C durante 1 min 30 s; y una extensión final de 2 min a 72 °C. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 2 %, teñidos con Gel Red® (Biotium, Hayward, CA, EUA), a 75 V durante 45 min y se visualizaron con luz ultravioleta en un fotodocumentador UVP® MultiDoc It Imaging System.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hasta la fecha, el diseño de primers ha sido implementado exitosamente, permitiendo reducir los costos, además de tener un control personalizado y completo sobre el experimento de PCR (De La Fuente et al., 2018). En el presente estudio, el uso de herramientas bioinformáticas permitió obtener primers con características propicias para ser usados en el estudio de la viviparidad de la nuez mediante ensayos de PCR punto final.

Primers diseñados

Con base en el análisis realizado a partir del transcriptoma de *Carya illinoensis* y datos referentes a la ruta de síntesis de las fitohormonas ácido abscísico y giberelinas se obtuvieron siete pares de primers candidatos para el análisis molecular de la viviparidad en nuez pecanera. De estos, cuatro corresponden a enzimas precursoras de ácido abscísico, dos a giberelinas y uno al gen constitutivo Actina (Cuadro 1).

Cuadro 1. Lista de primers para PCR punto final diseñados y seleccionados para el estudio molecular de la viviparidad en nuez pecanera.

Nombre	Enzima	Secuencia (5' -> 3')
GA3ox1-F	Giberelina	CTGTCCACCTGTGCCATAAA
GA3ox1-R		CGAGCCTACGACGGTAAATC
GA2ox2-F	Giberelina	CATCATTGGCTGGCAGATTTTC
GA2ox2-R		TGGGAGGTTTAAGAGTGTGAAG
ABA 8H-F	Ácido abscísico	GAGAGAGAGAGGCTGCTACATTTG
ABA 8H-R		ATGTTTGGGTCTTGAGAGTAGAG
AOG-F	Ácido abscísico	CTTCACCTTCTCCACTCGATTT
AOG-R		GGACAGAAGGCTTGGGTTATAG
ZEP-F	Ácido abscísico	GAAACTTGGGCAAAGGGAATG
ZEP-R		CTTGTTGTACCCACCCTGATAG
ABA2-F	Ácido abscísico	CCCTCCTTATACGCACTGTAAC
ABA2-R		TCCTCAGCAACCTCCAAATC
Actina-F	Actina	CGATGCCCTGAGGTTCTATTC
Actina-R		GATCCTCCAATCCAGACACTATAC

GA3ox1: Gibberellin 3-beta-hydroxylase, GA2ox2: Gibberellin 2-beta-dioxidase 2-related, ABA 8H: Abscisic acid 8'-hydroxylase, AOG: Abscisate beta-glucosyltransferase, ZEP: Zeaxanthin epoxidase y ABA2: Zeaxanthin epoxidase chloroplastic. F: Forward Primer, R: Reverse Primer.

Los primers fueron seleccionados mediante el diseño *in silico* y teniendo en cuenta las características idóneas para ser usados en ensayos de PCR (Cuadro 2). Para garantizar que los primers seleccionados amplifican la región genómica de interés, se evaluó la especificidad para la detección y amplificación de cada gen. En general, cada par de oligonucleótidos, produjeron un porcentaje de identidad y de cobertura de la secuencia diana del 100 %, y un Valor E cercano a cero, esta medida es más significativa cuanto más cerca de 0.0 esté, lo cual indica alta similitud de la secuencia con el gen (De La Fuente et al., 2018). La mayoría los primers presenta nula probabilidad de formar estructuras secundarias, excepto el primer ZEP el cual puede producir estructuras secundarias débiles, sin embargo, esto no implica un riesgo a considerar en las reacciones de PCR ya que su temperatura de fusión (T_m) es mayor a los 60 °C.

Adicionalmente, es importante considerar parámetros como el contenido de las bases nitrogenadas citosina y guanina (% G/C), el cual debe estar entre 40 y 60 %, la temperatura de fusión (T_m) con valores de referencia de 52-58 °C y el tamaño óptimo de la longitud del amplicón es de 18-25 pb (BIOSOFT, 2023; Hendling & Barišić, 2019; Tamay de Dios et al., 2013). En este estudio se consideró un porcentaje de G/C de 45 a 55%, y las temperaturas de fusión se encontraron en el intervalo de 50 a 55 °C. Finalmente, la longitud del amplicon se consideró un tamaño entre 20-24 pb con una diferencia de longitud máxima de 5 nucleótidos.

Los primers diseñados en este trabajo, al presentar una alta especificidad y sensibilidad cumplen con las características apropiadas para ser utilizados en estudios de investigación y diagnóstico (Guevara, 2022) sobre el proceso de desarrollo y viviparidad de la nuez pecanera.

Cuadro 2. Características de los primers diseñados y seleccionados para el estudio de la expresión de ABA y GA en nuez pecanera, mediante PCR punto final.

Nombre	Tm (°C)	GC (%)	Longitud (pb)	Amplicón esperado (pb)	Estructuras secundarias	Cobertura (%)	Valor E	Identidad (%)
GA3ox1-F	55.0	50.0	20	398	No	100	0.0006	100
GA3ox1-R	55.2	55.0	20					
GA2ox2-F	54.6	47.6	21	243	No	100	0.0002	100
GA2ox2-R	54.3	45.5	22					
ABA 8H-F	54.7	47.8	23	206	No	100	0.00002	100
ABA 8H-R	54.0	43.5	23					
AOG-F	54.6	45.5	22	277	No	100	0.00005	100
AOG-R	55.0	50.0	22					
ZEP-F	54.7	47.6	21	258	Débil	100	0.043	95.24
ZEP-R	54.9	50.0	22					
ABA2-F	54.9	50.0	22	333	No	100	0.00005	100
ABA2-R	54.8	50.0	20					
Actina-F	55.0	52.0	21	266	No	100	0.0002	100
Actina-R	54.3	45.8	24					

Tm: Temperatura de fusión, %GC: porcentaje de Guanina y Citosina, pb: pares de bases

Amplicones obtenidos por PCR de punto final

De acuerdo con los resultados obtenidos de la validación mediante PCR punto final se tiene la certeza de que el diseño de primer fue adecuado (Figura 1). La amplificación de los primer diseñados muestra bandas de buena intensidad y corresponden al tamaño esperado de cada amplicon, presentando una alta especificidad. De los seis pares de primers seleccionados, ABA2, ABA8H, AOG, GA2ox2 y GA3ox1 mostraron un buen desempeño tanto en nuez germinada como en nuez madura. Mientras ZEP mostro un buen desempeño solo en nuez madura y genero un producto de amplificación muy tenue en nuez germinada, esto podría reflejar el papel de la zeaxantina epoxidasa en la regulación de la biosíntesis de ABA el cual aumenta conforme se alcanza la maduración y dormancia de las semillas y disminuye durante el proceso de germinación (Audran et al., 2001).

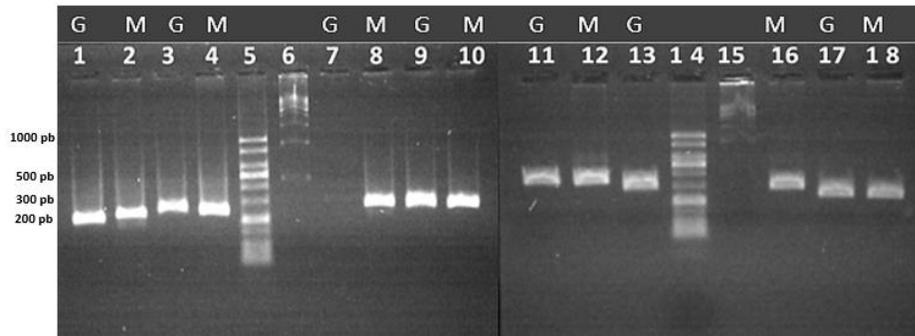


Figura 1. Amplificación de muestras de nuez pecanera germinada (G) y madura (M), con los primers ABA8H (pocillo 1 y 2), GA2ox2 (pocillo 3 y 4), ZEP (pocillo 7 y 8), Actina (pocillo 9 y 10), GA3ox1 (pocillo 11 y 12), ABA2 (pocillo 13 y 16) y AOG (pocillo 17 y 18). Pocillo 5 y 14 corresponden al marcador de bajo peso molecular de 50 pb y pocillo 6 y 15 corresponden al marcador de peso molecular de 500 pb ambos de Jena Bioscience.

Las hormonas vegetales ácido abscísico y giberelinas han sido objeto de estudio en varias investigaciones. Se ha determinado que tanto el ácido abscísico como las giberelinas son hormonas necesarias para el crecimiento del embrión a lo largo del desarrollo de este (Fernández, 2009). Así, el ABA disminuye debido al catabolismo de ABA 8H (Abscisic acid 8'-hydroxylase) en las semillas (Okamoto *et al.*, 2009), mientras el gen AOG (Abscisate beta-glucosyltransferase) regula la desactivación/activación del ABA en las plantas y su expresión esta inducida por ABA exógeno o estrés osmótico (Félix *et al.*, 2019). El gen ABA2 (Zeaxanthin epoxidase chloroplastic) es un alcohol deshidrogenasa y la mutación en este da como resultado el bloqueo de la xantoxina a aldehído, un paso clave implicado en la biosíntesis de ABA que resulta en una baja producción de este (Tawab, 2020). Y ZEP (zeaxantina epoxidasa) ha sido relacionado con el mantenimiento de la dormición y liberación de la vía de catabolismo de ABA (Fernández, 2009). Mientras que GA3ox1 (Gibberellin 3-beta-hydroxylase) es uno de los principales genes implicados en la producción de giberelinas bioactivas (Fernández, 2009) y GA2ox2 (Gibberellin 2-beta-dioxidase 2-related) está relacionado con la inactivación de la síntesis de giberelinas (Wang *et al.*, 2021).

CONCLUSIONES

Se logró el diseño adecuado de primers de *Carya illinoensis*, que amplifican para enzimas relacionadas con las fitohormonas ácido abscísico y giberelinas implicadas en el desarrollo y germinación de semillas.

Los pares de primer diseñados funcionaron de manera adecuada siendo una alternativa para el estudio de la viviparidad en nuez pecanera.

El diseño y análisis de oligonucleótidos a través de plataformas bioinformáticas, es una alternativa que permite obtener y seleccionar primers potenciales para el estudio de la expresión de genes mediante ensayos de PCR.

La información descrita en este trabajo sirve de base para futuras investigaciones más amplias sobre la expresión de genes implicados en la germinación prematura de la nuez.

LITERATURA CITADA

- Audran, C., Liotenberg, S., Gonneau, M., North, H., Frey, A., Tap-Waksman, K., Vartanian N. y Marion-Poll, A. (2001). Localización y expresión del ARNm de la zeaxantina epoxidasa en *Arabidopsis* en respuesta al estrés por sequía y durante el desarrollo de la semilla. *Biología vegetal funcional*, 28(12), 1161-1173. doi: 10.1071/PP00134
- BIOSOFT. (2023). Primer Design Guide for PCR: Learn Designing Primers for PCR. Recuperado el 23 de febrero del 2023 de http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html
- Casales, F. G., Van der Watt, E., & Coetzer, G. M. (2018). Propagation of pecan (*Carya illinoensis*): a review. *African Journal of Biotechnology*, 17(18), 586-605. doi:10.5897/AJB2017.16183
- 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. Doi: 10.17584/rcch.2016v10i2.5791
- Cuevas-Reyes, E., Carrillo-Morales, M., Trevino-Quintanilla, L. G., Aparicio-Frabre, R., & Hernandez-Romano, J. (2016). Oligonucleotides evaluation for measuring gene expression during tomato bacterial wilt. *Revista fitotecnia mexicana*, 39(2), 141-150. Retrieved: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802016000200141&script=sci_abstract&tlng=en
- De La Fuente, A., Romero Calle, D. X., Cárdenas Alegría, O., y Álvarez Aliaga, M. T. (2018). Diseño y evaluación de primers in silico del gen E1 del virus de chikungunya para Real-Time PCR (qPCR). *Revista CON-CIENCIA*, 6(1), 107-124. Retrieved: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2310-02652018000100011&script=sci_arttext
- Félix, K., Su, J., Lu, R., Zhao, G., Cui, W., Wang, R., Mu, H., Cui, J. & Shen, W. (2019). Hydrogen-induced tolerance against osmotic stress in alfalfa seedlings involves ABA signaling. *Plant and Soil*, 445(1), 409-423. doi:10.1007/s11104-019-04328-y
- Fernández, R. I. (2009). *El cross-talk etileno/giberelinas y la rotura de la dormición de semillas de Sisymbrium officinale* L. provocada por el after-ripening. Univ Santiago de Compostela.
- Guevara G., K. J. (2022). *Diseño y validación in silico de primers para la amplificación del Gen GSTM*. Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Carrera de Ingeniería Bioquímica.

- Hendling, M., & Barišić, I. (2019). In-silico design of DNA oligonucleotides: challenges and approaches. *Computational and structural biotechnology journal*, 17, 1056-1065. doi: .1016/j.csbj.2019.07.008
- Hernández F., C. y Valdez M., R. (2018). Análisis de iniciadores con herramientas bioinformáticas libres en línea. *Temas de Ciencia y Tecnología*. Vol.22. No. 64. Pp. 5-19. ISSN 2007-0977.
- IDT. (2013). Cómo diseñar primers y sondas para PCR y qPCR. Recuperado el 23 de febrero de 2023 de <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/designing-pcr-primers-and-probes>
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). *Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico*. Fisiología Vegetal (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.)16. Fisiología vegetal. Ediciones Universidad de La Serena, Chile.
- Kellett, M. E., Greenspan, P., Gong, Y., & Pegg, R. B. (2019). Cellular evaluation of the antioxidant activity of US Pecans [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. *Food chemistry*, 293, 511-519. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.04.103
- Matilla, A. J. (2008). *Desarrollo y germinación de las semillas*. Fundamentos de fisiología vegetal. 2, 549.
- Núñez Colima, J. A., Moreno Reséndez, A., Valenzuela Núñez, L. M., Rodríguez Martínez, R., González Torres, A., García De La Peña, C., Esparza Rivera, J. R. y Molina Ochoa, J. (2019). Influencia de variables climáticas en el contenido de N en *Carya illinoensis* Koch. *Nova scientia*, 11(22), 207-223. doi: 10.21640/ns.v11i22.1823
- Okamoto, M., Tanaka, Y., Abrams, S. R., Kamiya, Y., Seki, M., & Nambara, E. (2009). High humidity induces abscisic acid 8'-hydroxylase in stomata and vasculature to regulate local and systemic abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 149(2), 825-834. doi: 10.1104/pp.108.130823
- Platts, A., Shu, S., Wright, S., Barry, K., Edger, P., Pires, J. C. & Schmutz, J. (2021). *Carya illinoensis* cultivar 87MX3-2.11 chromosome 1 genomic scaffold, whole genome shotgun sequence. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MU179928.1>
- Qiu, L., Jiang, B., Fang, J., Shen, Y., Fang, Z., Rm, S. K., Yi, K., Shen, C., Yan, D. & Zheng, B. (2016). Analysis of transcriptome in hickory (*Carya cathayensis*) and uncover the dynamics in the hormonal signaling pathway during graft process. *BMC genomics*, 17(1), 1—13. doi: 10.1186/s12864-016-3182-4
- Rábago-Panduro, L. M. (2021). *Evaluation of compositional changes in pecan nuts during storage and the use of pulsed electric fields as an aid to enhance oil extraction yield*. Tesis Doctoral. Tecnológico de Monterrey.

