

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



Facultad de Ciencias

El papel del estrés oxidativo durante el
endurecimiento (*Priming*) en semillas de *Dodonaea*
viscosa (L). Jacq.- Sapindaceae

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

IVÁN ALEJANDRO REYNA LLORENS

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ROCÍO CRUZ ORTEGA

2008



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Agradecimientos

Primero que nada quiero agradecer a la Universidad por haberme dado la mejor formación posible.

Agradezco a la Dra Alma por todas sus enseñanzas, por su rigor científico y por su apoyo. A la Dra Judith por su amor a la universidad y por su ayuda en la parte anatómica la cual resulto en un trabajo muy completo. A la Dra Sobeida por todas sus aportaciones y por sus valiosos consejos. A la Maestra Tere por aceptar ser parte de este proyecto y por sus revisiones tan completas. A la Biol. Yolanda Hornelas por su paciencia, por su tiempo y por su habilidad en el microscopio electrónico. A la maestra Irene por darme otra perspectiva de la Biología y por sus enseñanzas en Ecología.

A la Dra Rocío por todos los consejos, buenos momentos, regaños, jalones de orejas, clases, artículos y enseñanzas que me dio. Gracias por haber adquirido tal compromiso para mi formación como Biólogo y sobretodo por ser una muy buena amiga y excelente persona.

A todos los miembros del laboratorio de Aleopatía por su buena disposición y por su buena onda.

Agradezco a toda mi familia por todo el apoyo que me han brindado durante los últimos 25 años. En lo que respecta a este trabajo quiero darle las gracias a Marco por su dominio extremo en photoshop y sobretodo por la animación que realizó para la presentación.

Gracias a Kinné por su apoyo en todo momento y por su buen humor tan único, pero sobretodo por su amor a lo largo de estos años en los que he sido muy feliz.

A todos mis cuates del Santo FC por hacer de los sábados el mejor día de la semana, a Nadia, Alita, “El Macizo” Cordoba, Lococho y todos mis amigos por su amistad.

Por último quiero agradecer al Dr Robert Marley por brindarme su sabiduría en los momentos más difíciles.

| |
|---|
| <p>Hoja de datos del jurado</p> |
| <p>1. Datos del alumno Reyna Llorens Iván Alejandro 55495728 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 300501393</p> |
| <p>2.- Datos del tutor Dra María del Rocío Cruz Ortega</p> |
| <p>3.- Datos del Sinodal 1 Dra Alma Delfina Orozco Segovia</p> |
| <p>4.- Datos del Sinodal 2 Dra Judith Márquez Guzmán</p> |
| <p>5.- Datos del Sinodal 3 Dra Sobeida Sánchez Nieto</p> |
| <p>6.- Datos del Sinodal 4 Dra María Teresa Romero Romero</p> |
| <p>7.- Datos del trabajo escrito El papel de la respuesta antioxidante durante el endurecimiento (priming) en semillas de <i>Dodonaea viscosa</i> (L). Jacq.- Sapindaceae. 55 p 2008</p> |

Índice

| | |
|---|-----------|
| Resumen..... | 4 |
| Introducción | 5 |
| Semillas..... | 5 |
| Germinación..... | 6 |
| Latencia en semillas..... | 8 |
| Endurecimiento o “Priming”..... | 10 |
| Estrés oxidativo..... | 11 |
| Dodonaea viscosa..... | 14 |
| Objetivos..... | 15 |
| Metodología..... | 16 |
| Resultados y discusión..... | 25 |
| <i>Las semillas de Dodonaea viscosa enterradas con un tratamiento previo de escarificación responden de manera favorable al Priming Natural, en cuanto a la dinámica de su germinación.....</i> | 25 |
| <i>El patrón de imbibición es fundamental para caracterizar la respuesta de Dodonaea viscosa al Priming Natural</i> | 29 |
| <i>Las semillas de los tratamientos BE y CE muestran una cubierta seminal muy deteriorada en comparación con los demás tratamientos.....</i> | 30 |
| <i>La actividad del sistema antioxidante incrementa considerablemente en las semillas de Dodonaea viscosa que fueron enterradas con un tratamiento de pre- escarificación.....</i> | 38 |
| <i>El Priming Natural involucra cambios a nivel fisiológico, morfológico y metabólico</i> | 47 |
| Conclusiones..... | 48 |
| Bibliografía..... | 49 |
| Anexos..... | 53 |

Resumen

La germinación es un evento muy importante que ocurre como parte del ciclo de vida de las plantas con semilla. La germinación comienza con la absorción de agua por parte de la semilla y termina con la protrusión de la radícula.

Por otro lado, el Priming es una técnica ampliamente estudiada para aumentar la velocidad y la uniformidad en la germinación de las semillas. Esta técnica consiste en someter a las semillas a periodos de hidratación y deshidratación controlados, ya sea utilizando agua (Hidropriming) o soluciones osmóticas (Osmopriming). Asimismo, hay otro tipo de *priming* que se da en ambientes estacionales, en donde las semillas sufren de períodos de imbibición-secado causados por las lluvias esporádicas previas a la época de lluvia, a éste se conoce como *Priming* Natural. En estos períodos de hidratación-deshidratación, las semillas sufren cambios fisiológicos importantes los cuales promueven un aumento en la sincronización y en la tasa de germinación de las semillas. Sin embargo, los efectos fisiológicos del *Priming* Natural no han sido del todo estudiados.

Durante la germinación se incrementa la actividad respiratoria de la semilla lo cual está asociado a un aumento en la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno). Dicho aumento puede provocar un deterioro en la semilla capaz de afectar la germinación, por lo tanto los antioxidantes presentes en la semilla son muy importantes para que la germinación se lleve a cabo con éxito.

Una especie característica de ambientes estacionales y de comunidades secundarias es *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq.-(Sapindaceae). El éxito en su establecimiento está asociado fuertemente a su germinación. Se ha demostrado que el *Priming* Natural influye de manera positiva en la germinación de esta especie (Benítez, 2005). Por lo tanto, *Dodonaea* es una buena especie para estudiar con mayor profundidad los efectos bioquímicos, fisiológicos y morfológicos causados por el *Priming* Natural.

El objetivo del presente trabajo fue contribuir al entendimiento del *Priming* Natural en relación con la morfología de las semillas y con la dinámica del sistema antioxidante en semillas de *Dodonaea viscosa* expuestas al enterramiento.

Introducción

Semillas

Las semillas son óvulos maduros y generalmente fecundados que contienen un embrión y componentes de reserva rodeados de una cubierta protectora (Vander Wall *et al.*, 2005). La maduración del óvulo se da al momento de la fertilización. Antes de que ésta ocurra, el óvulo consiste de una o dos envolturas llamadas tegumentos las cuales rodean a una nucela ubicada de manera central. La nucela a su vez contiene al saco embrionario. Los tegumentos no se cierran y originan una apertura conocida como el micrópilo. Esta estructura funciona generalmente como una entrada para el tubo polínico (Boeswinkel & Bouman, 1995).

Una semilla típica consta de una cubierta seminal (producto de uno o ambos tegumentos del rudimento seminal, el tegumento interno forma al tegmen y el externo a la testa), el perispermo (la nucela que almacena sustancias nutritivas), el endospermo (tejido que resulta de la fusión de una célula espermática y los núcleos polares de la célula central del saco embrionario) y el embrión (resultado de la fertilización de la célula huevo u oosfera por una célula espermática) (Figura 1) (Hernández, 2006).

Las semillas contienen en su interior reservas que las hacen independientes de los recursos nutrimentales que hay en el medio para sobrevivir (Lambers *et al.*, 1998). Estas reservas provienen de la planta madre y se concentran en varios tejidos como son los cotiledones, el perispermo y el endospermo y a veces la cubierta seminal. Los compuestos acumulados por las semillas varían ampliamente entre especies, pero se pueden categorizar en carbohidratos, lípidos y proteínas (Hernández, 2006).

Las otras partes del óvulo como el funículo, la rafe, la calaza, y el micrópilo pueden, en su mayoría, ser reconocidas en la semilla madura y se les llama de la misma forma. La cicatriz del funículo se le conoce como hilo. El micrópilo en muchas ocasiones es difícil de localizar, sin embargo forma una pequeña depresión. La raíz del embrión está situada

en dirección del micrópilo lo cual puede facilitar la abertura de la cubierta seminal durante la germinación (Boeswinkel & Bouman, 1995).

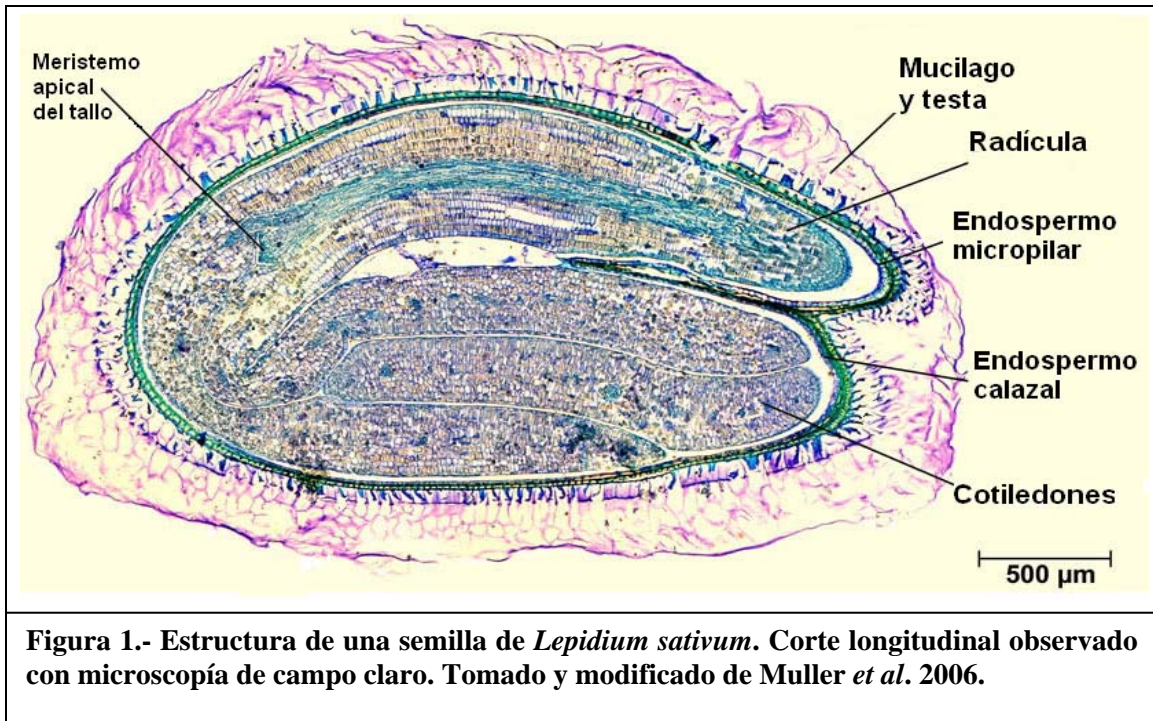


Figura 1.- Estructura de una semilla de *Lepidium sativum*. Corte longitudinal observado con microscopía de campo claro. Tomado y modificado de Muller *et al.* 2006.

Germinación

La germinación es un evento muy importante que ocurre como parte del ciclo de vida de las plantas con semilla. Este proceso marca la transición entre dos etapas del desarrollo de la planta: de semilla a plántula (Lambers *et al.*, 1998). Las semillas son el producto de la reproducción sexual en la mayoría de las plantas vasculares y son el medio por el cual la planta produce descendientes genéticamente diversos capaces de sobrevivir en ambientes cambiantes (Vander Wall *et al.*, 2005). Por otro lado, la semilla es la principal unidad de dispersión de las plantas, convirtiéndola así en un elemento fundamental dentro de la historia de vida de éstas.

La germinación incorpora aquellos eventos que comienzan con la absorción de agua por parte de la semilla seca (quiescente) y termina en la elongación del eje embrionario (Bewley, 1997). El proceso de hidratación o imbibición en las semillas es fundamental

para que se de la germinación, este se distingue por presentar tres fases (Figura 2): La primera fase se caracteriza por una rápida toma de agua por parte de la semilla (Imbibición) seguida por una fase estacionaria (Fase II). Un incremento posterior en la hidratación de la semilla ocurre solo cuando la germinación se ha completado mientras el eje embrionario se elonga (Fase III) (Manz *et al.*, 2005). Se dice que el proceso de la germinación ha finalizado cuando la radícula ha emergido de la testa de la semilla (Bewley, 1997).

Durante la germinación ocurren una serie de eventos metabólicos y fisiológicos (Figura 2), como la activación de la respiración, la reparación de macromoléculas, la movilización de reservas, el reinicio del ciclo celular así como el debilitamiento de las estructuras de cobertura y la testa con el fin de que pueda emerger la radícula (Soeda *et al.*, 2005).

El hecho de que una semilla viable germine, así como el tiempo en el que lo haga depende de varios factores incluyendo aquellos factores internos propios de la semilla (Bewley & Black, 1994). Aunque las condiciones ambientales sean ideales para que comience el proceso de germinación, existe una característica intrínseca de la semilla la cual bloquea el proceso; la latencia.