- Remans, T., Keunen, E., Bex, G. J., Smeets, K., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2014). Reliable gene expression analysis by reverse transcription-quantitative PCR: reporting and minimizing the uncertainty in data accuracy. *The Plant Cell*, 26(10), 3829-3837. doi: 10.1105/tpc.114.130641
- Rodríguez-González, M., Arreola-Ávila, J. G., Ávila-Rodríguez, V., García-González, F., Quezada-Rivera, J. J., Mota-Ituarte, M. S., & Borja-de la Rosa, A. (2023). Protocols for extraction of total RNA from pecan nut (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) embryo tissue. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 29(1), 131–145. doi: 10.5154/r.rchscfa.2022.08.057
- Rosabal A., L., Martínez G., L., Reyes G., Y., Dell'Amico R., J., & Núñez V., M. (2014). Aspectos fisiológicos, bioquímicos y expresión de genes en condiciones de déficit hídrico. Influencia en el proceso de germinación. *Cultivos Tropicales*, 35(3), 24-35.
- Rubio-Somoza, I. (2005). Factores transcripcionales mybr1 en el desarrollo y germinación de la semilla de la cebada. Doctoral dissertation, Universidad Politécnica de Madrid.
- Shi, J. W., Lu, L. X., Shi, H. M., & Ye, J. R. (2022). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth and soil microbial community of *Carya illinoensis*. *Current Microbiology*, 79(11), 352. doi: 10.1007/s00284-022-03027-9
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78. Retrieved: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/publicaciones.cgi?IDREVISTA=279>
- Tawab, F., Munir, I., Nasim, Z., Khan, M. S., Tawab, S., Nasim, A., Iqbal, A., Ahmad, M. A., Ali, W., Munir, R., Munir, M. & Asim, N. (2020). Identification and characterization of a novel multi-stress responsive gene in *Arabidopsis*. *Plos one*, 15(12), e0244030. doi: 10.1371/journal.pone.0244030
- Villa H., J. M. V. (2006). *Expresión de Sbvp1 y SbGA20-oxidasa en las líneas de sorgo Redland b2 e is9530 cultivadas en México* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma Metropolitana). México, D. F.
- Wang, Y., Zhang, J., Sun, M., He, C., Yu, K., Zhao, B., Li, R., Li, J., Yang, Z., Wang, X., Duan, H., Fu, J., Liu, S., Zhang, X. & Zheng, J. (2021). Multi-omics analyses reveal systemic insights into maize vivipary. *Plants*, 10(11), 2437. Doi: 10.3390/plants10112437
- Wood, B. W. (2015). Regulation of vivipary in pecan. *Acta Horti*, 1070, 33-42. doi: 10.17660/ActHortic.2015.1070.3

- Yang, B., Yao, X., Zeng, Y., & Zhang, C. (2022). Genome-wide identification, characterization, and expression profiling of AP2/ERF superfamily genes under different development and abiotic stress conditions in pecan (*Carya illinoensis*). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 2920. doi: 10.3390/ijms23062920
- Zhang, J., Jiao, Y., Sharma, A., Shen, D., Wei, B., Hong, C., Zheng, B. & Pan, C. (2021). Transcriptomic analysis reveals potential pathways associated with salt resistance in pecan (*Carya illinoensis* K. Koch). *Journal of Biotechnology*, 330, 17-26. doi: 10.1016/j.jbiotec.2021.02.001

CAPÍTULO IV

PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL A PARTIR DEL TEJIDO EMBRIONARIO DE NUEZ PECANERA (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch)



<https://revistas.chapingo.mx/forestales/article/view/r.rchscfa.2022.08.057>

<https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2022.08.057>

Tesis de Doctorado en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente en Zonas Áridas,
Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Mayela Rodríguez González
Director de Tesis: Dr. Jesús Guadalupe Arreola Ávila

Protocols for extraction of total RNA from pecan nut (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) embryo tissue

Protocolos de extracción de ARN total a partir del tejido embrionario de nuez pecanera (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch)

Mayela Rodríguez-González¹; Jesús G. Arreola-Ávila¹; Verónica Ávila-Rodríguez²; Fabian García-González¹; Jesús J. Quezada-Rivera^{2*}; María del S. Mota-Ituarte¹; Amparo Borja-de la Rosa³

¹Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. km 40 Carretera Torreón-Chihuahua. C. P. 35230. Bermejillo, Durango, México.

²Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Biológicas. Fracc. Universidad, Filadelfia. C. P. 35010. Gómez Palacio, Durango, México.

³Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. Carretera México- Texcoco km 38.5. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

*Corresponding author: josafath.quezada@ujed.mx; tel.: 871 715 2077

Abstract

Introduction: Gene expression studies require extraction protocols that allow obtaining high quality RNA, especially when working with tissues rich in polysaccharides, lipids and polyphenols such as pecan nut (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) embryo tissue.

Objective: To evaluate the efficiency of eight methods of total RNA extraction from pecan nut embryo tissue.

Materials and methods: Eight total RNA extraction protocols based on TRI Reagent[®], CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) buffer and a commercial kit were evaluated. Total RNA yield and quality were determined by spectrophotometry (UV/visible). RNA viability and integrity were analyzed by RT-PCR using actin as a reference gene.

Results and discussion: Extraction protocols based on TRI Reagent[®] provided high concentrations of total RNA, but with a high degree of contamination. The commercial kit was used to extract total RNA, but without the expected optimal purity. Finally, protocols based on CTAB buffer achieved total RNA yields of optimal quality.

Conclusions: The quality of total RNA varies according to the efficiency of the method used. The CTAB 4 protocol represents an efficient alternative for the isolation of RNA from embryonic tissues of *C. illinoensis*.

Keywords: pecan nut; ribonucleic acid; cetyltrimethylammonium bromide; polyphenols; reverse transcription PCR.

Resumen

Introducción: Los estudios de expresión génica requieren protocolos de extracción que permitan la obtención de ARN de alta calidad, especialmente cuando se trabaja con tejidos ricos en polisacáridos, lípidos y polifenoles como el tejido embrionario de nuez pecanera (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch).

Objetivo: Evaluar la eficiencia de ocho métodos de extracción de ARN total a partir de tejido embrionario de nuez pecanera.

Materiales y métodos: Se evaluaron ocho protocolos de extracción de ARN total basados en el reactivo TRI Reagent[®], *buffer* CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y un kit comercial. El rendimiento y calidad de ARN total se determinaron por espectrofotometría (UV/visible). La viabilidad e integridad del ARN se analizó mediante RT-PCR utilizando actina como gen de referencia.

Resultados y discusión: Los protocolos de extracción basados en el reactivo TRI Reagent[®] permitieron la obtención de concentraciones altas de ARN total, pero con grado elevado de contaminación. Mediante el uso del kit comercial fue posible la extracción de ARN total, pero sin la pureza óptima esperada. Finalmente, los protocolos basados en el *buffer* CTAB consiguieron rendimientos de ARN total de calidad óptima.

Conclusiones: La calidad del ARN total varía de acuerdo con la eficiencia del método utilizado. El protocolo CTAB 4 representa una alternativa eficaz para el aislamiento de ARN de tejidos embrionarios de *C. illinoensis*.

Palabras clave: nogal pecanero; ácido ribonucleico; bromuro de cetiltrimetilamonio; polifenoles; PCR de transcripción inversa.

Please cite this article as follows (APA 6): Rodríguez-González, M., Arreola-Ávila, J. G., Ávila-Rodríguez, V., García-González, F., Quezada-Rivera, J. J., Mota-Ituarte, M. S., & Borja-de la Rosa, A. (2023). Protocols for extraction of total RNA from pecan nut (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) embryo tissue. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 29(1), 131–145. doi: <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2022.08.057>

Received: August 9, 2022 / Accepted: December 5, 2022.



<https://revistas.chapingo.mx/forestales>

Introduction

Pecan nut (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch), due to its extensive climatic adaptation and high profitability, is a widely cultivated species in northern Mexico (Cruz-Álvarez et al., 2020; Orona Castillo, Sangerman-Jarquín, Fortis Hernández, Vázquez Vázquez, & Gallegos Robles, 2013). Regions with populations of *Carya* genus have extreme conditions with high temperatures and low precipitation, especially in autumn, a situation that, combined with high humidity, favors nut viviparity in native trees growing in spontaneous populations (Sparks, 2005), and in commercial orchards (Rodríguez-González et al., 2022). The commercial importance of *C. illinoensis* has led to the study of viviparity and several investigations report the control of this phenomenon (Barrera, Guillen, Tamargo, Rangel, & Murrieta, 2017; García-Moreno, Báez-Sañudo, Mercado-Ruiz, García-Robles, & Núñez-Moreno, 2020; Wood, 2015); however, the molecular mechanism of gene expression related to viviparity is scarcely documented, so it is important to study them. Gene expression analyses have been widely used in biological research and have contributed significant advances in understanding the molecular mechanisms of complex physiological problems such as premature seed germination, even when the seed is still attached to the plant.

Advances in molecular biology provide the necessary tools for the study of plants at the molecular level. Some techniques are useful for germplasm characterization, genome-wide identification and gene expression contributing to a better understanding of genetics and transcriptional regulation (Liu et al., 2012). However, these studies would not be possible without the isolation of quality total RNA (ribonucleic acid), because it is the first step for the development of other molecular techniques and secures the results of downstream procedures (after the RNA extraction stage) (Sandoval-Pineda, Ochoa-Corona, & Torres-Rojas, 2017).

Obtaining quality RNA from woody and perennial plant tissues is challenging due to high concentrations of polysaccharides, polyphenols and other secondary metabolite (Gambino, Perrone, & Gribaudo, 2008). In the particular case of pecan embryonic tissue, obtaining low-quality RNA is frequent due to the presence of total phenolic compounds, flavonoids and proanthocyanidins or condensed tannins that can be easily oxidized, in addition to fatty acids such as tocopherols and phytosterols (Flores-Cordova, Muñoz-Márquez, Ojeda-Barrios, Soto-Parra, & Preciado-Rangel, 2017; Reyes, 2016).

As a result of interference from these secondary compounds, standard extraction protocols require modifications for the isolation of high-quality nucleic acids with good yields. To date, the use of some

Introducción

El nogal pecanero (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch), por su extensa adaptación climática y alta rentabilidad, es una especie cultivada ampliamente en el norte de México (Cruz-Álvarez et al., 2020; Orona Castillo, Sangerman-Jarquín, Fortis Hernández, Vázquez Vázquez, & Gallegos Robles, 2013). Las regiones con poblaciones del género *Carya* poseen condiciones extremas de temperaturas elevadas y precipitación baja, particularmente en otoño, situación que, en combinación con la humedad elevada, propicia la viviparidad de la nuez en árboles criollos que crecen en poblaciones espontáneas (Sparks, 2005), así como en huertas comerciales (Rodríguez-González et al., 2022). Debido a la importancia comercial de *C. illinoensis*, la viviparidad ha sido objeto de estudio y varias investigaciones reportan el control de este fenómeno (Barrera, Guillen, Tamargo, Rangel, & Murrieta, 2017; García-Moreno, Báez-Sañudo, Mercado-Ruiz, García-Robles, & Núñez-Moreno, 2020; Wood, 2015); sin embargo, el mecanismo molecular de la expresión de genes relacionados con la viviparidad se encuentra poco documentado, por lo que resulta importante el estudio de estos. Los análisis de expresión génica se han utilizado ampliamente en la investigación biológica y han contribuido en avances significativos para la comprensión de los mecanismos moleculares de problemas fisiológicos complejos como la germinación prematura de la semilla, aun cuando todavía está unida a la planta.

Los avances en biología molecular proveen las herramientas necesarias para el estudio de las plantas a nivel molecular. Algunas técnicas son útiles en la caracterización del germoplasma, identificación a nivel genómico y expresión de genes contribuyendo a un mejor entendimiento de la genética y la regulación transcripcional (Liu et al., 2012). No obstante, estos estudios no serían posibles sin el aislamiento de ARN total (ácido ribonucleico) de calidad, ya que constituye el primer paso para el desarrollo de otras técnicas moleculares y asegura los resultados de procedimientos *downstream* (posteriores a la etapa de extracción de ARN) (Sandoval-Pineda, Ochoa-Corona, & Torres-Rojas, 2017).

La obtención de ARN de calidad a partir de tejidos de plantas leñosas y perennes es desafiante debido a las concentraciones altas de polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios (Gambino, Perrone, & Gribaudo, 2008). En el caso particular del tejido embrionario de la nuez pecanera, la obtención de ARN de baja calidad es frecuente debido a la presencia de compuestos fenólicos totales, flavonoides y proantocianidinas o taninos condensados que pueden ser fácilmente oxidados, además de ácidos grasos como tocoferoles y fitoesteroles (Flores-Cordova, Muñoz-Márquez, Ojeda-Barrios, Soto-Parra, & Preciado-Rangel, 2017; Reyes, 2016). Debido a la interferencia de estos compuestos secundarios, los protocolos de extracción

protocols for RNA and DNA extraction from root, stem, leaf and fruit from the *Carya* genus has been reported (Mattison et al., 2017; Qiu et al., 2016; Zheng et al., 2010). These protocols use phenol, trizole, sodium dodecyl sulfate (SDS), lithium chloride and hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB). Commercial extraction kits have also been used due to their high sensitivity, specificity and reproducibility, such as the RNeasy mini kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA) and the mirVana miRNA isolation kit (Ambion/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for RNA extraction from *Carya cathayensis* Sarg. flower buds (Tongqiang, Qixiang, Yuanyuan, Wang, & Huang, 2020; Wang, Huang, Sun, & Zheng, 2015); however, the quality and yield of total RNA varies between methodologies and the plant tissue used. This is because several secondary compounds co-precipitate with RNA exposing it to degradation by RNAases (George, 2018). In the present study, the extraction efficiency of high-quality total RNA extraction for use in downstream gene expression assays was evaluated from the embryonic tissue of pecan nuts from *C. illinoensis* from a spontaneous population.

Materials and Methods

Plant material and growing conditions

Pecan nut samples were collected from adult criollo pecan trees belonging to a spontaneous population over 50 years old. The criteria for tree selection was a height of approximately 15 m and a circumference of 90 cm (measured at 60 cm from the ground). Nuts were collected from 10 trees during the ripening stage (September) in 2020, with two characteristics: normal mature nut and mature nut with germinated embryo. The nuts were wrapped in aluminum foil for analysis, immediately put on ice and then stored at -20 °C until processing.

The criollo pecan tree population is located in the municipality of Nazas, Durango, Mexico, with geographical coordinates 25° 13' 34" LN and 104° 06' 39" LW and elevation of 1250 m. The climate is dry (BWhw(w)(e)) with summer rainfall, annual precipitation of 330.8 mm and mean annual evaporation of 2259.3 mm. Mean annual temperature of 20.2 °C (Servicio Meteorológico Nacional [SMN], 2020).

Total RNA extraction

The RNA extraction process was carried out in the Microbial Ecology Laboratory and Molecular Biology Laboratory of the Faculty of Biological Sciences of the Universidad Juárez del Estado de Durango.

Protocols were performed in a decontaminated and nuclease-free area to avoid RNA degradation. Extraction

estándar requieren modificaciones para el aislamiento de ácidos nucleicos de alta calidad y con buen rendimiento. A la fecha, se ha reportado el uso de algunos protocolos para la extracción de ARN y ADN de raíz, tallo, hoja y fruto del género *Carya* (Mattison et al., 2017; Qiu et al., 2016; Zheng et al., 2010). Dichos protocolos usan fenol, trizol, dodecil sulfato de sodio (SDS), cloruro de litio y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). También se han utilizado kits comerciales de extracción debido a su alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, como el mini kit RNeasy (QIAGEN, Germantown, MD, EUA) y el mirVana miRNA isolation kit (Ambion/Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para la extracción de ARN de brotes florales de *Carya cathayensis* Sarg. (Tongqiang, Qixiang, Yuanyuan, Wang, & Huang, 2020; Wang, Huang, Sun, & Zheng, 2015); sin embargo, la calidad y rendimiento de ARN total varía entre las metodologías y el tejido vegetal utilizado. Esto debido a que varios compuestos secundarios coprecipitan con el ARN exponiéndolo a degradación por RNAsas (George, 2018). En el presente estudio se evaluó la eficiencia de extracción de ARN total de alta calidad para ser utilizado en ensayos posteriores de expresión génica, a partir de tejido embrionario de nuez pecanera de nogales criollos (*C. illinoensis*) de una población espontánea.

Materiales y métodos

Material vegetal y condiciones del cultivo

Las muestras de nuez pecanera se obtuvieron de nogales criollos adultos pertenecientes a una población espontánea de más de 50 años. El criterio de selección de los árboles fue una altura aproximada de 15 m y circunferencia de 90 cm (medida a 60 cm a partir del suelo). Las nueces se colectaron de 10 árboles durante la etapa de maduración (septiembre) en el 2020, con dos características: nuez madura normal y nuez madura con embrión germinado. Para el análisis, las nueces se envolvieron en papel aluminio, se pusieron en hielo inmediatamente y luego se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

La población de árboles criollos está situada en el municipio de Nazas estado de Durango, México, con coordenadas geográficas 25° 13' 34" LN y 104° 06' 39" LO y elevación de 1250 m. El clima es seco (BWhw(w)(e)) con lluvias en verano, precipitación anual de 330.8 mm y evaporación media anual de 2259.3 mm. La temperatura media anual es 20.2 °C (Servicio Meteorológico Nacional [SMN], 2020).

Extracción de ARN total

El proceso de extracción de ARN se realizó en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango.

buffers and solutions were sterilized using 0.22 µm filters. The supplies were heat and pressure sterilized in an autoclave. The electrophoresis chambers and photodocumenter were treated with DEPC (diethylpyrocarbonate) water.

For the total RNA extraction process, 100 mg of pecan embryo tissue previously homogenized by maceration with liquid nitrogen was used. Eight protocols that have been documented for their effectiveness for RNA extraction from plant samples with high lipid, phenol and polysaccharide contents were evaluated. These protocols are described as follows.