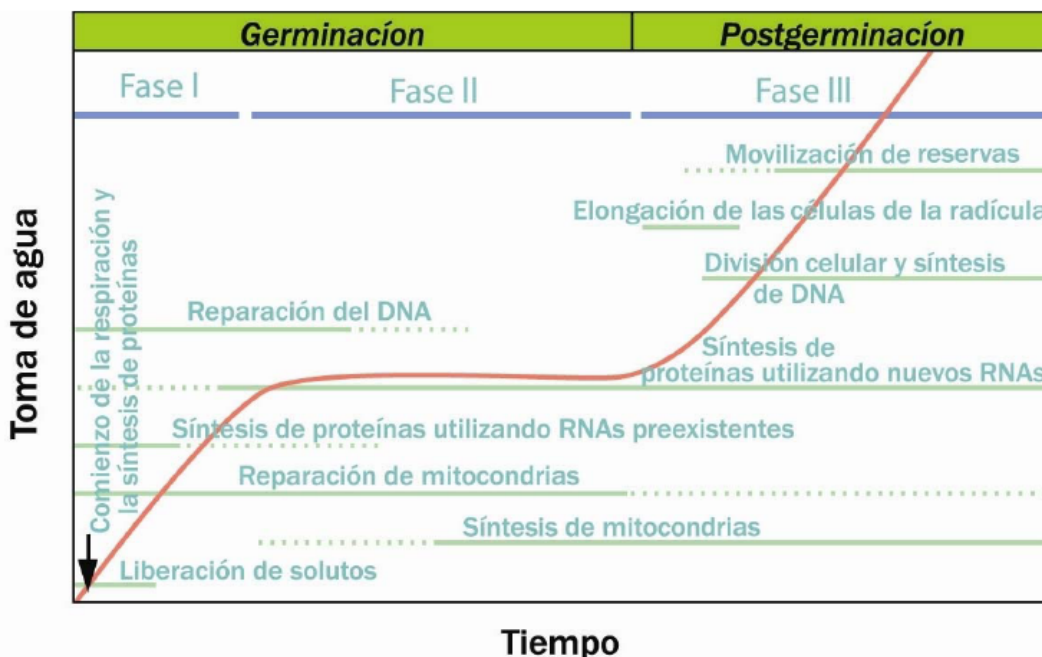


Figura 2.- Principales eventos asociados a la imbibición y al crecimiento postgerminativo. (Tomado y modificado de Bewley, 1997).

Latencia en semillas

La latencia en semillas es una propiedad innata que define las condiciones ambientales en las cuales una semilla es capaz de germinar (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Una semilla en latencia no tiene la capacidad de germinar en un periodo de tiempo específico, bajo cualquier combinación de factores ambientales normales los cuales serían favorables para su germinación de acuerdo a su genotipo (Baskin & Baskin, 2004). A lo largo de la evolución de las plantas con semilla, se han generado varios mecanismos de latencia de acuerdo a la diversidad de climas y hábitats en los que se han encontrado distribuidas. Estos mecanismos están determinados por las propiedades tanto morfológicas como fisiológicas de las semillas (Nikolaeva, 2004). Baskin & Baskin (1998, 2004) han propuesto un sistema de clasificación el cual incluye cinco tipos de latencia en semillas. (1) La Latencia Fisiológica (PD) es la forma más abundante de latencia encontrada tanto en gimnospermas como en angiospermas. Este tipo de latencia puede dividirse en tres: Latencia Fisiológica Profunda, Intermedia y No Profunda. Para que se rompa este tipo de latencia la semilla debe de cambiar su estado fisiológico. Factores como la temperatura, el potencial hídrico, la luz, los nitratos, los gases provenientes del fuego y giberelinas (GA) pueden romper la latencia de este tipo (Bewley & Black, 1994). (2) El segundo tipo de latencia es la llamada Latencia Morfológica (MD), esta se observa en semillas que presentan un embrión subdesarrollado en términos de tamaño, sin embargo, el embrión se encuentra notablemente diferenciado (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). (3) El tercer tipo de latencia es una combinación entre el tipo 1 y el tipo 2. En este tipo de latencia, las semillas presentan un embrión subdesarrollado y además poseen una limitante fisiológica que aporta el estado de latencia a la semilla (Baskin & Baskin, 2004), este tipo de latencia se conoce como Latencia Morfofisiológica (MPD). Las semillas con MPD requieren tratamientos de estratificación o de hormonas vegetales (Giberelinas) para poder dar inicio a la germinación. (4) El cuarto tipo de latencia se refiere a la Latencia Física (PY). Esta latencia es causada por la barrera compuesta por las láminas de células en empalizada en la semilla o la cubierta del fruto las cuales controlan la absorción del agua. Un tratamiento de escarificación física o química puede romper este tipo de latencia (Finch-

Savage & Leubner-Metzger, 2006). El último tipo de latencia según esta clasificación es (5) la Latencia Combinada (PY + PD), la cual se presenta en semillas que poseen latencia física (PY) combinada con una latencia fisiológica en el embrión (PD) (Baskin & Baskin, 2004).

Independientemente de esta clasificación, se ha establecido una distinción entre la latencia generada durante la liberación de la semilla de la planta madre (Latencia Primaria) y la latencia inducida después de la dispersión en el caso de que las condiciones ambientales no sean favorables para la germinación (Latencia Secundaria) (Lambers *et al.*, 1998). La latencia primaria está influenciada por el ácido absísico (ABA) presente durante la maduración de la semilla en la planta madre. Las concentraciones de ABA así como la sensibilidad del embrión a esta hormona se pierde en respuesta a las condiciones ambientales prevalecientes. La latencia secundaria puede perderse y reinducirse repetidamente mientras las estaciones climáticas cambian hasta que las condiciones ambientales adecuadas para la germinación estén disponibles (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006), por ejemplo, en semillas de *Chenopodium album* las bajas temperaturas durante el verano pueden liberar la latencia mientras que altas temperaturas de verano pueden inducirla (Vleeshouwers *et al.*, 2001). Además la latencia secundaria puede estar asociada a ciclos anuales en el banco de semillas (Baskin & Baskin, 1998).

La temperatura, así como el potencial osmótico tienen una influencia fundamental en la latencia y germinación de las semillas, afectando tanto la capacidad de germinación al regular la latencia así como la tasa o velocidad de germinación en semillas no-latentes (Alvarado & Bradford, 2002). Existen herramientas como el modelo de Tiempo Hidrotermal para cuantificar las respuestas germinativas ante estos factores (Allen *et al.*, 2000) y de esta manera determinar tanto la temperatura como el potencial osmótico óptimo para la germinación. Además de esta herramienta, en el campo de la Agronomía se ha desarrollado una técnica que busca incrementar la capacidad germinativa, aumentar la velocidad de germinación y promover la sincronía en un lote de semillas. Esta técnica se conoce como de Endurecimiento o “*Priming*”.