TRIzol 1 (TRI Reagent®; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): Total RNA was extracted according to the protocol reported by Li, Zhang, Liao, and Liu (2014). The extraction solutions used were TRI Reagent®, β-mercaptoethanol, potassium acetate 2.5 M (pH 5.2) and chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Total RNA was precipitated with isopropanol for 30 min at -20 °C, followed by two washes with 70 % ethanol. The pellet was dried at room temperature and rehydrated in DEPC water.

TRIzol 2 (TRI Reagent®; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): Total RNA was extracted according to the protocol provided by the supplier. The extraction solution is a mixture of guanidine thiocyanate and phenol. Total RNA was precipitated with isopropanol for 10 min at room temperature, followed by washing with 70 % ethanol. The pellet was dried at room temperature and resuspended in DEPC water.

TRIzol 3 (TRI Reagent®; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): Total RNA extraction was carried out using the procedure reported by Ortega-González et al. (2018). Total RNA was precipitated in a mixture of isopropanol and 3 M sodium acetate overnight at -20 °C, followed by two washes with 70 % ethanol, and again precipitated for 30 min at -20 °C. The pellet was dried at room temperature and dissolved in DEPC water.

Kit RNeasy® Power Plant® (QIAGEN, Germantown, MD, USA): Total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. The method uses BML (guanidine salts) solution as lysis buffer, β-mercaptoethanol and phenolic separation solution (PSS). RNA was purified by centrifugation on silica membrane columns; 50 µL of RNAase-free water was added for elution, incubated 1 min at room temperature and centrifuged 1 min at 14000 rpm for subsequent storage.

CTAB 1: Total RNA was isolated using the protocol described by Rubio-Piña and Zapata-Pérez (2011). Extraction was carried out using extraction buffer 1

Los protocolos se desarrollaron en un área descontaminada y libre de nucleasas para evitar la degradación del ARN. Los buffers de extracción y soluciones se esterilizaron mediante filtros de 0.22 µm. Los insumos se esterilizaron por calor y presión en una autoclave. Las cámaras de electroforesis y fotodocumentador se trataron con agua DEPC (diethylpyrocarbonato).

Para el proceso de extracción de ARN total se inició con 100 mg de tejido embrionario de nuez previamente homogeneizado mediante maceración con nitrógeno líquido. Se evaluaron ocho protocolos que han sido documentados por su efectividad para la extracción de ARN de muestras vegetales con contenidos altos de lípidos, fenoles y polisacáridos. Dichos protocolos se describen a continuación.

TRIzol 1 (TRI Reagent®; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA): El ARN total se obtuvo de acuerdo con el protocolo reportado por Li, Zhang, Liao, y Liu (2014). Las soluciones de extracción utilizadas fueron TRI Reagent®, β-mercaptoetanol, acetato de potasio 2.5 M (pH 5.2) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El ARN total se precipitó con isopropanol durante 30 min a -20 °C, seguido de dos lavados con etanol al 70 %. El *pellet* se secó a temperatura ambiente y rehidrató en agua DEPC.

TRIzol 2 (TRI Reagent®; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA): El ARN total se extrajo de acuerdo con el protocolo proporcionado por el proveedor. La solución de extracción es una mezcla de tiocianato de guanidina y fenol. El ARN total se precipitó con isopropanol durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de un lavado con etanol al 70 %. El *pellet* se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua DEPC.

TRIzol 3 (TRI Reagent®; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA): La extracción de ARN total se realizó mediante el procedimiento reportado por Ortega-González et al. (2018). El ARN total se precipitó en una mezcla de isopropanol y acetato de sodio 3 M durante toda la noche a -20 °C, seguido de dos lavados con etanol al 70 % y nuevamente se precipitó por 30 min a -20 °C. El *pellet* se secó a temperatura ambiente y se disolvió en agua DEPC.

Kit RNeasy® Power Plant® (QIAGEN, Germantown, MD, EUA): El ARN total se extrajo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El método utiliza la solución BML (sales de guanidina) como *buffer* de lisis, β-mercaptoetanol y una solución de separación fenólica (PSS). El ARN se purificó mediante centrifugación en columnas con membrana de sílice; para su elución se añadieron 50 µL de agua libre de ARNasas, se incubó 1 min a temperatura ambiente y centrifugó 1 min a 14000 rpm para su almacenamiento posterior.

based on CTAB ionic detergent (CTAB 2 %, Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM [pH 8], PVP 2 %) and β -mercaptoethanol (added just before use), followed by two more extractions with phenol:chloroform (1:1) and chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Precipitation of total RNA was with LiCl (8 M) for 4 h at -20 °C, followed by a first wash with 96 % ethanol and a second wash with 70 % ethanol. The pellet was dried at room temperature and resuspended in DEPC water.

CTAB 2: Total RNA extraction was carried out using the protocol described by Rubio-Piña and Zapata-Pérez (2011) with modifications. Total RNA was collected with extraction buffer 1 CTAB (CTAB 2 %, Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM [pH 8], PVP 2 %) and β -mercaptoethanol (added just before use). The variation from the previous protocol was to perform two more extractions with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) and chloroform:isoamyl alcohol (24:1). RNA was precipitated in LiCl (8 M) for 4 h at -20 °C, followed by a first wash with 96 % ethanol and a second wash with 70 % ethanol. The pellet was dried at room temperature and dissolved in DEPC water.

CTAB 3: To obtain total RNA, the process reported by Salinas et al. (2019) was followed, modifying the volumes handled. 600 μ L of CTAB-based extraction buffer 2 (CTAB 2 %, PVP 2 %, Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 2 M, EDTA 25 mM, spermidine 0.05 %) and 100 μ L de β -mercaptoethanol were added just before use. The sample was incubated 10 min at 65 °C. Subsequently, 500 μ L of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added and vortex mixed. The sample was centrifuged at 10 000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant (yellow color) was transferred to a new tube and reserved on ice. The precipitate was extracted a second time with an equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1). The supernatants were combined, and the total RNA was precipitated in 10 M LiCl overnight at 4 °C. This was followed by washing with 75 % ethanol. The sample was centrifuged at 10 000 rpm for 20 min at 4 °C and the pellet was dried at room temperature and rehydrated in DEPC water.

CTAB 4: Total RNA was obtained based on the method described by Chang, Puryear, and Cairney (1993) with some modifications. The volumes used were smaller than those reported and the 65 °C incubation of the extraction buffer was omitted. For extraction, 600 μ L of extraction buffer 2 (CTAB 2 %, PVP 2 %, 100 mM Tris-HCl [pH 8], 2 M NaCl, 25 mM EDTA, 0.05 % spermidine) and 100 μ L of β -mercaptoethanol were added just before use. The volume was vortex mixed and 600 μ L of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added. The sample was centrifuged at 10 000 rpm for 10 min at 4 °C, followed by a second extraction with 600 μ L phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1), vortexed

CTAB 1: El ARN total se aisló mediante el protocolo descrito por Rubio-Piña y Zapata-Pérez (2011). La extracción se llevó a cabo mediante el *buffer* de extracción 1 basado en el detergente iónico CTAB (CTAB 2 %, Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM [pH 8], PVP 2 %) y β -mercaptoetanol (adicionado justo antes de su uso), seguido de dos extracciones más con fenol:cloroformo (1:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La precipitación del ARN total fue con LiCl (8 M) durante 4 h a -20 °C, seguido de un primer lavado con etanol al 96 % y un segundo lavado con etanol al 70 %. El *pellet* se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua DEPC.

CTAB 2: La extracción de ARN total se realizó mediante el protocolo descrito por Rubio-Piña y Zapata-Pérez (2011) con modificaciones. El ARN total se obtuvo con el *buffer* de extracción 1 CTAB (CTAB 2 %, Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM [pH 8], PVP 2 %) y β -mercaptoetanol (adicionado justo antes de su uso). La variante respecto al protocolo anterior fue la realización de dos extracciones más con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El ARN se precipitó en LiCl (8 M) durante 4 h a -20 °C, seguido de un primer lavado con etanol al 96 % y un segundo lavado con etanol al 70 %. El *pellet* se secó a temperatura ambiente y se disolvió en agua DEPC.

CTAB 3: Para la obtención de ARN total se siguió el proceso reportado por Salinas et al. (2019), modificando los volúmenes manejados. Se añadieron 600 μ L del *buffer* de extracción 2 basado en CTAB (CTAB 2 %, PVP 2 %, Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 2 M, EDTA 25 mM, espermidina 0.05 %) y 100 μ L de β -mercaptoetanol justo antes de su uso. La muestra se incubó 10 minutos a 65 °C. Posteriormente se agregaron 500 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló en vortex. La muestra se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante (color amarillo) se transfirió a un tubo nuevo y se reservó en hielo. Al precipitado se realizó una segunda extracción con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Los sobrenadantes se combinaron y el ARN total se precipitó en LiCl 10 M durante toda la noche a 4 °C. Seguido de un lavado con etanol al 75 %. La muestra se centrifugó a 10 000 rpm durante 20 min a 4 °C y el *pellet* se secó a temperatura ambiente y rehidrató en agua DEPC.

CTAB 4: El ARN total se obtuvo con base en el método descrito por Chang, Puryear, y Cairney (1993) con algunas modificaciones. Los volúmenes utilizados fueron menores que los reportados y se eliminó la incubación a 65 °C del *buffer* de extracción. Para la extracción se añadieron 600 μ L del *buffer* de extracción 2 (CTAB 2 %, PVP 2 %, Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 2 M, EDTA 25 mM, espermidina 0.05 %) y 100 μ L de β -mercaptoetanol justo antes de su

and centrifuged at 10000 rpm for 10 min at 4 °C; in the original report they used chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Total RNA was precipitated in 175 μ L of 8 M LiCl (in the original report they used 10 M LiCl), overnight at 4 °C. The next day, the RNA was centrifuged 20 min at 10000 rpm. The precipitate was dissolved in 500 μ L of SSTE buffer (1 M NaCl, 0.5 % SDS and 10 mM Tris-HCl [pH 8]) and a new extraction was carried out with 500 μ L phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1); in the original report they used chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Additionally, total RNA was washed with 800 μ L of 70 % ethanol and precipitated for 2 h at -20 °C. The pellet was dried at room temperature and dissolved in DEPC water.

Evaluation of RNA integrity and quality

Total RNA extraction was evaluated for quantity, purity and integrity by spectrophotometry (NanoDrop 2000, UV/Vis, Thermo Scientific) and horizontal electrophoresis on 1 % agarose gels.

Total RNA concentration was measured by optical density at 260 nm and purity was confirmed by the ratio of absorbance indices at 260 and 280 nm ($A_{260/280}$), and at 260 and 230 nm ($A_{260/230}$) to evaluate the presence of proteins or phenolic compounds. An $A_{260/230}$ ratio between 1.8 and 2.0 indicates good quality RNA while below 1.8 suggests contaminated RNA and <1.5 RNA highly contaminated with phenolic compounds, carbohydrates, EDTA and other contaminants with UV absorption at 230 nm. While the $A_{260/280}$ ratio should be between 2.0 and 2.2 to consider optimal purity and >1.7 for acceptable purity. If the ratio is less than 1.7 it indicates contamination with proteins or other contaminants with UV absorption at 280 nm (Silveira de Campos et al., 2017).

RNA integrity was assessed by agarose-MOPS-formaldehyde gel electrophoresis at 50 V for 45 min, using MOPS 1X as electrophoresis buffer. Gel Red® (Biotium, Hayward, CA, USA) was used for RNA staining. Gels were visualized with ultraviolet light on a UVP® MultiDoc It Imaging System UVP® photodocumenter.

cDNA synthesis by RT-PCR

The quality of RNA extracted with each protocol was assessed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). All total RNA samples were treated with DNase I (RNAase-free) (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's specifications and then retrotranscribed to first-strand cDNA by using an Oligo-(dT) primer and M-MLV RT Reverse Transcriptase (Promega, Fitchburg, WI, USA) following the supplier's instructions. The cDNA was amplified using Taq polymerase enzyme (Jena Bioscience, Dortmund, Germany)

El volumen se mezcló en vortex y se añadieron 600 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La muestra se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C, seguido de una segunda extracción con 600 μ L fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló en vortex y centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C; en el protocolo original reportaron el uso de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El ARN total se precipitó en 175 μ L de LiCl 8 M (en el protocolo original reportaron el uso de LiCl 10 M), durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, el ARN se centrifugó 20 min a 10000 rpm. El precipitado fue disuelto en 500 μ L de *buffer* SSTE (NaCl 1 M, SDS 0.5 % y Tris-HCl 10mM [pH 8]) y se realizó una nueva extracción con 500 μ L fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1); en el protocolo original reportaron el uso de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Adicionalmente, el ARN total se lavó con 800 μ L de etanol al 70 % y se precipitó durante 2 h a -20 °C. El *pellet* se secó a temperatura ambiente y se disolvió en agua DEPC.

Evaluación de la integridad y calidad del ARN

La extracción de ARN total se evaluó mediante la cantidad, pureza e integridad, a través de espectrofotometría (NanoDrop 2000, UV/Vis, Thermo Scientific) y por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 %.

La concentración del ARN total se midió mediante la densidad óptica a 260 nm y la pureza se confirmó por la relación de los índices de absorbancia a 260 y 280 nm ($A_{260/280}$), así como a 260 y 230 nm ($A_{260/230}$) para evaluar la presencia de proteínas o compuestos fenólicos. Una relación $A_{260/230}$ entre 1.8 y 2.0 indica ARN de buena calidad mientras que por debajo de 1.8 sugiere ARN contaminado y <1.5 ARN altamente contaminado con compuestos fenólicos, carbohidratos, EDTA y otros contaminantes con absorción UV a 230 nm. Mientras que la relación $A_{260/280}$ debe estar entre 2.0 y 2.2 para considerar una pureza óptima y >1.7 para una pureza aceptable. Si la proporción es menor de 1.7 indica contaminación con proteínas u otros contaminantes con absorción UV a 280 nm (Silveira de Campos et al., 2017).

La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa-MOPS-formaldehído, a 50 V durante 45 min, utilizando MOPS 1X como tampón de electroforesis. Se utilizó Gel Red® (Biotium, Hayward, CA, EUA) para tinción del ARN. Los geles se visualizaron con luz ultravioleta en un fotodocumentador UVP® MultiDoc It Imaging System.

Síntesis de ADNc por RT-PCR

La calidad de ARN extraído con cada protocolo se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

according to the manufacturer's specifications. Oligonucleotides from the constitutive actin gene of *C. illinoensis*: F 5'CGATGCCCTGAGGTTCTATTTC 3' and R 5'GATCCTCCAATCCAGACTATAC 3' were used to amplify a 266 bp product. Those primers were designed via the IDT (Integrated DNA Technologies) online platform based on the whole genome sequence of *C. illinoensis* cultivar 87MX3-2.11 (CM028997.1) (Platts et al., 2021), obtained through the GenBank of the Center for Biotechnology Information (NCBI). For a standard 25 μL RT-PCR reaction, 40 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ of total RNA was used. The PCR amplification program included an initial denaturation of 2 min at 92 °C; subsequently, 35 cycles comprising the following steps: denaturation at 95 °C for 15 s, alignment 55 °C for 15 s and extension 72 °C for 1 min 30 s; and a final extension of 2 min at 72 °C. The amplified products were separated on a 2 % agarose gel, stained with Gel Red® (Biotium, Hayward, CA, USA), at 75 V for 45 min and visualized with ultraviolet light in a UVP® MultiDoc It Imaging System photodocumenter.

Statistical analysis

Differences between the absorbances and concentrations obtained, for each of the protocols, were determined with an ANOVA model with three replicates and a Tukey's mean test ($P < 0.05$). The SAS program version 9.4 was used for this purpose (SAS Institute, 2017).

Results

RNA extraction protocols are usually evaluated based on quantity, quality and integrity for RT-PCR, qPCR, cDNA library construction and gene expression analysis (Zhihui et al., 2015).

Regarding the extraction protocols based on TRI Reagent® reagent, the concentration of total RNA (Table 1) was higher with the TRIzol 3 method, both in mature and germinated pecans, with average values of 2298.9 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ and 1456.6 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, respectively. Furthermore, an average of 1333.4 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ in mature pecan and 537.6 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ in germinated walnut was obtained with TRIzol 1 protocol. The average RNA yield obtained with TRIzol 2 was 240.2 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ for mature nut and 359.4 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ for germinated nut. In terms of quality, the samples presented a ratio $A_{260/230} < 1.5$ and $A_{260/280} < 1.7$ (Table 2), values below the acceptable purity range, indicating high contamination by proteins and phenolic compounds.

RNA extraction using RNeasy® Power Plant® Kit produced samples with average concentrations of 663.3 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ for mature nut tissue and 60.1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ for germinated nut samples (Table 1). For mature pecan nut, acceptable purity values were obtained ($A_{260/280}$

Todas las muestras de ARN total se trataron con DNasa I (libre de ARNasa) (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) según las especificaciones del fabricante y luego se retrotranscribieron a ADNc de primera cadena mediante el uso de un cebador Oligo-(dT) y Transcriptasa Reversa M-MLV RT (Promega, Fitchburg, WI, EUA) siguiendo las indicaciones del proveedor. El ADNc se amplificó utilizando la enzima Taq polimerasa (Jena Bioscience, Dortmund, Alemania) con las especificaciones del fabricante. Se utilizaron oligonucleótidos del gen constitutivo actina de *C. illinoensis*: F 5'CGATGCCCTGAGGTTCTATTTC 3' y R 5'GATCCTCCAATCCAGACTATAC 3' para amplificar un producto de 266 pb. Dichos iniciadores se diseñaron a través de la plataforma en línea IDT (Integrated DNA Technologies) con base en la secuencia del genoma completo de *C. illinoensis* cultivar 87MX3-2.11 (CM028997.1) (Platts et al., 2021), obtenida a través del GenBank del Centro de Información Biotecnológica (NCBI). Para una reacción estándar de RT-PCR de 25 μL , se utilizaron 40 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de ARN total. El programa de amplificación por PCR incluyó una desnaturalización inicial de 2 min a 92 °C; posteriormente, 35 ciclos que comprenden las etapas siguientes: desnaturalización a 95 °C durante 15 s, alineamiento 55 °C durante 15 s y extensión 72 °C durante 1 min 30 s; y una extensión final de 2 min a 72 °C. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 2 %, teñidos con Gel Red® (Biotium, Hayward, CA, EUA), a 75 V durante 45 min y se visualizaron con luz ultravioleta en un fotodocumentador UVP® MultiDoc It Imaging System.

Análisis estadístico

Las diferencias entre las absorbancias y concentraciones obtenidas, para cada uno de los protocolos, se determinaron con un modelo de análisis de varianza (ANOVA) con tres repeticiones y una prueba de medias de Tukey ($P < 0.05$). Para ello se usó el programa SAS versión 9.4 (SAS Institute, 2017).

Resultados

Los protocolos de extracción de ARN generalmente se evalúan en términos de cantidad, calidad e integridad para RT-PCR, qPCR, construcción de bibliotecas de ADNc y análisis de expresión de genes (Zhihui et al., 2015).

En cuanto a los protocolos de extracción basados en el reactivo TRI Reagent®, la concentración de ARN total (Cuadro 1) fue mayor con el método TRIzol 3, tanto en nuez madura como en germinada, con valores promedio de 2298.9 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y 1456.6 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, respectivamente. Asimismo, con el protocolo TRIzol 1 se obtuvo un promedio de 1333.4 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ en nuez madura y 537.6 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ en nuez germinada. El rendimiento promedio de ARN obtenido con TRIzol 2 fue de 240.2 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ en nuez madura y 359.4 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ en

Table 1. Spectrophotometric readings used to evaluate the total RNA quantity from embryonic tissues of normal mature pecan and mature pecan with germinated embryo of *Carya illinoensis*.**Cuadro 1. Lecturas espectrofotométricas usadas para evaluar la cantidad del ARN total de tejidos embrionarios de nuez madura normal y nuez madura con embrión germinado de *Carya illinoensis*.**

Protocol/ Protocolo	Mature pecan nut (ng· μ L ⁻¹)/ Nuez madura (ng· μ L ⁻¹)	Germinated pecan nut (ng· μ L ⁻¹)/ Nuez germinada (ng· μ L ⁻¹)
TRIzol 1	1333.4 ab	537.6 b
TRIzol 2	240.2 b	359.4 b
Kit	663.3 b	60.1 c
TRIzol 3	2298.9 a	1456.6 a
CTAB 1	685.2 b	712.2 ab
CTAB 2	739.4 ab	372.9 b
CTAB 3	611.7 b	485.3 b
CTAB 4	421.6 b	425.1 b

Mean concentrations (n = 3) with the same letters in the same column are statistically equal according to Tukey's test ($P > 0.05$).

Concentraciones medias (n = 3) con las mismas letras dentro de una misma columna son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($P > 0.05$).

Table 2. Spectrophotometric readings used to evaluate the RNA quality of embryonic tissues of normal mature pecan nut and mature pecan nut with *Carya illinoensis* germinated embryo.**Cuadro 2. Lecturas espectrofotométricas usadas para evaluar la calidad del ARN de tejidos embrionarios de nuez madura normal y nuez madura con embrión germinado de *Carya illinoensis*.**

Protocol/Protocolo	Mature pecan nut /Nuez madura		Germinated pecan nut /Nuez germinada	
	A _{260/230}	A _{260/280}	A _{260/230}	A _{260/280}
TRIzol 1	0.41 d	1.66 b	0.62 c	1.13 b
TRIzol 2	0.48 d	1.20 c	0.41 d	1.63 b
Kit	1.30 b	1.97 b	0.32 d	1.25 b
TRIzol 3	0.39 d	1.06 c	0.45 d	1.07 b
CTAB 1	1.16 b	1.87 b	1.25 b	1.80 a
CTAB 2	1.11 b	1.79 b	1.07 c	1.77 a
CTAB 3	0.86 c	1.70 b	1.29 b	1.84 a
CTAB 4	1.89 a	2.07 a	1.87 a	1.86 a

Mean concentrations (n = 3) with the same letters in the same column are statistically equal according to Tukey's test ($P > 0.05$).

Valores medios (n = 3) de pureza con las mismas letras dentro de una misma columna son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($P > 0.05$).

> 1.7) although with possible contamination with proteins and phenols ($A_{260/230} < 1.5$). For germinated pecan nut, absorbance values indicated highly contaminated RNA ($A_{260/230} < 1.5$ and $A_{260/280} < 1.7$) (Table 2).

The average concentration of total RNA with the CTAB 1 method and the use of phenol:chloroform (1:1) and chloroform:isoamyl alcohol (24:1) in the extraction process was 600 to 700 ng· μ L⁻¹ with an acceptable quality range ($A_{260/280} > 1.7$), although with the presence of contaminating compounds ($A_{260/230} < 1.5$). In the case of the CTAB 2 protocol and the addition of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) and chloroform:isoamyl alcohol (24:1), up to 739.4 ng· μ L⁻¹ of total RNA from mature pecan nut and 372.9 ng· μ L⁻¹

nuez germinada. En cuanto a la calidad, las muestras presentaron una relación $A_{260/230} < 1.5$ y $A_{260/280} < 1.7$ (Cuadro 2), valores por debajo del rango de pureza aceptable, lo que indica alta contaminación por proteínas y compuestos fenólicos.

La extracción de ARN mediante RNeasy® Power Plant® Kit produjo muestras con concentraciones promedio de 663.3 ng· μ L⁻¹ para el tejido de nuez madura y 60.1 ng· μ L⁻¹ para muestras de nuez germinada (Cuadro 1). Para nuez madura se obtuvieron valores de pureza aceptable ($A_{260/280} > 1.7$) aunque con posible contaminación con proteínas y fenoles ($A_{260/230} < 1.5$). En el caso de nuez germinada, los valores de absorbancia indicaron ARN altamente contaminado ($A_{260/230} < 1.5$ y $A_{260/280} < 1.7$) (Cuadro 2).

of total RNA from germinated pecan nut were obtained, with no differences in quality with reference to the CTAB 1 protocol. Moreover, with the CTAB 3 protocol, total RNA concentrations were similar to those obtained with CTAB 1 and CTAB 2 (400-600 ng· μL^{-1}) with acceptable absorbance values ($A_{260/280} > 1.7$) and presence of contaminants ($A_{260/230} < 1.5$).

Finally, the CTAB 4 protocol led to total RNA concentrations of 400 ng· μL^{-1} and increased purity in both mature nut ($A_{260/230} = 1.89$ and $A_{260/280} = 2.07$) and germinated nut ($A_{260/230} = 1.87$ and $A_{260/280} = 1.86$), decreasing the presence of lipids and phenolic compounds compared to the seven protocols cited above. Therefore, the lower volume RNA extraction and the use of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) represent an efficient alternative for RNA isolation from pecan embryonic tissues, since this protocol provides good quality total RNA for subsequent qPCR analysis.

Integrity and quality assessment of the total RNA

Regarding the integrity of total RNA, in most protocols two consecutive clear bands, characteristic of ribonucleic acid, were seen, confirming its purity. Integrity was null for TRIzol 1 and TRIzol 3 methods, indicating RNA degradation, but was preserved in the four CTAB-based protocols. The RNA samples obtained with the kit were also able to confirm their integrity, although with remnants of certain compounds that interfered with their quality (Figure 1).

RT-PCR and cDNA synthesis

A reference primer pair for detection of the *C. illinoensis* actin gene was designed to evaluate the effectiveness of the RNA extraction protocols.

La concentración promedio de ARN total con el método CTAB 1 y el uso de fenol:cloroformo (1:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) en el proceso de extracción, fue de 600 a 700 ng· μL^{-1} con un rango de calidad aceptable ($A_{260/280} > 1.7$), aunque con presencia de compuestos contaminantes ($A_{260/230} < 1.5$). En el caso del protocolo CTAB 2 y la adición de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) se obtuvieron hasta 739.4 ng· μL^{-1} de ARN total de nuez madura y 372.9 ng· μL^{-1} de ARN total de nuez germinada, sin diferencias en calidad con referencia al protocolo CTAB 1. Asimismo, con el protocolo CTAB 3, las concentraciones de ARN total fueron similares a las obtenidas con CTAB 1 y CTAB 2 (400-600 ng· μL^{-1}) con valores de absorbancia aceptables ($A_{260/280} > 1.7$) y presencia de contaminantes ($A_{260/230} < 1.5$).

Finalmente, el protocolo CTAB 4 permitió la obtención de concentraciones de ARN total de 400 ng· μL^{-1} y el incremento de la pureza tanto en nuez madura ($A_{260/230} = 1.89$ y $A_{260/280} = 2.07$) como en nuez germinada ($A_{260/230} = 1.87$ y $A_{260/280} = 1.86$), disminuyendo la presencia de lípidos y compuestos fenólicos en comparación con los siete protocolos antes citados. Por tanto, la extracción de ARN en menor volumen y el uso de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) representan una alternativa eficaz para el aislamiento de ARN de los tejidos embrionarios de la nuez pecanera, ya que dicho protocolo permite la obtención de ARN total de buena calidad para análisis de qPCR posteriores.

Evaluación de la integridad y calidad del ARN obtenido

En cuanto a la integridad del ARN total, en la mayoría de los protocolos se visualizaron dos bandas consecutivas claras, características del ácido ribonucleico, confirmando su pureza. La integridad

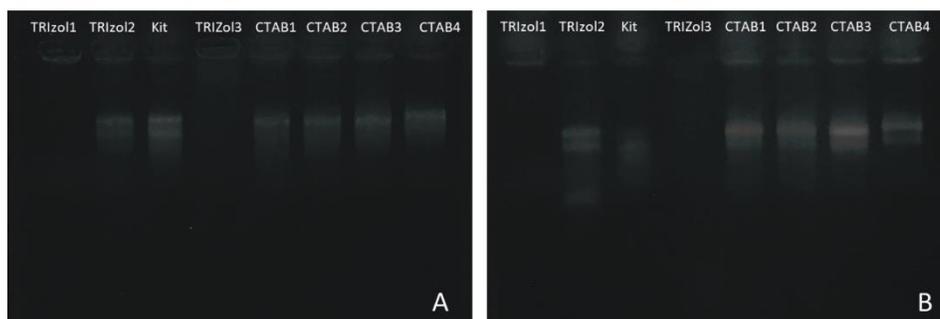


Figure 1. Agarose gel electrophoresis (2 %) of total RNA collected from mature pecan nut embryo tissue (A) and pecan nut with germinated embryo (B) using eight extraction protocols.

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa (2 %) del ARN total obtenido del tejido embrionario de nuez pecanera madura (A) y nuez pecanera con embrión germinado (B) mediante ocho protocolos de extracción.

Electrophoresis showed high specificity and proved the presence of this gene in pecan embryo tissue.

Extraction using protocols based on TRI Reagent® showed high RNA concentration; however, since it was contaminated with phenolic compounds and used in the RT-PCR reaction, it produced low yields in the amplified products for the two pecan nut conditions (Figure 2). For RNA obtained using the kit and CTAB 1, amplification was achieved only in germinated pecan. The negative amplification in mature pecan could have been due to the presence of inhibitors such as lysis buffer or some detergents that interfered with the efficiency of the RT-PCR reaction (Sandoval-Pineda et al., 2017). On the other hand, RNA obtained with CTAB 2, CTAB 3 and CTAB 4 protocols generated a clear band compared to the rest of the protocols; this indicates that RNA purity is closely related to amplification efficiency in the RT-PCR reaction. These results confirm that, although relatively low amounts of RNA were collected with the CTAB protocols, total RNA had good quality and can be used in downstream gene expression studies.

Discussion

A large number of protocols for the extraction of quality nucleic acids from plant tissues have been reported; however, the methods remain empirical, due to the variability in their composition (Sánchez-Coello et al., 2012).

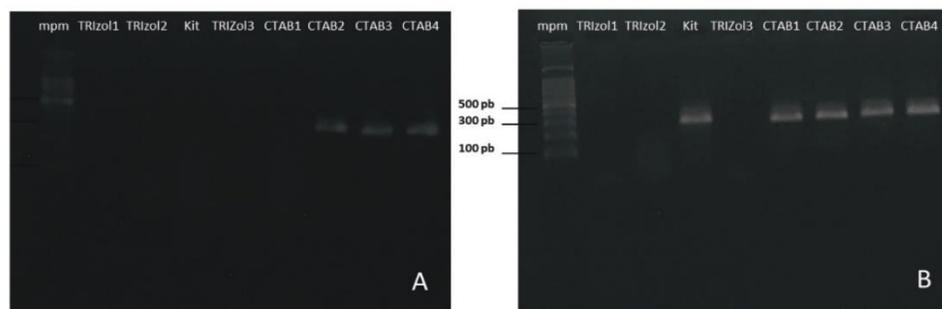
The TRI Reagent® has been successfully used in the extraction of RNA from plant species, because as a single phase solution it solubilizes the biological material and denatures the proteins and, when

fue nula en los métodos TRIzol 1 y TRIzol 3, indicando la degradación del ARN, mientras que en los cuatro protocolos basados en CTAB se conservó. De igual forma, en las muestras de ARN obtenidas con el kit se logró confirmar su integridad, aunque con remanentes de ciertos compuestos que interfirieron en su calidad (Figura 1).

Síntesis de ADNc y RT-PCR

Con el fin de evaluar la efectividad de los protocolos de extracción de ARN se diseñó un par de iniciadores de referencia para la detección del gen *actina* de *C. illinoensis*. La electroforesis mostró alta especificidad y demostró la presencia de este gen en el tejido embrionario de nuez pecanera.

En particular, la extracción mediante los protocolos basados en el reactivo TRI Reagent® presentó concentración alta de ARN; sin embargo, al estar contaminado con compuestos fenólicos y ser usado en la reacción de RT-PCR, produjo bajos rendimientos en los productos amplificados para las dos condiciones de nuez pecanera (Figura 2). En el caso del ARN obtenido mediante el kit y CTAB 1, la amplificación se logró solo en nuez germinada. La amplificación negativa en nuez madura pudo deberse a la presencia de inhibidores como el *buffer* de lisis o algunos detergentes que interfirieron en la eficiencia de la reacción RT-PCR (Sandoval-Pineda et al., 2017). Por otra parte, el ARN obtenido con los protocolos CTAB 2, CTAB 3 y CTAB 4 generó una banda clara en comparación con el resto de los protocolos; esto indica que la pureza del ARN está estrechamente relacionada con la eficiencia de amplificación en la reacción de RT-PCR. Estos resultados confirman que, aunque se obtuvieron cantidades de



F **Figure 2.** Assessment of the efficiency of the RT-PCR reaction from RNA extracted from embryonic tissue of mature pecan nut (A) and germinated embryo (B) of *Carya illinoensis* using eight extraction methodologies and the actin gene (266 bp). Well 1 corresponds to the molecular weight (mpm) marker of 100 pb (Promega, Fitchburg, WI, USA). **Figura 2.** Evaluación de la eficiencia de la reacción de RT-PCR a partir de ARN obtenido del tejido embrionario de nuez pecanera madura (A) y con embrión germinado (B) de *Carya illinoensis* mediante ocho metodologías de extracción y el gen actina (266 pb). El pocillo 1 corresponde al marcador de peso molecular (mpm) de 100 pb (Promega, Fitchburg, WI, EUA).

combined with chloroform, allows phase separation, where the protein is extracted to the organic phase, the DNA remains at the interface and the RNA remains in the aqueous phase (Martínez-López, Leshner, & Jiménez-García, 2013; Ma & Li, 2022). In this study, protocols based on TRI Reagent® reagent showed the highest concentration yields, but with higher degree of contamination. It is possible that the low RNA quality obtained in these protocols is due to contamination by phenolic compounds and lipids characteristic of pecan nut. Some authors have reported that RNA from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. and ascomycetous fungi *Xylaria* sp., extracted using TRI Reagent® may have low quality due to the presence of mucilage, secondary metabolites, polysaccharides, phenols and carbohydrates (Michel-López et al., 2018; Ortega-González et al., 2018; Sandoval-Pineda et al., 2017). Some authors also mention that polyphenols are released and mixed with nucleic acids during the cell lysis process and, consequently, RNA quality and yield decrease (Ferriol-Marchena, Luis-Pantoja, Ruiz, Hernández-Rodríguez, & Pérez-Castro, 2015). The above due to the catecholase activity of polyphenols that allows them to couple to nucleic acids degrading them or causing them to precipitate with them. It has been reported that the use of concentrated sodium acetate (3 M) allows an effective precipitation of RNA by removing contaminating polysaccharides and protein (George, 2018); however, the results in this study differ, since, although high concentrations were obtained, viability and integrity of total RNA was not achieved, which could be due to the type of tissue and the species used for the extraction procedure.