Endurecimiento o “Priming”

El endurecimiento (priming) es una técnica ampliamente utilizada para aumentar notablemente el potencial de la semilla con respecto al rango y a la uniformidad en la germinación (Heydecker, 1978). El objetivo del endurecimiento es hidratar de manera controlada la semilla antes de que la radícula emerja (Job *et al.*, 2000), esto con el fin de que la semilla no pierda su tolerancia a la desecación y pueda ser almacenada. Existen varios tipos de endurecimiento, principalmente se habla de dos: si las soluciones para embeber las semillas son agua (en estado líquido o vapor) se le denomina “Hidropriming”, por otro lado, si las semillas se embeben en soluciones osmóticas de poli/etilén/glicol (PEG) y NaCl, se le denomina “Osmopriming” (Gonzales-Zertuche *et al.*, 2000). Algunos de los eventos moleculares que se han estudiado durante el priming incluyen la acumulación de β -tubulina en relación a la reactivación del ciclo celular (De Castro *et al.*, 2000), el debilitamiento de las paredes de las células del endospermo por la actividad de las hidrolasas (Bradford *et al.*, 2000), la movilización de proteínas de reserva (11S Globulinas) así como la acumulación de proteínas de choque térmico (HSP), de dehidrinas, catalasa (Gallardo *et al.*, 2001) y proteínas de abundancia durante la embriogénesis tardía (LEA) (Soeda *et al.*, 2005).

Por otro lado, en el banco de semillas, éstas están expuestas a diferencias en temperatura, potencial hídrico, oxígeno y otros factores propios del suelo los cuales pueden variar ampliamente durante un solo día (González-Zertuche *et al.*, 2001). En ambientes estacionales las semillas sufren de períodos de imbibición-secado causados por las lluvias esporádicas previas a la época de lluvias. En estas circunstancias, las semillas sufren cambios fisiológicos importantes. Por lo tanto, estos regímenes de hidratación-deshidratación propios del priming pueden presentarse de manera natural (*Priming Natural*), afectando notablemente la dinámica de las poblaciones de semillas en su ambiente natural.

El “*Priming Natural*” es un mecanismo que induce un aumento en la capacidad germinativa, así como en la sincronía de las semillas durante la germinación en especies

como *Wigandia urens* y *Dodonaea viscosa* (González-Zertuche *et al.*, 2000; Benítez, 2005; Gamboa-deBuen *et al.*, 2006). Sin embargo, los efectos del endurecimiento natural (Priming Natural) a nivel molecular no han sido del todo estudiados. Se sabe que durante este proceso, se lleva a cabo la movilización de proteínas similares a las 7-S globulinas, la solubilización de 11-S globulinas, también se lleva a cabo un aumento en la síntesis de proteínas, similares a las proteínas LEA (González-Zertuche *et al.*, 2000), así como el consumo de sacarosa antes de que se de la protusión o emergencia de la radícula (Gamboa-deBuen *et al.*, 2006). Por otro lado, se han detectado cambios en el sistema antioxidante, en relación a la actividad de la catalasa así como en los niveles de peróxido de hidrógeno (Gamboa-deBuen *et al.*, 2006).

Estrés Oxidativo

La evolución de las vías metabólicas aeróbicas como la respiración y la fotosíntesis ha llevado inevitablemente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en todas las formas de vida aerobias. Las ROS son consideradas como moléculas tóxicas ya que están implicadas en el deterioro y el envejecimiento de las plantas. Sin embargo, estos organismos han desarrollado diversos mecanismos para lidiar con este tipo de estrés.

A continuación se describen con mayor detalle las principales fuentes de ROS así como los mecanismos encargados de defender a las plantas del estrés oxidativo.

ROS: Los radicales libres son formas parcialmente reducidas de oxígeno atmosférico (O_2) (Mittler, 2002). Se considera que son tres las principales especies reactivas de oxígeno; el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot). Estas especies se generan por las reacciones de transferencia de electrones o por transferencia de energía (Apel & Hirt, 2004). La reducción del oxígeno forma el radical superóxido (O_2^-), esta molécula posee un electrón desapareado, sin embargo no es tan reactiva ya que su periodo de vida es relativamente corto. El O_2^- puede formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la presencia del ion H^+ o por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), además el radical superóxido en presencia de Fe^{2+} o algún otro metal de transición, puede formar el radical hidroxilo (OH^\cdot) por medio de la

reacción de “Haber-Weiss y Fenton”. El OH^- se considera como el radical mas agresivo proveniente de derivados del oxígeno (Bailly, 2004).

Las fuentes generadoras de ROS son amplias (Figura 3), estas pueden ser resultado del estrés tanto biótico como abiótico. La fotosíntesis y la respiración son de las mayores fuentes de ROS. Se dice que la cantidad de H_2O_2 producida es directamente proporcional a la actividad respiratoria (Staniek *et al.*, 2000). Otras fuentes de ROS incluyen la participación de la glicolato oxidasa en los peroxisomas durante la fotorespiración (Mittler, 2002), la muerte celular programada (Fath *et al.*, 2001; Dat *et al.*, 2000) y la interacción planta-patógeno, la cual involucra a la NADPH oxidasa (Grant & Loake, 2000). En la semilla, la autoxidación de los lípidos principalmente durante la desecación y almacenamiento de la semilla es también una fuente de ROS.

Defensa antioxidante: Existen varios mecanismos enzimáticos encargados de eliminar las ROS (Figura 2). La superóxido dismutasa (SOD) es la primera línea de defensa contra estos radicales (Alscher *et al.*, 2002). Esta enzima dismuta el O_2^- y lo convierte en H_2O_2 . La SOD puede ser mitocondrial (MnSOD), citosólica (Cu/ZnSOD) o cloroplástica (CuZnSOD, FeSOD) (Bailly, 2004). La enzima catalasa (CAT) se encarga de detoxificar el H_2O_2 y convertirlo en H_2O . La catalasa puede localizarse en los glioxisomas y en los peroxisomas. A diferencia de la catalasa, existen otras enzimas que trabajan en conjunto con los antioxidantes no enzimáticos; dichas enzimas son la ascorbato peroxidasa (APX), la monodehidroascorbato reductasa (DHAR) y la glutatión reductasa (GR). Estas enzimas pertenecen al ciclo del ascorbato-glutatión. Las enzimas de este ciclo se encuentran presentes en los cloroplastos, el citoplasma, la mitocondria, los peroxisomas y el apoplasto (Mittler, 2002). Este ciclo funciona de la siguiente manera: La remoción del H_2O_2 por la APX ocurre por la oxidación del ascorbato a monodehidroascorbato (MDA) el cual se regenera por la MDA reductasa (MDAR) usando NAD(P)H como equivalente reductor. La regeneración del ascorbato es mediada por la dehidroascorbato reductasa (DHAR) llevada a cabo por la oxidación del GSH a GSSG. Finalmente la GR puede regenerar el GSH del GSSG usando NAD(P)H como agente reductor (Apel & Heribert, 2004).