For the commercial kit, the RNeasy® Power Plant® Kit system is recommended by the manufacturer for effective extraction of total RNA from various plant tissues with high phenol and polysaccharide contents. In this study, although it was possible to extract total RNA from pecan nut, the expected optimal purity was not achieved. According to Sánchez-Rodríguez and collaborators (2008), when extraction kits are used, contamination can occur due to the presence of residual sugars, since these are capable of establishing hydrophobic interactions with the matrix.

Protocols using CTAB as an essential part of the extraction buffer are conventional methods to isolate nucleic acids from plant tissues rich in polysaccharides and polyphenols. CTAB is commonly used in interaction with detergents such as SDS, denaturing organic solvents such as phenol and chloroform, and reducing agents such as β -mercaptoethanol (Gambino et al., 2008). In this study, the CTAB buffer-based protocols produced acceptable total RNA yields by increasing purity and decreasing the presence of contaminants. Specifically, the CTAB 4 protocol showed

RNA relativamente bajas con los protocolos CTAB, el ARN total fue de buena calidad y puede ser utilizado en estudios *downstream* de expresión génica.

Discusión

Se ha reportado gran cantidad de protocolos de extracción de ácidos nucleicos de calidad a partir de tejidos vegetales; no obstante, los métodos siguen siendo empíricos, debido a la variabilidad en su composición (Sánchez-Coello et al., 2012).

El reactivo TRI Reagent® se ha utilizado con éxito en la extracción de ARN de especies vegetales, ya que al ser una solución monofásica solubiliza el material biológico y desnaturaliza las proteínas y, cuando es combinado con cloroformo, permite la separación de fases, donde la proteína se extrae a la fase orgánica, el ADN se queda en la interfaz y el ARN permanece en la fase acuosa (Martínez-López, Leshner, & Jiménez-García, 2013; Ma & Li, 2022). En este estudio, los protocolos basados en el reactivo TRI Reagent® mostraron los mayores rendimientos en concentración, pero con mayor grado de contaminación. Es posible que la baja calidad de ARN obtenida en estos protocolos se deba a la contaminación de compuestos fenólicos y lípidos característicos de la nuez pecanera. Algunos autores han reportado que el ARN de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. y hongos ascomicetes *Xylaria* sp., extraído mediante TRI Reagent® puede ser de baja calidad debido a la presencia de mucílago, metabolitos secundarios, polisacáridos, fenoles y carbohidratos (Michel-López et al., 2018; Ortega-González et al., 2018; Sandoval-Pineda et al., 2017). Asimismo, algunos autores mencionan que los polifenoles son liberados y mezclados con los ácidos nucleicos durante el proceso de lisis celular y, en consecuencia, la calidad y el rendimiento del ARN disminuyen (Ferriol-Marchena, Luis-Pantoja, Ruiz, Hernández-Rodríguez, & Pérez-Castro, 2015). Lo anterior debido a la actividad catecolasa de los polifenoles que les permite acoplarse a los ácidos nucleicos degradándolos o provocando que precipiten con ellos. Se ha reportado que el uso de acetato de sodio concentrado (3 M) permite una precipitación efectiva de ARN eliminando los polisacáridos y proteínas contaminantes (George, 2018); sin embargo, los resultados en este estudio difieren, ya que, aunque se obtuvieron concentraciones altas no fue posible la viabilidad e integridad del ARN total, lo cual podría deberse al tipo de tejido y la especie utilizada para el procedimiento de extracción.

En el caso del kit comercial, el sistema RNeasy® Power Plant® Kit es recomendado por el fabricante para una extracción efectiva de ARN total de diversos tejidos vegetales con altos contenidos de fenoles y polisacáridos. En este estudio, aunque se logró extraer ARN total de la

the best results in both concentration and quality for the two nut types, which was confirmed by RT-PCR amplification of the 266-bp actin gene fragment. The CTAB protocol as buffer in interaction with Tris-HCl, NaCl, EDTA, PVP, spermidine, β -mercaptoethanol and LiCl is an efficient process, since it includes a combination of extractions with chloroform:isoamyl alcohol (24:1) and phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1); these reduce total RNA losses due to the formation of insoluble complexes at the interface, protein denaturation and correct separation of nucleic acids (Djami-Tchatchou & Straker, 2012; Thermo Fisher Scientific, 2021).

Similar studies have reported that the use of agents such as CTAB and LiCl increases RNA purity significantly for organisms with high contaminant content (Martínez et al., 2013; Sánchez et al., 2008). CTAB is able to form complexes with polysaccharides and polyphenols removing them from solution (Orek, 2018; Zhao et al., 2012), while LiCl allows a differential precipitation of RNA and other substances such as DNA, proteins and carbohydrates (Hernández-Guzmán & Guzmán-Barney, 2013). The use of SDS and EDTA in the extraction buffer has also been studied proving to be good inhibitors of RNAases (George, 2018), as they dissolve membranes and denature proteins allowing purification of nucleic acids (Rio, Ares, Hannon, & Nilsen, 2010). Furthermore, PVP and β -mercaptoethanol, compounds frequently used because they improve RNA yield and quality, help suppress oxidation, remove ribonucleases released during cell lysis, and deactivate proteins, allowing extraction of nucleic acids from plants (George, 2018; Michel-López et al., 2018; Mommaerts, Sanchez, Betsou, & Mathieson, 2015).

The interaction of these compounds led to high-quality total RNA from pecan nut embryo tissue, making CTAB 4 an effective protocol for future molecular studies in *C. illinoensis*. The CTAB 4 protocol was designed based on other protocols and to be performed in a microextraction format, starting from a minimum amount of sample and using a much smaller volume of reagents. A microextraction is important because it produces a minimum amount of toxic waste and optimizes the use of resources.

Conclusions

The efficiency of eight protocols for the extraction of total RNA from was evaluated in this study, and significant differences were determined regarding quality and quantity, from the embryonic tissue of normal mature pecan nut and germinated embryo. With the protocols based on TRIzol reagent and the commercial kit, high concentrations of total RNA were obtained; however, the quality was deficient,

nuez pecanera no se alcanzó la pureza óptima esperada. Según Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2008), cuando se emplean kits de extracción puede existir contaminación por la presencia de azúcares residuales, ya que estos son capaces de establecer interacciones hidrofóbicas con la matriz.

Los protocolos que utilizan al CTAB como parte esencial del *buffer* de extracción son métodos convencionales para el aislamiento de ácidos nucleicos de tejidos vegetales ricos en polisacáridos y polifenoles. Generalmente, el CTAB se usa en interacción con detergentes como el SDS, disolventes orgánicos desnaturizantes como el fenol y el cloroformo, y agentes reductores como el β -mercaptoetanol (Gambino et al., 2008). En este estudio, los protocolos basados en el *buffer* CTAB produjeron rendimientos de ARN total aceptables, al incrementar la pureza y disminuir la presencia de contaminantes. Específicamente, el protocolo CTAB 4 mostró los mejores resultados tanto de concentración como de calidad para los dos tipos de nuez, lo cual se confirmó con la amplificación por RT-PCR del fragmento del gen actina de 266 pb. El protocolo de CTAB como *buffer* en interacción con Tris-HCl, NaCl, EDTA, PVP, espermidina, β -mercaptoetanol y LiCl es un proceso eficiente, ya que consta de la combinación de extracciones con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1); estas logran reducir las pérdidas de ARN total, debido a la formación de complejos insolubles en la interfase, desnaturización de proteínas y separación correcta de ácidos nucleicos (Djami-Tchatchou & Straker, 2012; Thermo Fisher Scientific, 2021).

Estudios similares han reportado que el uso de agentes como CTAB y LiCl incrementa la pureza de ARN de manera significativa en organismos con contenido alto de contaminantes (Martínez et al., 2013; Sánchez et al., 2008). El CTAB es capaz de formar complejos con los polisacáridos y polifenoles removiéndolos de la solución (Orek, 2018; Zhao et al., 2012), mientras que el LiCl permite una precipitación diferencial del ARN y otras sustancias como DNA, proteínas y carbohidratos (Hernández-Guzmán & Guzmán-Barney, 2013). También se ha estudiado el uso de SDS y EDTA en el *buffer* de extracción resultando ser buenos inhibidores de RNAsas (George, 2018), ya que disuelven las membranas y desnaturizan proteínas permitiendo la purificación de los ácidos nucleicos (Rio, Ares, Hannon, & Nilsen, 2010). Asimismo, el PVP y β -mercaptoetanol, compuestos frecuentemente utilizados debido a que mejoran el rendimiento y la calidad del ARN, ayudan a suprimir la oxidación, eliminan las ribonucleasas liberadas durante la lisis celular y desactivan las proteínas, permitiendo la extracción de los ácidos nucleicos de las plantas (George, 2018; Michel-López et al., 2018; Mommaerts, Sanchez, Betsou, & Mathieson, 2015).

which was corroborated by the null amplification of the actin control gene by RT-PCR. Protocols based on CTAB extraction buffer, established for RNA extraction, are useful in downstream applications. Specifically, the CTAB 4 protocol was the most efficient for the extraction of high-quality total RNA from pecan embryonic tissues, which guarantees obtaining samples for gene expression analysis in *C. illinoensis*.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the support granted through postgraduate grant number 735324. This project was also supported by the Universidad Autónoma Chapingo and the Universidad Juárez del Estado de Durango.

End of English version

References / Referencias

- Barrera, A. A. A., Guillen, J. A. A., Tamargo, E. M., Rangel, P. P., & Murrieta, A. L. (2017). Efecto de la longitud de los brotes fructíferos de nogal pecanero sobre la producción, calidad de almendra y viviparidad de la nuez. *Agrofaz*, 17(1), 35-42. Retrieved from <https://1library.co/document/q5mggw7w-efecto-longitud-fruct%C3%ADferos-pecanero-producci%C3%B3n-calidad-almendra-viviparidad.html>
- Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2), 113–116. doi: 10.1007/BF02670468
- Cruz-Álvarez, O., Hernández-Rodríguez, O. A., Jacobo-Cuellar, J. L., Ávila-Quezada, G., Morales-Maldonado, E., Parra-Quezada, R. Á., ... Ojeda-Barrios, D. L. (2020). Nitrogen fertilization in pecan and its effect on leaf nutrient concentration, yield and nut quality. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 26(3), 163–173. doi: 10.5154/r.rchsh.2019.10.021
- Djami-Tchatchou, A. T., & Straker, C. J. (2012). The isolation of high-quality RNA from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill.). *South African Journal of Botany*, 78(1), 44–46. doi: 10.1016/j.sajb.2011.04.009
- Ferriol-Marchena, X. R., Luis-Pantoja, M., Ruiz, Y., Hernández-Rodríguez, L., & Pérez-Castro, J. M. (2015). Comparación de métodos de extracción de ARN y ADN de hojas de fresa (*Fragaria x Ananassa* Duch) para ensayos de reacción en cadena de la polimerasa. *CitriFruit*, 32(1), 23–30. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/303752147_COMPARACION_DE_METODOS_DE_EXTRACCION_DE_ARN_Y_ADN_DE_HOJAS_DE_FRESA_FRAGARIA_X_ANANASSA_DUCH_PARA_ENSAYOS_DE_REACCION_EN_CADENA_DE_LA_POLIMERASA
- Flores-Córdova, M., Muñoz-Márquez, E., Ojeda-Barrios, D. L., Soto-Parra, J. M., & Preciado-Rangel, P. (2017). Phytochemical composition and antioxidant capacity in Mexican pecan nut. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(5), 346–350. doi: 10.9755/ejfa.EJFA-2016-08-1075
- Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 520–525. doi: 10.1002/pca.1078
- García-Moreno, B. Y., Báez-Sañudo, R., Mercado-Ruiz, J. N., García-Robles, J. M., & Núñez-Moreno, J. H. (2020). Bioregulación de la germinación prematura de nuez pecanera mediante aplicaciones precosecha con ácido 2-hidroxibenzoico. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 21(2).

Conclusiones

La interacción de dichos compuestos permitió la obtención de ARN total de calidad a partir del tejido embrionario de nuez pecanera, siendo CTAB 4 un protocolo eficaz para futuros estudios moleculares en *C. illinoensis*. El protocolo CTAB 4 se diseñó tomando como base otros protocolos y para realizarse en formato de microextracción, partiendo de una cantidad mínima de muestra y utilizando un volumen mucho menor de reactivos. Una microextracción tiene especial importancia debido a que se genera una cantidad mínima de residuos tóxicos además de la optimización de los recursos.

En este estudio fue posible evaluar la eficiencia de ocho protocolos de extracción de ARN total de *Carya illinoensis*, obteniendo diferencias significativas respecto a la calidad y cantidad, a partir del tejido embrionario de nuez pecanera madura normal y con embrión germinado. Con los protocolos basados en el reactivo TRIzol y en el kit comercial se obtuvieron concentraciones altas de ARN total; sin embargo, la calidad fue deficiente, lo cual se corroboró con la nula amplificación del gen control actina por RT-PCR. Los protocolos basados en el *buffer* de extracción CTAB, establecidos para la extracción de ARN, son útiles en aplicaciones *downstream*. Específicamente, el protocolo CTAB 4 fue más eficiente para la extracción de ARN total de alta calidad a partir de tejidos embrionarios de nuez pecanera, lo cual garantiza la obtención de muestras para análisis de expresión génica en *C. illinoensis*.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través de la beca de postgrado número 735324. Este proyecto fue apoyado en conjunto por la Universidad Autónoma Chapingo y la Universidad Juárez del Estado de Durango.

Fin de la versión en español

- Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81365122005>
- George, A. (2018). Simple and efficient method for functional RNA extraction from tropical medicinal plants rich in secondary metabolites. *Tropical Plant Research*, 5(1), 08–13. doi: 10.22271/tp. 2018.v5.i1.002
- Hernández-Guzmán, A. K., & Guzmán-Barney, M. M. (2013). Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección por RT-PCR del Potato yellow vein virus (PYV) en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 71–81. Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/39752/41696>
- Liu, S., Caia, P., Houa, N., Piao, X., Wang, H., Hunga, T., & Chen, Q. (2012). Genome-wide identification and characterization of a panel of housekeeping genes in *Schistosoma japonicum*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 182(1), 75–82. doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.12.007
- Li, J., Zhang, Y., Liao, C., & Liu, X. (2014). Optimization of the procedure for extracting nucleic acids from *aloe*. *Genetics and Molecular Research*, 13(1), 276–282. doi: 10.4238/2014.January.17.12
- Ma, Y., & Li, S. (2022). Purification of total RNAs and small RNAs from fruit tree leaf tissues. In Wang, A., & Li, Y. (Eds.), *Plant virology. Methods in molecular biology* (pp. 217–224). Humana, New York, NY: Springer. doi: 10.1007/978-1-0716-1835-6_21
- Martínez-López, A. A., Leshner, J. M., & Jiménez-García, M. E. (2013). Comparación de tres métodos para la extracción de ARN total a partir de hojas de cacao. *Biotecnología Vegetal*, 13(2). Retrieved from <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/100/82>
- Mattison, C. P., Rai, R., Settlege, R. E., Hinchliffe, D. J., Madison, C., Bland, J. M., ...Bechtel, P. J. (2017). RNA-Seq analysis of developing pecan (*Carya illinoensis*) embryos reveals parallel expression patterns among allergen and lipid metabolism genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(7), 1443–1455. doi: 10.1021/acs.jafc.6b04199.
- Michel-López, C. Y., González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., Rubio-Piña, J., Cervantes-Díaz, L., & Bermúdez-Guzmán, M. D. J. (2018). Evaluación de tres protocolos para la extracción rápida de ARN total de tejidos de *Prosopis juliflora* (SW). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(6), 1259–1267. doi: 10.29312/remexca.v9i6.788
- Mommaerts, K., Sanchez, I., Betsou, F., & Mathieson, W. (2015). Replacing β -mercaptoethanol in RNA extractions. *Analytical Biochemistry*, 479, 51–53. doi: 10.1016/j.ab.2015.03.027
- Orek, C. O. (2018). An optimized cetyltrimethylammonium bromide (ctab)-based protocol for extracting RNA from young and cassava leaves. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 19(4). doi: 10.13140/RG.2.2.24459.75046
- Orona Castillo, I., Sangerman-Jarquín, D. M., Fortis Hernández, M., Vázquez Vázquez, C., & Gallegos Robles, M. Á. (2013). Producción y comercialización de nuez pecanera (*Carya illinoensis* Koch) en el norte de Coahuila, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(3), 461–476. Retrieved from <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v4n3/v4n3a10.pdf>
- Ortega-González, C., Iturriaga, G., Ramírez-Pimentel, J. G., García-González, F., Raya-Pérez, J. C., & Aguirre-Mancilla, C. L. (2018). Extracción de RNA total a partir de semilla de chan (*Hyptis suaveolens*). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 6(1), 1–7. Retrieved from <http://www.somecta.org.mx/Revistas/2018-1/2018-1/EXTRACCION%20DE%20RNA%20TOTAL%20A%20PARTIR%20DE%20SEMILLA%20DE%20CHAN.pdf>
- Platts, A., Shu, S., Wright, S., Barry, K., Edger, P., Pires, J. C., & Schmutz, J. (2021). *Carya illinoensis* cultivar 87MX3-2.11 chromosome 1 genomic scaffold, whole genome shotgun sequence. Retrieved from [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MU179928.1Qju.L.Jiang.B.Fang.J.Shen.Y.Fang.Z.Rm.S.K...Zheng.B.\(2016\).](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MU179928.1Qju.L.Jiang.B.Fang.J.Shen.Y.Fang.Z.Rm.S.K...Zheng.B.(2016).) Analysis of transcriptome in hickory (*Carya cathayensis*) and uncover the dynamics in the hormonal signaling pathway during graft process. *BMC genomics*, 17(1), 1–13. doi: 10.1186/s12864-016-3182-4
- Reyes Vázquez, N. C. (2016). Aprovechamiento integral de la nuez pecanera como fuente de fitocompuestos. In Reyes Vázquez, N. C., & Urrea López, R. (Eds.), *Retos y oportunidades para el aprovechamiento de nuez pecanera en México* (pp. 96–109). Guadalajara, Jalisco, México: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Retrieved from https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b790138f4.pdf
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA by SDS solubilization and phenol extraction. *Cold Spring Harbor Protocols*. doi: 10.1101/pdb.prot5438
- Rodríguez-González, M., Arreola-Ávila, J. G., Trejo-Calzada, R., Cueto-Wong, J. A., Zegbe-Domínguez, J. A., Reyes-Juárez, I., ...Borja-de la Rosa, A. (2022). Yield and vivipary of pecan nut (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) in relation to soil moisture. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 28(1), 155–167. doi: 10.5154/r.rchscfa.2021.07.046
- Rubio-Piña, J. A., & Zapata-Pérez, O. (2011). Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(5), 11–11. doi: 10.2225/vol14-issue5-fulltext-8
- Salinas, P., Salinas, C., Contreras, R. A., Zuñiga, G. E., Dupree, P., & Cardemil, L. (2019). Water deficit and abscisic acid treatments increase the expression of a glucomannan mannosyltransferase gene (GMMT) in *Aloe vera* Burm. F. *Phytochemistry*, 159, 90–101. doi: 10.1016/j.phytochem.2018.12.009
- Sánchez-Coello, N. G., Luna-Rodríguez, M., Vázquez-Torres, M., Sánchez-Velásquez, L. R., Santana-Buzzy, N., Octavio-Aguilar, P., & Iglesias-Andreu, L. G. (2012). Optimization of a protocol for DNA isolation and ISSR-PCR amplification system for *Ceratostamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 18(1), 123–133. doi: 10.5154/r.rchscfa.2011.03.024

- Sánchez-Rodríguez, A., Portal, O., Rojas, L. E., Ocaña, B., Mendoza, M., Acosta, M., ... Hofte, M. (2008). An efficient method for the extraction of high-quality fungal total RNA to study the *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* spp. interaction. *Molecular Biotechnology*, 40(3), 299–305. doi: 10.1007/s12033-008-9092-1
- Sandoval-Pineda, J. F., Ochoa-Corona, F. M., & Torres-Rojas, E. (2017). Evaluación de diferentes métodos de extracción de ARN a partir del hongo nativo *Xylaria* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 42–52. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57114
- SAS Institute. (2017). Statistical analysis system. The SAS system for Windows version 9.4. Cary, North Carolina, USA: Author
- Servicio Meteorológico Nacional (SMN). (2020). Normales climatológicas por estado. Retrieved from <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/informacion-climatologica/normales-climatologicas-por-estado>
- Silveira de Campos, G., Ayub, R. A., Mazer Etto, R., Weigert Galvão, C., Stroka, M. A., & Inaba, J. (2017). High-quality total RNA isolation from melon (*Cucumis melo* L.) fruits rich in polysaccharides. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(4), 2201–2207. doi: 10.5433/1679-0359.2017v38n4p2201
- Sparks, D. (2005). Adaptability of pecan as a species. *HortScience*, 40(5), 1175–1189. doi: 10.21273/HORTSCI.40.5.1175
- Thermo Fisher Scientific (2021). The basics: RNA isolation. Retrieved from www.thermofisher.com/mx/es/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/the-basics-rna-isolation.html
- Tongqiang, F., Qixiang, Z., Yuanyuan, H., Wang, Z., & Huang, Y. (2020). Genome-wide identification of lncRNAs during hickory (*Carya cathayensis*) flowering. *Functional & Integrative Genomics*, 20(4), 591–607. doi: 10.1007/s10142-020-00737-w
- Wang, Z., Huang, J., Sun, Z., & Zheng, B. (2015). Identification of microRNAs differentially expressed involved in male flower development. *Functional & Integrative Genomics*, 15(2), 225–232. doi: 10.1007/s10142-014-0409-9
- Wood, B. W. (2015). Regulation of vivipary in pecan. *Acta Horticultura*, 1070, 33–42. doi: 10.17660/ActHortic.2015.1070.3
- Zhao, L., Ding, Q., Zeng, J., Wang, F. R., Zhang, J., Fan, S. J., & He, X. Q. (2012). An improved CTAB-ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. *Phytochemical Analysis*, 23(6), 647–650. doi: 10.1002/pca.2368
- Zheng, B. S., Chu, H. L., Jin, S. H., Huang, Y. J., Wang, Z. J., Chen, M., & Huang, J. Q. (2010). cDNA-AFLP analysis of gene expression in hickory (*Carya cathayensis*) during graft process. *Tree Physiology*, 30(2), 297–303. doi: 10.1093/treephys/tpp102
- Zhihui, Ma., Binlong., H., Xu, S., Chen, Y., Li, S., & Lin, S. (2015). Isolation of high-quality total RNA from chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook). *PloS ONE*, 10(6), e0130234. doi: 10.1371/journal.pone.0130234

CAPÍTULO V

EXPRESIÓN RELATIVA DE GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO Y VIVIPARIDAD DE *Carya illinoensis* MEDIANTE RT-PCR CUANTITATIVA

RESUMEN

La viviparidad en nuez pecanera es considerada una amenaza importante para los productores ya que demerita la calidad del fruto y genera pérdidas económicas. Si bien, algunos estudios morfológicos y fisiológicos han permitido conocer tratamientos para disminuir dicho problema, los mecanismos genéticos que participan en la regulación de este fenómeno aún siguen siendo desconocidos. Para estudiar el papel del ácido abscísico y las giberelinas durante el desarrollo y viviparidad de la nuez, se evaluó la expresión relativa de genes que codifican para enzimas o precursores que participan en la síntesis de ácido abscísico y giberelinas. Se recolectaron frutos de nogal durante su desarrollo fenológico abarcando las etapas: inicio de desarrollo del fruto, estado acuoso, endurecimiento de cáscara, maduración de embrión y germinación del embrión. La extracción de ARN total se realizó utilizando el método CTAB 4, y los niveles de expresión de genes relacionados con la biosíntesis de ácido abscísico y giberelinas se midieron mediante PCR cuantitativa de transcripción inversa. Los genes estudiados mostraron una expresión positiva durante las diferentes etapas fenológicas de la nuez pecanera, sugiriendo su función asociada con el proceso de desarrollo y viviparidad de este fruto. Estos resultados manifiestan la función antagónica del ácido abscísico y las giberelinas en el desarrollo y viviparidad de la nuez pecanera, e indican que las altas concentraciones de ABA inducen la latencia de las semillas mientras la presencia de giberelinas activas se asocia con la germinación de la nuez contrarrestando los efectos del ácido abscísico.

Palabras clave: *Carya illinoensis*, desarrollo de semillas, germinación prematura, hormona vegetal, qRT-PCR.

**RELATIVE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN THE DEVELOPMENT
AND VIVIPARITY OF *Carya illinoensis* BY QUANTITATIVE RT-PCR**

ABSTRACT

Viviparity in pecan nuts is considered an important threat for producers since it detracts from the quality of the fruit and generates economic losses. Although some morphological and physiological studies have revealed treatments to reduce this problem, the genetic mechanisms involved in regulating this phenomenon are still unknown. To study the role of abscisic acid and gibberellins during pecan development and viviparity, the relative expression of genes that code for enzymes or precursors that participate in the synthesis of abscisic acid and gibberellins was evaluated. Pecan fruits were collected during their phenological development, covering the stages: beginning of fruit development, aqueous state, shell hardening, embryo maturation and embryo germination. Total RNA extraction was performed using the CTAB 4 method, and the expression levels of genes related to the biosynthesis of abscisic acid and gibberellins were measured by reverse transcription quantitative PCR. The studied genes showed a positive expression during the different phenological stages of the pecan nut, suggesting their function associated with the development process and viviparity of this fruit. These results show the antagonistic role of abscisic acid and gibberellins in the development and viviparity of the pecan nut and indicate that high ABA concentrations induce seed dormancy while the presence of active gibberellins is associated with nut germination counteracting the effects of abscisic acid.

Keywords: *Carya illinoensis*, seed development, premature germination, plant hormone, qRT-PCR.

INTRODUCCIÓN

El nogal pecanero (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch), perteneciente a la familia Juglandaceae, es una especie de árbol leñoso nativo de América del Norte. Siendo un importante productor de frutos secos y madera, lo que lo convierte en el frutal más valioso agrícola y económicamente en todo el mundo (Briceño-Contreras et al., 2018). El fruto de *Carya* es una nuez encerrada en una cáscara dehiscente y delgada (Grauke et al., 2016); compuesta principalmente de lípidos, proteínas, almidón, azúcares, vitaminas, aminoácidos, flavonoides, polifenoles, taninos y elementos minerales (Li et al., 2022) que sirven al embrión para la respiración, germinación e incluso en las primeras etapas de desarrollo de la planta hasta que se vuelve autosuficiente (Casales et al., 2018).

En las últimas décadas, el nogal pecanero ha recibido una atención creciente ya que por su origen y distribución se encuentra constantemente expuesto a temperaturas extremas, alta humedad ambiental y baja precipitación que, dependiendo de su intensidad y duración, pueden inhibir su crecimiento y desarrollo (Urrea y Urzúa, 2016), además de ocasionar problemas fisiológicos como la germinación de la nuez antes de la cosecha (viviparidad) que afecta considerablemente el rendimiento y calidad de la nuez (Vieira et al., 2015). En general, el desarrollo, latencia y germinación de las semillas son procesos necesarios compartidos por la mayoría de las plantas con flores. En las especies vivíparas, el desarrollo de la semilla se salta la latencia y procede directamente a la fase de germinación donde los embriones, a través de un proceso genético innato, crecen de manera precoz y germinan en hipocótilos antes de la dispersión (Elmqvist & Cox, 1996; Qiao et al., 2020). Este fenómeno específico se ha reportado en algunas especies cultivadas como el mangle, nogal, cebada, maíz y trigo (Qiao et al., 2020; Gualano, 2011; Bainotti et al., 2009; Lagarda, 2012), siendo relacionado directamente con el balance entre la acción de las giberelinas (GA) y el ácido abscísico (ABA), fitohormonas antagónicas en la germinación y latencia de las semillas, las primeras como estimulantes y las segundas como inhibidores (Gómez-Castañeda et al., 2003; Fernández-Arbaizar et al., 2002); así

como con las condiciones climáticas presentes en una región. Durante el desarrollo de la semilla, el ABA endógeno tiende a acumularse antes de la embriogénesis y disminuye cuando la semilla está seca. Los procesos regulados por ABA durante el desarrollo de la semilla incluyen la inducción de la dormancia (para evitar que germine en circunstancias no favorables), la acumulación de reservas (síntesis de proteínas y lípidos de reserva) y la adquisición de tolerancia a la desecación (Jordán & Casaretto, 2006a). Estos eventos están asociados con la expresión de genes específicos del tejido, entre ellos ZEP/ABA1, NCED, SDR/ABA2, AAO, ABA3, CYP707A, ABI3, ABI4 y ABI5 los cuales determinan las actividades de biosíntesis, inactivación/degradación y respuesta del ácido abscísico (Chen *et al.*, 2020; Xiong & Zhu, 2003). Mientras que las giberelinas están involucradas en la movilización de reservas, inducir la síntesis de α -amilasas y proteasas, y promover el desarrollo de los frutos y la germinación de las semillas en condiciones de dormancia (Jordán & Casaretto, 2006b), la síntesis y degradación de esta fitohormona están bien establecidas conociendo varios genes involucrados, como KS, KO, KAO, GA20ox, GA3ox y GA2ox los cuales controlan el nivel de giberelinas en las plantas (He *et al.*, 2020; Hedden & Thomas, 2012).

Si bien, algunos estudios morfológicos y fisiológicos han permitido conocer tratamientos para disminuir dicho problema (Rodríguez-González *et al.*, 2022; Wells, 2017; Wood, 2015; Aguilar-Pérez *et al.*, 2015) los mecanismos genéticos detrás de la viviparidad de la nuez pecanera aún son desconocidos. Por lo cual, el objetivo de este estudio fue evaluar el nivel de expresión relativa de algunos genes implicados en la síntesis de precursores que participan en la ruta de síntesis de ácido abscísico y giberelinas que se piensan están implicadas en el fenómeno de la viviparidad de la nuez pecanera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron nueces de nogal pecanero (*Carya illinoensis*) cv. Western de árboles de 48 años cultivados como material vegetal en este estudio. Los árboles están situados en el municipio de Viesca, Coahuila, México (25° 20' 28" N y 102° 10' y 48° 16' O, elevación 1,100 m). Bajo un clima árido (BWhw (e)), semicálido con lluvias en verano y de amplitud térmica extremosa con una temperatura media anual entre 18 y 22 °C y precipitación promedio anual entre 200 y 300 mm con régimen de lluvias en los meses de abril a noviembre y escasas en el resto del año (SMN, 2020). Los frutos de nogal se colectaron por separado durante su desarrollo fenológico abarcando las etapas: inicio de desarrollo del fruto (20 mayo), estado acuoso (30 junio), endurecimiento de cáscara (3 agosto), maduración de embrión (28 septiembre) y germinación del embrión (18 octubre). Para su análisis, las nueces fueron separadas del árbol, envueltas en papel aluminio y puestas en hielo inmediatamente para ser llevadas al laboratorio. Posteriormente, fueron almacenadas a -20 °C para su posterior uso en la extracción de ARN total en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango.

Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó utilizando el método CTAB 4, reportado en Rodríguez-González et al. (2023). La concentración del ARN se determinó a una densidad óptica de 260 nm y la pureza fue validada por la relación de los índices de absorbancia a 260 y 280 nm ($A_{260/280}$) así como a 260 y 230 nm ($A_{260/230}$) para evaluar la presencia de proteínas o compuestos fenólicos, respectivamente (Nanodrop, Thermo scientific). La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa-MOPS-formaldehído, a 50 volts durante 45 min, utilizando como tampón de electroforesis MOPS 1X. Se utilizó Gel Red® (Biotium, Hayward, CA, USA) para tinción del ARN. Los geles fueron visualizados con luz ultravioleta en un fotodocumentador UVP® MultiDoc It Imaging System.

Conjuntamente, el ARN fue tratado con DNAsa I (libre de RNAsa) (Invitrogen, Waltham, MA, USA) según las especificaciones del fabricante, para eliminar el ADN genómico restante.