ROS y Germinación: En el caso de las semillas, la germinación está asociada a un fuerte incremento en la actividad respiratoria (Srivastava, 2002), lo que causa un aumento en la producción de ROS. Altas concentraciones de ROS en la semilla pueden provocar un daño capaz de afectar la germinación, por lo tanto los antioxidantes presentes en la semilla son considerados de particular importancia para que la germinación se lleve a cabo exitosamente (Bailly, 2004).

Los mecanismos eliminadores de ROS son bastante eficientes, sin embargo las ROS no se llegan a eliminar por completo (Bailly, 2004). Se sabe que las ROS no solo son elementos dañinos sino que tienen un papel como moléculas señal. Una perturbación en los niveles de ROS puede ser percibida por una variedad de proteínas, enzimas o receptores, resultando en la modulación de diferentes vías las cuales pueden estar relacionadas con el metabolismo, el desarrollo o la defensa de la planta (Mittler *et al.*, 2004). Algunos componentes involucrados en los mecanismos de señalización pueden estar siendo oxidados directamente por las ROS. Finalmente las ROS podrían cambiar la expresión genética al actuar o modificar factores de transcripción (Apel & Heribert, 2004). Diferentes especies reactivas de oxígeno pueden activar diferentes vías de señalización. Laloi y colaboradores (2006) demostraron en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* que diferentes ROS activan grupos de genes diferentes; sin embargo, existe una fuerte intercomunicación entre estos radicales lo cual puede modificar la expresión de los genes que cada ROS activa de manera independiente.

Las ROS podrían estar involucradas en todas las etapas de la vida de una semilla, desde su desarrollo hasta la germinación (Bailly, 2004), por lo tanto, el estudio de la dinámica del sistema antioxidante en las semillas se convierte en un punto crucial para conocer los eventos fisiológicos que ocurren en procesos como el *Priming* Natural.

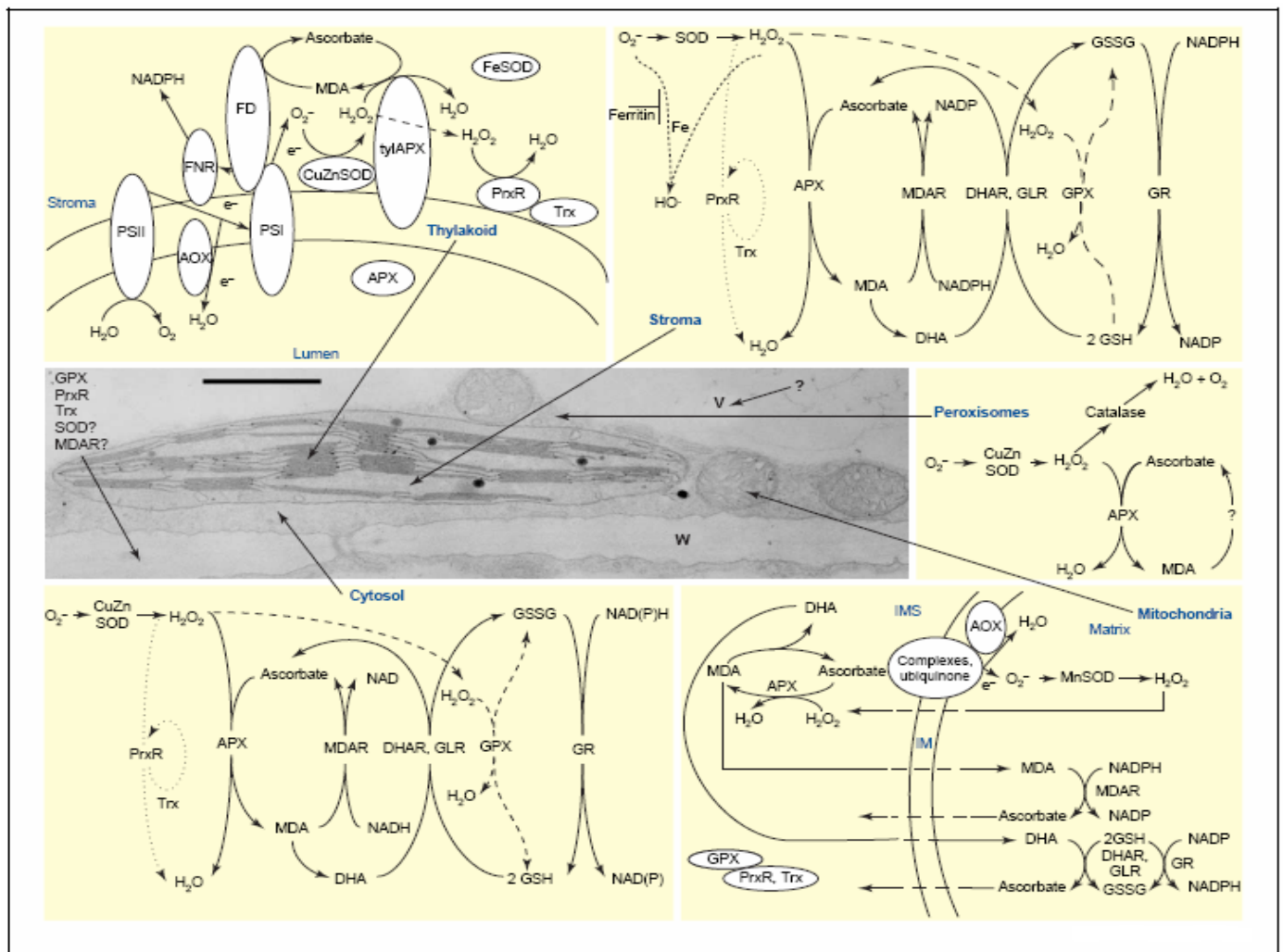


Figura 3. Localización de las principales fuentes de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en las células vegetales, así como los principales mecanismos antioxidantes (Tomado de Mittler *et al.*, 2004). Durante la germinación, la fotosíntesis está inactiva ya que los cloroplastos aún no están desarrollados. Por lo tanto, no se estarían generando ROS por esta vía. Sin embargo la movilización de reservas, la activación de las mitocondrias y la auto peroxidación de lípidos son fuentes de ROS durante el proceso de germinación.

Dodonaea viscosa

Dodonaea viscosa (L.) Jacq.-Sapindaceae, es una dicotiledónea que junto a los miembros de las familias Brassicaceae y Malvaceae pertenecen al grupo Eurosidae II. *Dodonaea viscosa* es un árbol perenne que mide de 1 a 5 m de alto. Las flores son amarillentas y unisexuales. El fruto es de forma capsulosa y membranosa, de color rojizo con 3 divisiones y 3 alas. Su floración se presenta de septiembre a octubre. Su semilla es esferoide de 2.44 mm de diámetro de color negro o café oscuro brillante (Rzendowski,

1954). La fructificación se presenta de diciembre a enero (Marroquín, 1985). Aunque puede producir brotes, dentro de la historia de vida de *Dodonea viscosa* la producción de semillas es muy importante ya que es el principal medio de dispersión que tiene esta planta. *D. viscosa* es una planta cosmopolita, se distribuye de manera natural casi en todo México. Su distribución incluye zonas templadas, subtropicales y tropicales. *D. viscosa* crece en una gran variedad de suelos que incluye los someros, rocosos, con fuertes pendientes y en suelos de alta erosión. Además puede estar en zonas con limitación de agua. En la cuenca de México se encuentra con frecuencia en zonas bajas, como es el caso del Pedregal de San Ángel en la Ciudad de México.

Esta Sapindacea se asocia con comunidades secundarias, etapas sucesionales de bosques perturbados, especialmente de los encinares y tipos de vegetación mesófila, bordes de arroyos, barrancos y taludes, claros de bosques, lugares expuestos, pastizales deteriorados, terrenos erosionados y matorrales (Rzendowski, 1954). También se han encontrado ejemplares creciendo sobre suelos endurecidos (tepetate) alcanzando alturas promedio de 1.7 m, mientras que en toba removida alcanzaron tallas de 4 m (Camacho *et al.* 1991).

El éxito en el establecimiento de *D. viscosa* está fuertemente relacionado a la germinación. Benítez (2005) demostró que las semillas de *D. viscosa* sometidas al “*Priming Natural*” presentan una mayor capacidad germinativa, una alta sincronía durante la germinación así como un aumento en la sobrevivencia de las plántulas resultantes. Por lo tanto, el *Priming Natural* influye de manera positiva en el establecimiento de esta planta.

Estos antecedentes nos muestran que *Dodonea viscosa* es una buena especie para estudiar con mayor profundidad los procesos fisiológicos que ocurren en las semillas durante el *Priming Natural*. Es probable que la dinámica del sistema antioxidante pudiera verse modificada durante los periodos de hidratación-deshidratación característicos de este proceso. Es por ello que en este trabajo se estudiaron los efectos del *Natural Priming* en el sistema antioxidante durante la germinación de semillas de *Dodonea viscos*

Objetivo General

Entender algunos de los efectos fisiológicos característicos del *Priming* Natural en relación con la morfología de las semillas y la dinámica del sistema antioxidante en semillas de *Dodonaea viscosa* expuestas al enterramiento.

Objetivos Particulares

- Evaluar las diferencias morfológicas en las semillas sometidas a *Priming* Natural durante la germinación.
- Obtener la tasa de germinación, la tasa instantánea de germinación y el porcentaje de germinación para las semillas de cada tratamiento.
- Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, APX, SOD y GR) durante la germinación.
- Determinar los niveles de ROS (O_2^- , H_2O_2 , $\bullet OH$) durante la germinación.
- Relacionar la respuesta antioxidante con la dinámica germinativa de las semillas.

Metodología

Material biológico

El trabajo se realizó con semillas de *Dodonea viscosa* (L.) Sapindaceae, colectadas durante el mes de marzo de 2006 en el Parque Ecológico de la Ciudad de México (PECM). Las semillas fueron limpiadas y separadas por flotación para determinar su viabilidad.

Zona de estudio

El Parque Ecológico de la Ciudad de México se ubica en la delegación Tlalpan en el Distrito Federal, al SO de la ciudad de México entre los paralelos (19°10'00" y 19°14'30" latitud norte, 99°16'40" y 99°13'00" de longitud oeste, con una superficie total de 727 ha (Benítez, 2005).

El área esta sometida a una clara estacionalidad. El clima de la zona es del tipo Cb'(w2)(w)ig, templado húmedo con una temperatura media anual del mes más frío de 9.1°C y del mes más caliente de 13.9°C. La precipitación del mes más seco es de 8.9mm y del mes más húmedo es de 229.5mm (González-Hidalgo, 1998).

Escarificación

La mitad de las semillas colectadas fueron sometidas a un tratamiento de escarificación con H₂SO₄ concentrado [Baker Analyzed®] durante dos minutos.

Endurecimiento natural (Natural Priming)

Semillas escarificadas y no escarificadas fueron colocadas en bolsas de organza para protegerlas de la depredación, posteriormente fueron enterradas a aproximadamente 15 cm de profundidad en el suelo.

Las semillas fueron enterradas en la época seca por seis semanas durante los meses de abril a mayo del 2006 en el Parque Ecológico de la Ciudad de México en dos sitios contrastantes: Claro y Bosque (Figura 4).



Figura 4.- Sitios de Enterramiento: A) Bosque, B) Claro.

El Claro se caracteriza por ser un sitio abierto dominado por pastos donde las fluctuaciones de temperatura son más intensas que en el Bosque (Figura 5), el cual es un sitio cerrado cubierto principalmente por encinos donde las variaciones de temperatura son menores.

Junto con las bolsas se colocaron data loggers o sensores de temperatura (HOBOS ®) en cada sitio para medir las fluctuaciones de temperatura durante el proceso.

A manera de control un lote de semillas no escarificadas así como un lote de semillas escarificadas fueron almacenadas en el laboratorio a temperatura ambiente.

Al concluir el periodo de enterramiento las semillas fueron exhumadas y colocadas en un cuarto oscuro para su desecación.