Análisis de expresión génica

Los niveles de expresión de genes relacionados con la biosíntesis de ácido abscísico y giberelinas se midieron mediante PCR cuantitativa de transcripción inversa (qRT-PCR). Los primers utilizados diseñados a partir de la secuencia del genoma completo de *Carya illinoensis* cultivar 87MX3-2.11 (CM028997.1) (Platts et al., 2021) mediante la plataforma online IDT (Integrated DNA Technologies; PrimerQuest Tool | IDT (idtdna.com)) se muestran en el Cuadro 5. El análisis qRT-PCR se realizó utilizando Power SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). El proceso se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L como se describe a continuación: 50 ng/ μ L de ARN, 5 μ L de Master Mix Power SYBR-Green (2X), 0.08 μ L de RT Enzyrna Mix, 0.2 μ L de cada primer (10 μ M) y el volumen restante se completó con agua libre de RNAsas. El programa térmico fue: *RT*: 30 min. 48 °C; *PCR*: 10 min. 95 °C, 40x (15 s 95 °C y 1 min. 60 °C) y al final se realiza una curva de fusión, 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C y 15 s a 95 °C. El nivel relativo de expresión génica fue calculado por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen & Livak, 2008) tomando como referencia interna la expresión del gen *Actina*.

Cuadro 1. Lista de primers utilizados para el análisis de la viviparidad en nuez pecanera mediante qRT-PCR.

Gen	Enzima	Secuencia
GA3ox1-F	Giberelina	GGGAGGCTTATGTGGCTAATG
GA3ox1-R		GACAAGCAGGATAGGAGTTCAG
GA2ox2-F	Giberelina	GGCAGAGAAAGAACCACCATA
GA2ox2-R		CCATCAATCTCATCACCCCTCTC
ABA 8H-F	Ácido abscísico	ACAGAACACCACTACAGCAATA
ABA 8H-R		AGGGATATGAGGAAAGAGTTGTG
AOG-F	Ácido abscísico	GGTGCCACCCCTCTTATTATC
AOG-R		AAGGTGAAGGAGGAGGAGAA
Actina-F	Actina	CGATGCCCTGAGGTTCTATTC
Actina-R		TGTTGCCATACAGGTCCTTC

GA3ox1: Gibberellin 3-beta-hydroxylase, GA2ox2: Gibberellin 2-beta-dioxidase 2-related, ABA 8H: Abscisic acid 8'-hydroxylase y AOG: Abscisate beta-glucosyltransferase. F: Forward Primer, R: Reverse Primer.

Análisis estadístico

Para determinar las diferencias significativas entre los resultados obtenidos del análisis cuantitativo se implementó un modelo de análisis de varianza (ANOVA) con tres repeticiones y una prueba de medias de Tukey ($p < 0.05$). Para ello, se usó el programa SAS Versión 9.3 (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS

Se ha demostrado que las fitohormonas ácido abscísico y giberelinas son importantes para el desarrollo de la viviparidad en semillas (Xu et al., 2017), por lo cual se examinaron los perfiles de expresión de genes relacionados con dichas fitohormonas durante las etapas fenológicas características del desarrollo de la nuez pecanera; en *C. illinoensis* después de la fertilización del óvulo comienza el desarrollo del fruto (IDF), para luego pasar al estado acuoso (EA). Después del estado acuoso inicia el endurecimiento de cáscara (EC) para terminar en la madurez del embrión (ME). La transición de endurecimiento de cáscara a madurez del embrión marca la transición a germinación del embrión (GE) o viviparidad donde la radícula emerge de la capa del fruto y continua su crecimiento permaneciendo en el seno de la planta madre (Figura 4).

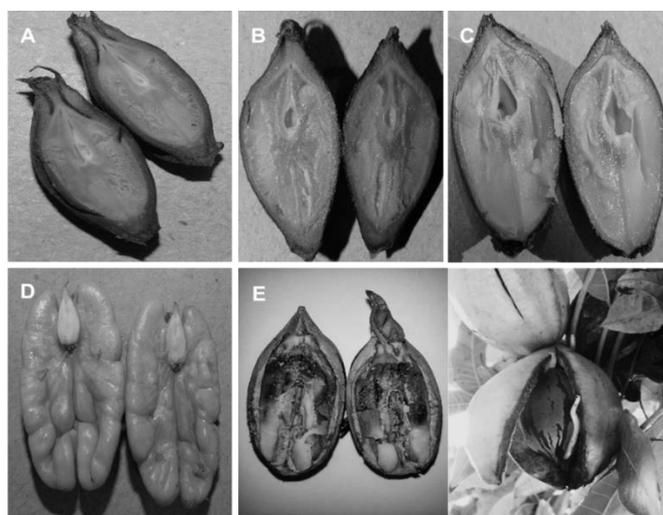


Figura 1. Evolución del desarrollo del fruto y el fenómeno de viviparidad en nuez pecanera. A: Inicio de desarrollo de fruto, B: Estado acuoso, C: Endurecimiento de cáscara, D: Maduración del embrión y E: Germinación del embrión (viviparidad).

Los genes estudiados mostraron una expresión positiva durante las diferentes etapas fenológicas de la nuez pecanera, sugiriendo su función asociada con el proceso de desarrollo y viviparidad de este fruto (Figura 5). En general, los genes relacionados con la biosíntesis del ácido abscísico se expresaron a niveles más

altos durante las cinco etapas fenológicas evaluadas. Dicha hormona actúa como regulador de crecimiento y se ha demostrado que su expresión determina la dormancia de las semillas. Mientras que los niveles de expresión de los genes biosintéticos de giberelinas fueron regulados a la baja tanto en las etapas de desarrollo como en el proceso de viviparidad. Siendo que las giberelinas también actúan como reguladores endógenos de crecimiento controlando el desarrollo y germinación de las semillas.

Los niveles de expresión del gen ABA 8'H muestra una tendencia de mayor expresión ($p < 0.05$) durante el estado acuoso del fruto y disminuye conforme transcurre el desarrollo de la nuez. Para luego volver a expresarse durante el proceso de maduración del embrión y se reduce durante la viviparidad de la nuez. Mientras que el gen AOG muestra una tendencia de expresión ($p < 0.05$) al alza durante todo el desarrollo de la nuez, alcanzando su máxima expresión durante la germinación. Estos resultados sugieren que la expresión de ABA 8H y AOG está estrechamente asociada con el nivel de ABA en la nuez y su capacidad de inhibir la germinación.

En relación con la biosíntesis de giberelinas el gen GA3ox1 mostró una mayor expresión ($p < 0.05$) durante el estado acuoso, etapa en que el fruto requiere de una rápida expansión celular para expandir el ancho total del fruto y el óvulo alcance su máxima longitud, y disminuye en las siguientes etapas fenológicas. En cuanto a GA2ox2, este gen se mantuvo en niveles relativamente bajos destacando su expresión ($p < 0.05$) durante el inicio del desarrollo del fruto y disminuyendo notablemente en las siguientes etapas de desarrollo. La GA2-oxidasa se caracteriza por ser una enzima implicada en la desactivación de las giberelinas bioactivas, lo que podría explicar sus niveles de expresión descendente durante el desarrollo y viviparidad de la nuez. Lo anterior implica que la presencia de GAs bioactivas promueve el crecimiento continuo del embrión y supera la latencia en la nuez pecanera.

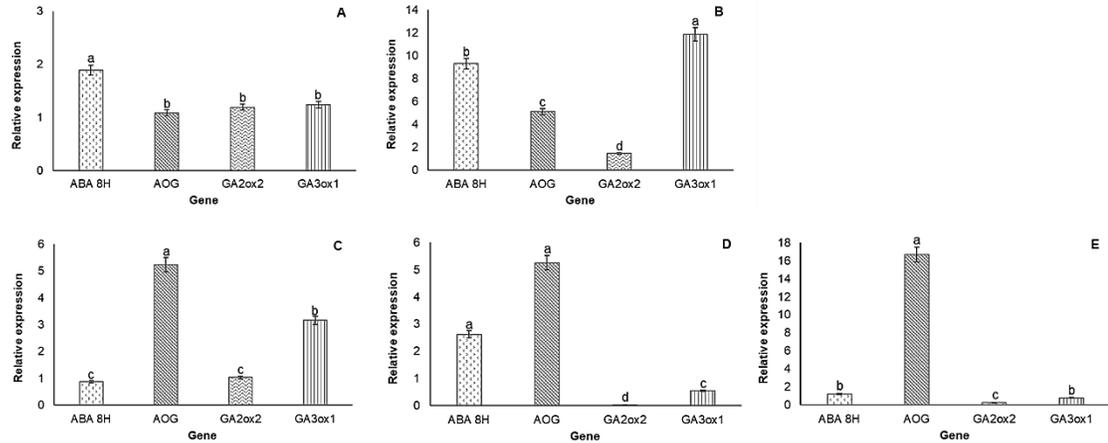


Figura 2. Expresión de genes relacionados con la biosíntesis de ácido abscísico y giberelinas durante el desarrollo y la viviparidad de *Carya illinoensis*. A: Inicio de desarrollo de fruto, B: Estado acuoso, C: Endurecimiento de cáscara, D: Maduración del embrión y E: Germinación del embrión (viviparidad). ABA 8H: Abscisic acid 8'-hydroxylase y AOG: Abscisate beta-glucosyltransferase, GA2ox2: Gibberellin 2-beta-dioxidase 2-related y GA3ox1: Gibberellin 3-beta-hydroxylase. Valores medios (n = 3) con las mismas letras dentro de una misma gráfica son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey (P > 0.05).

DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la expresión génica en el tejido embrionario de la nuez pecanera, con el fin de conocer los genes implicados en los procesos de desarrollo y viviparidad de esta. Desde una perspectiva socioeconómica, la nuez pecanera es una sustancial fuente de recursos alimenticios y monetarios; sin embargo, *C. illinoensis* al desarrollarse en regiones con condiciones extremas de alta temperatura y baja precipitación está constantemente expuesto a problemas fisiológicos como la viviparidad que afecta el rendimiento y calidad del fruto (Vieira et al., 2015). El desarrollo de la nuez puede ser dividido en 4 fases claras; I. Inicio de desarrollo de fruto, II. Estado acuoso, III. Endurecimiento de cáscara y IV. Maduración del embrión. Posteriormente, dependiendo de las condiciones genético-ambientales, se puede dar origen a la germinación de la nuez (viviparidad) previo a su cosecha. Sin embargo, es importante mencionar que la aparición de las diferentes fases varía entre regiones y años, como

resultados de la variación en las condiciones climáticas (Tarango, 2004). Los estudios referentes al tema se centran principalmente a nivel fisiológico y de manejo (Rodríguez-González et al., 2022; García-Moreno, 2020 y Barrera et al., 2017) por lo que, el mecanismo molecular que regula la latencia de la nuez aún no se conoce completamente, pero se reconoce la importancia de un equilibrio ácido abscísico-giberelinas (Finkelstein et al., 2008) ya que son hormonas necesarias para el crecimiento y desarrollo del embrión (Fernández, 2009).

El ABA desempeña una serie de funciones importantes en la fisiología de las plantas superiores, en las que se incluye promover la dormancia de yemas y semilla, así como el crecimiento, desarrollo y maduración de los frutos (Yang & Feng, 2015). Cuando se acumula en cierta medida, regulará una serie de actividades fisiológicas (Rodrigo et al., 2003), como el desarrollo, maduración y dormancia del embrión a través de una vía compleja de transducción de señales. El nivel de ABA activo en los tejidos vegetales está controlado no solo por la biosíntesis sino también por el catabolismo, que involucra reacciones de glicosilación e hidroxilación, catalizadas por ABA 8'-hidroxilasa (ABA 8'-H), abscisato β -glucosiltransferasa (AOG) y abscisato de β -d-glucopiranosil β -glucosidasa (Li et al., 2022).

Esta hormona relacionada con la regulación del equilibrio hídrico influye en el aumento del tamaño de frutos y la acumulación de antocianinas (González-García et al., 2020), puede inhibir la germinación y su acumulación se correlaciona con el inicio de la latencia en semillas (Monribot-Villanueva *et al.*, 2022). En el caso del catabolismo de ABA, este se convierte en formas inactivas por oxidación o conjugación. En plantas superiores la principal vía catabólica de ABA implica la oxidación de la enzima ABA 8'-hydroxylasa (Okamoto et al., 2009). La concentración de ABA durante la maduración de los frutos depende principalmente de la biosíntesis de *novo* de este regulador de crecimiento a través de la escisión de un precursor carotenoide o a través de su catabolismo por la ABA 8'-hidroxilasa (Monribot-Villanueva et al., 2022), así como de la inducción de la vía fenilpropanoide, la puerta de entrada para producir metabolitos

relacionados (Deng & Lu, 2017). Al estudiar el papel del gen catabólico ABA 8'H en el desarrollo y viviparidad de la nuez pecanera, durante las primeras etapas fenológicas (desarrollo de fruto y estado acuoso) se expresa positivamente. Y se reduce durante el proceso de endurecimiento de cáscara. Mientras que durante la maduración aumenta induciendo la dormancia del embrión y reprimiendo la viviparidad. En el caso de la nuez germinada, potencialmente, el ABA producido no es suficiente para inducir la dormancia, confirmando que la latencia depende de la síntesis de ABA durante la maduración del embrión.

Aunque la maduración y calidad de la fruta está sujeta al mecanismo de ABA, otros factores externos como luz, temperatura y reguladores transcripcionales también son importantes para la progresión y el resultado de estos procesos (Li et al., 2022). Algunos estudios revelan que el gen AOG regula la desactivación/activación del ABA en las plantas y su expresión esta inducida por ABA exógeno o estrés osmótico (Félix et al., 2019). En este estudio el AOG mostró mayor expresión durante el endurecimiento de cáscara y maduración del embrión, etapas que se caracterizan por requerir mayor suministro de nutrientes y agua para proveer condiciones favorables para el transporte de nutrientes, fotosíntesis y translocación de fotosintatos dentro de la planta para el llenado correcto del fruto y su madurez (Godoy, 2000). Sobre expresándose durante la germinación de la nuez. Esto se puede explicar ya que la abscisate beta-glucosyltransferase regula la conversión de ABA a su éster de glucosa, una forma de almacenamiento inactiva del ABA (Jin et al., 2021). Conjuntamente, la expresión génica del metabolismo de ABA se incrementa por el estrés osmótico, siendo los genes de desactivación/activación los que se elevan después de este (Félix et al., 2019). Lo que sugiere que la biosíntesis y acumulación de ABA en la nuez se vieron afectados por las señales ambientales (temperatura y humedad ambiental), condiciones de salinidad del suelo que se presentan en la región además de la baja disponibilidad de agua en el suelo, reduciendo la resistencia temprana a la dormancia.

En este estudio, la sobre expresión de AOG y la regulación a la baja de ABA 8'-H condujo a la disminución del contenido de ABA durante la transición madurez-viviparidad de la nuez. Se ha demostrado que una menor acumulación de ABA en plantas tolerantes al frío y la sequía es el resultado combinado de una menor expresión de los genes de biosíntesis y una mayor expresión de los genes de catabolismo (Ji et al., 2011). Los genes ABA 8H y AOG que se estudiaron en esta investigación muestran una tendencia similar en el desarrollo y viviparidad de la nuez pecanera bajo condiciones extremas de temperatura y baja precipitación. Consecuentemente, la homeostasis de ABA es importante para controlar o evitar la viviparidad en *Carya illinoensis*, es probable que ABA se inactive de manera gradual durante el desarrollo de la nuez y ABA 8'-hidroxilasa y AOG son enzimas potencialmente importantes para el catabolismo de ABA. Estas enzimas son un buen objetivo para manipular el contenido de ABA y controlar la viviparidad de la nuez con inhibidores químicos o mejoramiento genético.

Las giberelinas estimulan la germinación mediante la inducción de enzimas hidrolíticas que debilitan los tejidos que se oponen a la emergencia radicular, movilizan las sustancias de reserva de la semilla y estimulan la expansión del cotiledón. Además, también actúan desestabilizando las proteínas DELLA que reprimen el crecimiento y varias de ellas son necesarias para la latencia de las semillas, teniendo un papel importante en el control de la latencia y germinación de las semillas (Tejaswini et al., 2022; Fernández, 2009). La calidad de la luz y la temperatura ambiental afectan el contenido de giberelinas de la semilla y ocasionan su germinación, al promover la síntesis de GAs. En este estudio, la expresión de genes biosintéticos de giberelinas está regulada positivamente durante las diferentes etapas fenológicas de la nuez. Particularmente, el gen GA2ox2 está relacionado con la degradación de las GAs bioactivas (Jia et al., 2018) y la presencia de señales ambientales que impiden la germinación, como la oscuridad y las altas temperaturas, dando como resultado la promoción de enzimas catabolizadoras de GA, las GA2-oxidasas (Tejaswini et al., 2022). En este estudio, GA2ox2 presenta su mayor expresión durante las primeras etapas fenológicas, observándose un valor casi nulo durante la maduración del embrión,

indicando que la biosíntesis de GAs activas esta negativamente regulada por GA2-oxidasa conforme avanza el desarrollo de las semillas, evitando así la viviparidad (Raz et al., 2001). Se ha reportado que el ácido giberélico regula positivamente el crecimiento y alargamiento de órganos vegetales, promoviendo la expansión celular al mantener los niveles de GA a través de la supresión del gen de inactivación de giberelina (GA2ox2) (Schrager-Lavelle et al., 2019; Li et al., 2017).

Conjuntamente, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el gen GA3ox1 alcanza su mayor expresión durante la etapa de estado acuoso de la nuez y disminuyen conforme el fruto alcanza su madurez y durante el proceso de viviparidad. Se ha demostrado, que GA3-oxidasa es uno de los principales genes implicados en la producción de GAs bioactivas (Fernández, 2009). Por lo que la expresión del gen biosintético GA3ox1 en las semillas podría promover la producción de mayores contenidos de GA y el alargamiento del hipocótilo facilitando así la germinación (Qiao et al., 2020). En este estudio, aunque se observó una baja expresión del gen GA3ox1 en nuez germinada estos niveles permitieron inhibir la latencia de la semilla. Ya que la enzima sintética GA3-oxidasa es clave de las GAs bioactivas y regula positivamente el metabolismo de GA (Liu & Hou, 2018). Adicionalmente, los bajos niveles de expresión de GA3ox1 sugieren que la viviparidad de la nuez no es mediada por la acción única de las giberelinas, sino que son otras fitohormonas, como auxinas, ácido salicílico y ácido jasmónico (Alcantara-Cortes et al., 2019), las encargadas de desencadenar este fenómeno.

El mantenimiento de la latencia de semillas por ABA y la liberación de latencia por GA se ha observado en muchas especies. La liberación de latencia refleja en gran medida el aumento de la síntesis de GA, determinada principalmente por reacciones catalizadas por GA20-oxidasa, Ga3-oxidasa (GA3ox1 y GA3ox2), mientras que GA es inactivado por GA 2-oxidasa (Ga2ox) (Wang et al., 2021). En este estudio, la supresión del gen GA2ox2 y la expresión positiva de GA3ox1 permitieron la inhibición de la latencia en nuez pecanera induciendo a su

germinación. Por lo que es viable la manipulación de estas enzimas para el estudio y control de la viviparidad en *C. illinoensis*.

Una comprensión profunda de la biología molecular de la nuez pecanera podría ayudar a mitigar la viviparidad a través de la regulación génica, por lo que es necesario realizar investigación adicional y en profundidad sobre las fitohormonas (ácido abscísico, ácido indolacético, giberelinas, citoquininas y etileno) relacionadas con la dormancia y germinación de semillas para conocer a fondo los mecanismos involucrados en este proceso.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio demuestran la función antagónica del ácido abscísico y las giberelinas en el desarrollo y viviparidad de la nuez pecanera, e indican que las altas concentraciones de ABA inducen la latencia de las semillas mientras la presencia de GAs activas se asocia con la germinación de la nuez contrarrestando los efectos del ABA.

Estos resultados son un acercamiento para dilucidar aún más en el mecanismo molecular del desarrollo y viviparidad de la nuez pecanera.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Pérez, H., Arreola-Ávila, J. G., Morales-Olais, E., Cuéllar-Villarreal, E., Lagarda-Murrieta, A., Tarango-Rivero H., ...Lombardini, L. (2015). 'Norteña' Pecan. *HortScience*, 50(9), 1399–1400. doi: 10.21273/HORTSCI.50.9.1399
- Alcantara-Cortes, J. S., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. D., & Sánchez Mora, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129.
- Bainotti, C., Cuniberti, M., Masiero, B., Donaire, G., Gómez, D., Reartes, F., Salines, J., Formica, M., Fraschina, J., Nisi, J., Mir, L. & Berra, O. (2009). Caracterización de cultivares de trigo por brotado en precosecha. *Agriscientia*, 26(1), 29-33.
- Barrera, A. A. A., Guillen, J. A. A., Tamargo, E. M., Rangel, P. P., y Murrieta, A. L. (2017). Efecto de la longitud de los brotes fructíferos de nogal pecanero sobre la producción, calidad de almendra y viviparidad de la nuez. *Agrofaz: publicación semestral de investigación científica*, 17(1), 35-42. ISSN 1665-8892.
- Briceño-Contreras, E. A., Valenzuela-Núñez, L. M., Espino-Castillo, D. A., García de la Peña, C., Esparza-Rivera, J. R., & Borja de la Rosa, A. (2018). Contenido de almidón en órganos de nogal (*Carya illinoensis* Koch) en dos etapas fenológicas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(SPE20), 4161-4173.
- Casales, F. G., Van der Watt, E., & Coetzer, G. M. (2018). Propagation of pecan (*Carya illinoensis*): a review. *African Journal of Biotechnology*, 17(18), 586-605.
- Chen, K., Li, G. J., Bressan, R. A., Song, C. P., Zhu, J. K., & Zhao, Y. (2020). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(1), 25-54.
- Deng, Y., & Lu, S. (2017). Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 36(4), 257-290.
- Elmqvist, T., & Cox, P. A. (1996). The evolution of vivipary in flowering plants. *Oikos*, 3-9.
- Fernández, R. I. (2009). *El cross-talk etileno/giberelinas y la rotura de la dormición de semillas de Sisymbrium officinale L. provocada por el after-ripening*. Universidad Santiago de Compostela.
- Fernández-Arbaizar, D. O. A., Albertos-Arranz, P., Javier, J., & Regalado, O. L. (2002). *Aislamiento y caracterización de factores transcripcionales relacionados con la germinación y su implicación en la señalización de ácido abscísico y óxido nítrico*. Universidad de Salamanca. Salamanca, España.

- Félix, K., Su, J., Lu, R., Zhao, G., Cui, W., Wang, R., Mu, H., Cui, J. & Shen, W. (2019). Hydrogen-induced tolerance against osmotic stress in alfalfa seedlings involves ABA signaling. *Plant and Soil*, 445(1), 409-423. doi: 10.1007/s11104-019-04328-y
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., & Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, 59 (1) (2008), pp. 387-415. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092740
- García-Moreno, B. Y., Báez-Sañudo, R., Mercado-Ruiz, J. N., García-Robles, J. M., y Núñez-Moreno, J. H. (2020). Bioregulación de la germinación prematura de nuez pecanera mediante aplicaciones precosecha con ácido 2-hidroxibenzoico. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 21(2). ISSN: 1665-0204. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81365122005>
- Godoy A., C., Reyes J., I., Torres E., C. A., Huitrón R., M. V., Cristian C., J. y Morales V., J. (2000). *Tecnología de riego en nogal pecanero. Etapas y periodos fenológicos del nogal y sus requerimientos de agua*. CELALA, CIRNOC, INIFAP. Matamoros, Coahuila.
- Gómez-Castañeda, J. A., Ramírez, H., Benavides-Mendoza, A., & Encina-Rodríguez, L. I. (2003). Germinación y crecimiento de plántula en chincuya (*Annona purpurea* Moc y Sessé) y su relación con los niveles de giberelinas y ácido abscísico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 9(2), 243-253.
- González-García, L. D. C., Báez-Sañudo, R., Mercado-Ruiz, J. N., & García-Robles, J. M. (2020). Prácticas para el desarrollo del color en uvas de mesa de variedades coloridas: una revisión. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 21(2).
- Gualano, N. A. (2011). *Brotado pre-cosecha y pre-germinado en cebada cervecera: predicción de la susceptibilidad del cultivo basada en el ambiente y manejo pos-cosecha de los granos dañados*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. Argentina.
- Grauke, L. J., Wood, B. W., & Harris, M. K. (2016). Crop vulnerability: *Carya*. *HortScience*, 51(6), 653-663.
- He, J., Xin, P., Ma, X., Chu, J., & Wang, G. (2020). Gibberellin metabolism in flowering plants: An update and perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 11, 532. doi: 10.3389/fpls.2020.00532
- Hedden, P., & Thomas, S. G. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal*, 444(1), 11-25. doi: 10.1042/BJ20120245
- Jia, Y., Li, R., Yang, W., Chen, Z., & Hu, X. (2018). Carbon monoxide signal regulates light-initiated seed germination by suppressing SOM expression. *Plant Science*, 272, 88-98. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.04.009

- Ji, X., Dong, B., Shiran, B., Talbot, M. J., Edlington, J. E., Hughes, T., Blanco, R. G., Gubler, F. & Dolferus, R. (2011). Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals. *Plant physiology*, 156(2), 647-662. doi: 10.1104/pp.111.176164
- Jin, J., Mingyue, Z., Gao, T., Tingting, J., Zhang, N., Wang, J., Zhang, X., Huang, J., Schwab, W. & Chuankui, S. (2021). Amplification of early drought responses caused by volatile cues emitted from neighboring plants. *Horticulture Research*, 8(1). doi: 10.1038/s41438-021-00704-x
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006a). *Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico*. Squeo, F, A., & Cardemil, L.(eds.). Ediciones Universidad de La Serena, Chile. Fisiología vegetal. 16: 1-28
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006b). *Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas*. Squeo, F, A., & Cardemil, L.(eds.), Ediciones Universidad de La Serena, Chile, Fisiología Vegetal 15: 1-28.
- Lagarda M., A. (2012). *La germinación prematura de la nuez pecanera (viviparidad)*. Memoria científica, XIII Simposio Internacional de Nogal Pecanero. Hermosillo, Sonora. Pp.58.
- Li, Y., Wang, J., Wang, K., Lyu, S., Ren, L., Huang, C., Pei, D., Xing, Y., Wang, Y., Xu, Y., Li, P., Xi, J., Si, X., Ye, H. & Huang, J. (2022). Comparison analysis of widely targeted metabolomics revealed the variation of potential astringent ingredients and their dynamic accumulation in the seed coats of both *Carya cathayensis* and *Carya illinoensis*. *Food Chemistry*, 374, 131688. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131688
- Li, B. J., Grierson, D., Shi, Y., & Chen, K. S. (2022). Roles of abscisic acid in regulating ripening and quality of strawberry, a model non-climacteric fruit. *Horticulture Research*. 9. doi: 10.1093/hr/uhac089
- Li, H., Torres-Garcia, J., Latrasse, D., Benhamed, M., Schilderink, S., Zhou, W., Kulikova, O., Hirt, H., & Bisseling, T. (2017). Plant-specific histone deacetylases HDT1/2 regulate Gibberellin 2-Oxidase2 expression to control *Arabidopsis* root meristem cell number. *The Plant Cell*, 29(9), 2183-2196. doi: 10.1105/tpc.17.00366
- Liu, X., & Hou, X. (2018). Antagonistic regulation of ABA and GA in metabolism and signaling pathways. *Frontiers in plant science*, 9, 251. Doi: 10.3389/fpls.2018.00251
- Monribot-Villanueva, J. L., Altúzar-Molina, A., Aluja, M., Zamora-Briseño, J. A., Elizalde-Contreras, J. M., Bautista-Valle, M. V., Arellano S., J., Sánchez-Martínez, D. E., Rivera-Reséndiz, F. J., Vázquez-Rosas-Landa, M., Camacho-Vázquez, C., Guerrero-Analco, J. A. & Ruiz-May, E. (2022). Integrating proteomics and metabolomics approaches to elucidate the ripening process in white *Psidium guajava*. *Food Chemistry*, 367, 130656. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130656

- Okamoto, M., Tanaka, Y., Abrams, S. R., Kamiya, Y., Seki, M., & Nambara, E. (2009). High humidity induces abscisic acid 8'-hydroxylase in stomata and vasculature to regulate local and systemic abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, *149*(2), 825-834. doi: 10.1104/pp.108.130823
- Platts, A., Shu, S., Wright, S., Barry, K., Edger, P., Pires, J. C. & Schmutz, J. (2021). *Carya illinoensis* cultivar 87MX3-2.11 chromosome 1 genomic scaffold, whole genome shotgun sequence. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MU179928.1>
- Qiu, L., Jiang, B., Fang, J., Shen, Y., Fang, Z., Rm, S. K., Yi, K., Shen, C., Yan, D. & Zheng, B. (2016). Analysis of transcriptome in hickory (*Carya cathayensis*) and uncover the dynamics in the hormonal signaling pathway during graft process. *BMC genomics*, *17*(1), 1—13. doi: 10.1186/s12864-016-3182-4
- Qiao, H., Zhou, X., Su, W., Zhao, X., Jin, P., He, S., Hu, W., Fu, M., Yu, D., Hao, S., Zhang, Y., Wang, W., Ye, C., Li, Q. y Shen, Y. (2020). The genomic and transcriptomic foundations of viviparous seed development in mangroves. *bioRxiv*. DOI:10.1101/2020.10.19.346163
- Raz, V., Bergervoet, J. H., & Koornneef, M. (2001). Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development*, *128*(2), 243-252.
- Rodrigo, M.J., J.F. Marcos, F. Alferez, M. Mallent & L. Zacarias (2003). Characterization of pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *Journal of Experimental Botany* *54*: 727-738.
- Rodríguez-González, M., Arreola-Ávila, J. G., Trejo-Calzada, R., Cueto-Wong, J. A., Zegbe-Domínguez, J. A., Reyes-Juárez, I., ... & Borja-de la Rosa, A. (2022). Yield and vivipary of pecan nut (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) in relation to soil moisture. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, *28*(1). doi: 10.5154/r.rchscfa.2021.07.046
- Rodríguez-González, M., Arreola-Ávila, J. G., Ávila-Rodríguez, V., García-González, F., Quezada-Rivera, J. J., Mota-Iltuarte, M. S., & Borja-de la Rosa, A. (2023). Protocols for extraction of total RNA from pecan nut (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) embryo tissue. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, *29*(1), 131–145. doi: 10.5154/r.rchscfa.2022.08.057
- SAS Institute. (2017). *Statistical analysis system. The SAS system for Windows version 9.4*. Cary, North Carolina, USA: Author
- Schrager-Lavelle, A., Gath, N. N., Devisetty, U. K., Carrera, E., López-Díaz, I., Blazquez, M. A., & Maloof, J. N. (2019). The role of a class III gibberellin 2-oxidase in tomato internode elongation. *The Plant Journal*, *97*(3), 603-615. Doi: 10.1111/tpj.14145

- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Servicio Meteorológico Nacional (SMN). (2020). *Normales climatológicas por Estado*. Retrieved from <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/información/climatologica/normales-climatologicas-por-estado>
- Tarango-Rivero, S. H. (2004). *Manejo del nogal pecanero con base en su fenología*. SAGARPA.
- Tejaswini, U., Sowjanya, S., & Adhithya, G. (2022). *Genetic Control for Integration of Maturation and Germination Pathways in Seed Development*. Chief Editor Dr. RK Naresh. Chapter-3. 83, 27.
- Urrea L., R. y Urzúa E., E. (2016). *Retos y oportunidades en la producción de nuez pecanera en México*. Cap. 1. pp. 1-53. En Reyes V., N. C. y Urrea L., R. 2016. Retos y Oportunidades para el aprovechamiento de la Nuez pecanera en México. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). Guadalajara, Jalisco.
- Vieira de F., F. A., Chávez S., N., Núñez M., J. H., Valdez G., B., Pérez L., A., Velarde F., I., Tarango R., S. y Cuéllar V. E. (2015). *Avances en estudio fenológico sobre efecto del cambio climático en nogal pecanero*. Memoria Científica No. 6. XVI Simposio Internacional de Nogal Pecanero. Hermosillo, Sonora.
- Sun, M., He, C., Yu, K., Zhao, B., Li, R., Li, J., Yang, Z., Wang, X., Duan, H., Fu, J., Liu, S., Zhang, X. & Zheng, J. (2021). Multi-omics analyses reveal systemic insights into maize vivipary. *Plants*, 10(11), 2437. Doi: 10.3390/plants10112437
- Wells, L. (2017). *Southeastern pecan growers' handbook*. Georgia, USA: Cooperative Extension Service, University of Georgia College of Agricultural & Environmental Sciences.
- Wood, B. (2015). Regulation of vivipary in pecan. *Acta Horticulturae*, 1070, 33–42. doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1070.3
- Xiong, L., & Zhu, J. K. (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant physiology*, 133(1), 29-36. doi: 10.1104/pp.103.025395
- Xu, S., He, Z., Zhang, Z., Guo, Z., Guo, W., Lyu, H., Li, J., Yang, M., Du, Z., Huang, Y., Zhou, R., Zhong, C., Boufford, D. E., Lerdau, M., Wu, C., Duke, N. C. & Shi, S. (2017). The origin, diversification and adaptation of a major mangrove clade (Rhizophoraceae) revealed by whole-genome sequencing. *National Science Review*, 4(5), 721-734. doi: 10.1093/nsr/nwx065
- Yang, F. W., & Feng, X. Q. (2015). Abscisic acid biosynthesis and catabolism and their regulation roles in fruit ripening. *Phyton*, 84(2), 444-453.