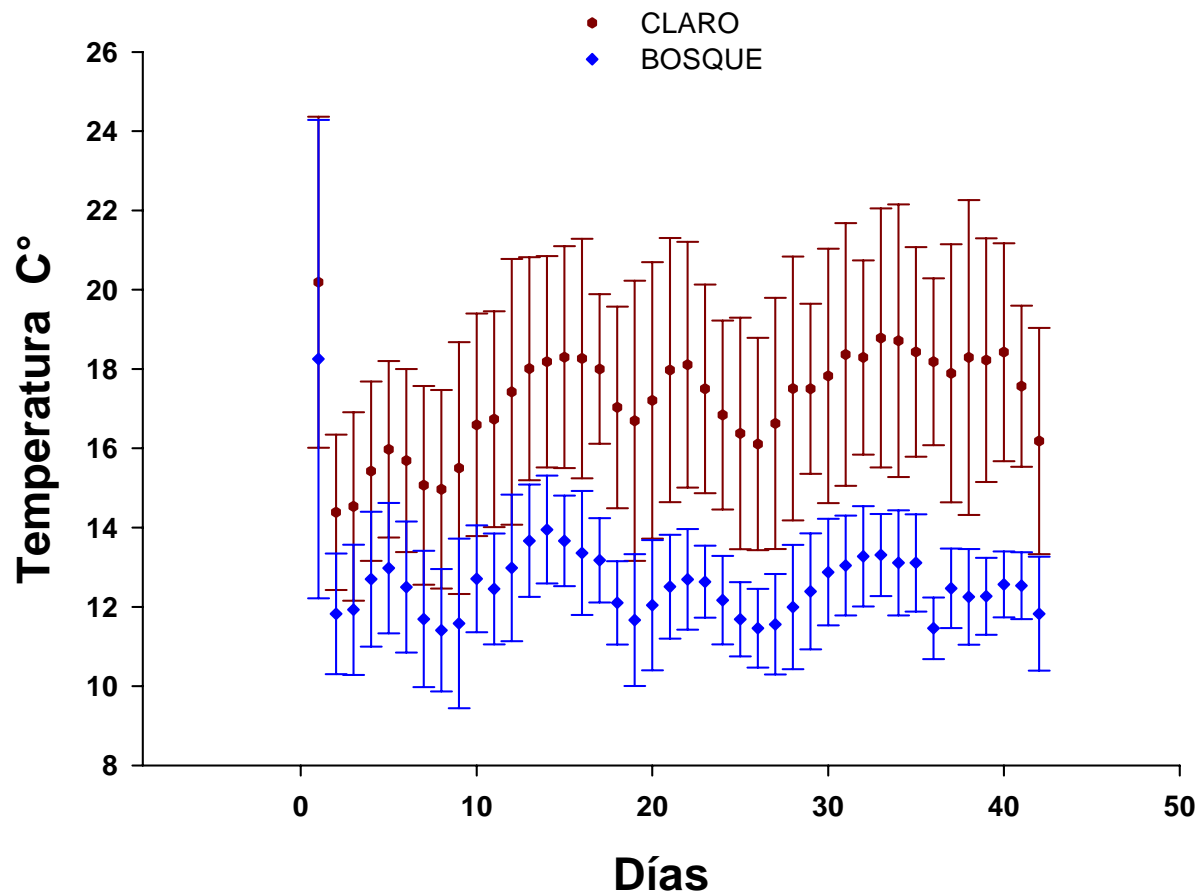


Figura 5.- Registro de la temperatura en cada uno de los sitios de enterramiento. Los puntos azules representan la temperatura media del Bosque, mientras que los puntos rojos representan la temperatura media del Claro. Las barras muestran la variación de temperatura durante cada uno de los días en que las semillas estuvieron enterradas en el suelo. El Claro muestra una mayor temperatura promedio además de una mayor variación en la temperatura en comparación con el Bosque.

Pruebas de Germinación

Para el caso de las pruebas de germinación, el diseño experimental fue un factorial con 2 factores (Enterramiento y Escarificación). El factor Enterramiento incluyó 3 niveles (Enterramiento en el Bosque, Enterramiento en el Claro y No Enterramiento), mientras que el factor Escarificación incluyó 2 niveles (Escarificado y No Escarificado). Al final se obtuvo un total de 6 tratamientos diferentes: Bosque Escarificado (BE), Bosque No Escarificado (BNE), Claro Escarificado (CE), Claro No Escarificado (CNE), Control Escarificado (CoE) y Control No Escarificado (Control).

Semillas de todos los tratamientos fueron colocadas en cajas de Petri con Agar al 1% y ubicadas en una cámara de ambiente controlado (Lab-Line, Instruments, Inc.) con un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad a una temperatura constante de 25°C.

Los porcentajes de germinación obtenidos fueron transformados por medio de una transformación arcoseno para el análisis estadístico. Se realizó un Análisis de Varianza de dos vías con un nivel de probabilidad de $p \leq 0.05$, utilizando el programa estadístico STATISTICA 6.1 (Statsoft, Inc. 1984-2003 Tulsa, Ok. U.S.A.). En los casos donde se encontraron diferencias significativas se realizó un análisis de comparaciones múltiples utilizando el método de la mínima diferencia significativa (LSD).

Curvas de imbibición

Un lote de semillas de todos los tratamientos fue colocado en Agar al 1% en cajas de Petri e introducidas en una cámara de ambiente controlado (Lab-Line, Instruments, Inc.) con un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad a una temperatura constante de 25°C. Con un intervalo de una hora, se registró la ganancia de peso fresco con una balanza (OHAUS™ Explorer). Las curvas de imbibición fueron ajustadas a un modelo exponencial con el software Table Curve™ 2D (Jandel Scientific Software, 1994). De este ajuste se obtuvo la primera derivada máxima, esto con el fin de comparar si existían diferencias en la tasa de imbibición de cada tratamiento.

Ensayos enzimáticos

Todos los ensayos enzimáticos fueron realizados con técnicas de espectrofotometría, utilizando un espectrofotómetro Varian-CARY 50 Bio (DATOS ESP). Para las actividades enzimáticas, se realizó una extracción de proteína total para cada uno de los tratamientos a las 0, 12, 24 y 48 horas de imbibición en Agar al 1%. Los tiempos de cosecha fueron elegidos en función de las curvas de germinación para cada tratamiento y representan cada una de las fases del proceso de germinación. Cabe recordar que en los ensayos descritos a continuación las semillas pertenecientes a BNE, CNE y Control fueron colocadas en agua caliente antes de ser imbibidas en Agar.

Las semillas fueron homogenizadas en un amortiguador de extracción que contenía 50 mM de amortiguador de fosfato de potasio a pH 7.0, elaborado a partir de fosfato dibásico 50 mM (K_2PO_4H) y fosfato monobásico 50 mM (KPO_4H_2) [Baker Analyzed®]. 1 mM de EDTA y 1% de PVP [SIGMA®] (100 mg/mL) para Catalasa (CAT) y Glutation reductasa (GR); y con 1 mM de ascorbato [SIGMA®] para la determinación de la actividad de la Ascorbato peroxidasa (APX). El homogenado total fue centrifugado a 3000 x g por 15 min a 4°C para remover los desechos celulares. La concentración de proteína fue determinada de acuerdo al método de Bradford (1976).

A continuación se describe a detalle cada uno de los ensayos enzimáticos:

- **Catalasa** (EC 1.11.1.6).- La actividad de CAT fue determinada siguiendo el consumo de H_2O_2 (coeficiente de extinción $39.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a 240 nm por 3 min (Aebi, 1984). El medio de reacción contenía un amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.0), 10 mM H_2O_2 y 100µg de extracto proteico en un volumen final de 1 mL.
- **Ascorbato peroxidasa** (EC 1.11.1.11).- La actividad de APX fue determinada siguiendo el decremento/consumo del ascorbato en A_{290} (coeficiente de extinción $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por 3 minutos en un medio de reacción que contenía un amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.0), 0.5 mM ASC [SIGMA®], 0.1 mM H_2O_2 y 100µg de extracto proteico en un volumen final de 1 mL (Jiang & Zhang, 2002).
- **Glutation Reductasa** (EC 1.6.4.2).- La actividad de GR fue determinada al seguir la oxidación de NADPH a 340 nm (coeficiente de extinción $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por 3 minutos en un medio de reacción que contenía un amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.8), 2 mM EDTA, 0.15 mM NADPH [SIGMA®], 0.5 mM GSSG [SIGMA®], y 100 µg de extracto proteico en un volumen final de 1 mL (Jiang & Zhang, 2002).

- **Superoxido Dismutasa** (EC 1.15.1.1).- La actividad de SOD fue determinada siguiendo la auto-oxidación de la epinefrina (adenocromo) de acuerdo al método de Misra & Fridovich (1972), usando el coeficiente de extinción ($4020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A diferencia de las enzimas anteriores, el tejido fue homogenizado con 1 mL de amortiguador de fosfatos 100 mM (pH 7.8) y 0.1 mM EDTA. Las muestras fueron centrifugadas a $6000 \times g$ por 15 min a 4°C . La actividad se llevo a cabo en un volumen final de 1 mL, el cual contenía 50 mM de amortiguador de carbonato de sodio (pH 10.2), 0.5 mM de EDTA, 50 μg de proteína y 0.5 mL de 10 mg/mL de epinefrina [SIGMA®] (disuelta en 10 mM de HCl, pH 2). La auto-oxidación de la epinefrina se determinó a 480 nm cada 20 s por 30 min considerando solamente las lecturas después de la fase lag. Los niveles de Ion Superóxido (O_2^-) fueron determinados usando la pendiente de las lecturas tomadas antes de la fase lag y divididas por los mg de proteína.

NIVELES DE H_2O_2 : Las concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) fueron determinadas por colorimetría con el método descrito por Jana & Choudhuri (1981). H_2O_2 fue extraído al homogenizar 100 mg de tejido con 0.75 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 6.5). El homogenado total fue centrifugado a $6000 \times g$ por 15 min a 4°C . El sobrenadante resultante de la centrifugación fue mezclado con 0.25 mL de sulfato de titanio 1% (en 20% (v/v) H_2SO_4). La mezcla fue centrifugada de nuevo a $6000 \times g$ por 10 min y la intensidad del color amarillo fue medida a 410 nm. Los niveles de H_2O_2 fueron calculados usando el coeficiente de extinción ($0.28 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Para todos los ensayos anteriores se realizaron ANOVAS de tres vías con una $p \leq 0.05$ por medio del programa STATISTICA 6.1 (Statsoft, Inc. 1984-2003 Tulsa, OK. U.S.A.). En los casos donde se encontraron diferencias significativas se realizó un análisis de comparaciones múltiples utilizando el método de la mínima diferencia significativa (LSD).

Estudio Anatómico

Fijación y deshidratación: Semillas de cada uno de los tratamientos fueron fijadas con FAA (10% Formol, 5% Ácido acético glacial, 50% Alcohol etílico y 35% Agua destilada) por 72 h. Debido a que la cubierta de las semillas de *Dodonaea* es muy dura, ésta se tuvo que retirar de forma manual para poder llevar a cabo la deshidratación gradual de las semillas. Las semillas sin cubierta fueron deshidratadas gradualmente en metanol con diluciones de menor a mayor porcentaje (30, 50, 70, 85, 96 y 100%) durante 2 h en cada solución. Después, las muestras se transfirieron a una mezcla de alcohol absoluto-xilol 1:1 por una hora, para luego ser colocadas en xilol puro durante 30 min.

Inclusión en Paraplast®: El material deshidratado se colocó en una serie de mezclas compuestas de xilol-paraplast® 2:1, xilol-paraplast® 1:1 y xilol-paraplast® 1:2 durante 12 h en cada mezcla. Concluido este tiempo las muestras fueron colocadas en paraplast® puro durante 4 días. Transcurrido este tiempo, se elaboraron bloques de paraplast® en donde fueron colocadas cada una de las semillas.

Obtención de cortes:

Se realizaron cortes longitudinales con un grosor de 15 micras con un micrótopo de rotación (Sorvall, TC-2; Smith & Farquhar, Newtown, CT, USA). Los cortes fueron colocados en portaobjetos, se desparafinaron y se sometieron a la tinción Safranina-Verde Rápido (López-Curto *et al.*, 1998). Las laminillas obtenidas fueron observadas al microscopio (microscopio óptico, Axiostar plus; Carl Zeiss, Alemania) y fotografiadas en el Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Microscopia electrónica de barrido

Las semillas fueron montadas en cilindros de aluminio con cinta adhesiva de carbón de doble cara para después ser cubiertas con oro por medio de una máquina para farfullar “sputter coater” (Desk II; Denton Vacuum Inc., Norristown, NJ, USA). Finalmente las preparaciones fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido (MEB) (JSM-5310LV; Electron Optics Div., Medford, MA, USA).

La actividad del sistema antioxidante incrementa considerablemente en las semillas de *Dodonaea viscosa* que fueron enterradas con un tratamiento de pre-escarificación

En las plantas, como en otros organismos, las especies reactivas de oxígeno son muy importantes en la regulación de muchos aspectos de su ciclo de vida, así como en la modulación de los mecanismos de respuesta al ambiente (Bailey-Serres *et al.*, 2006). Los cambios en el sistema antioxidante de semillas sometidas a *Priming* Natural nos pueden dar un indicio sobre la respuesta de las semillas al enterramiento, así como de las posibles modificaciones a nivel bioquímico durante la germinación.

La catalasa es una enzima muy eficiente para la remoción de grandes cantidades de H_2O_2 . Sin embargo, debido a su poca afinidad por este sustrato, la catalasa no es la enzima más adecuada para la regulación de los balances redox en un nivel más fino, por ejemplo en casos donde la concentración de H_2O_2 es baja (Feirabend, 2005). Sin embargo, se considera que la catalasa es responsable de la eliminación del exceso de ROS durante periodos de estrés (Mittler, 2002).

En el caso de las semillas de *Dodonaea* observamos un patrón de actividad de la catalasa similar entre los tratamientos de las 0 a las 24 h de imbibición: A las 0 h se observó una actividad inicial en la que si bien las semillas del BE y CE presentaron los mayores niveles de actividad, no hay diferencias estadísticas entre los tratamientos. A las 12 h de imbibición la actividad disminuyó y tampoco presentó diferencias. La actividad incrementó de nuevo a las 24 h (Figura 13). En este tiempo, las semillas de los tratamientos del BE y CE tuvieron un patrón de actividad diferente al de las semillas del BNE, CNE y del Control. Para las 48 h de imbibición el patrón fue totalmente distinto para cada grupo de tratamientos; mientras que de acuerdo al análisis de comparaciones múltiples (LSD) las semillas del BE y CE presentaron un aumento significativo en la actividad, las semillas de los tratamientos BNE, CNE y el Control mantuvieron prácticamente los mismos niveles que a las 24 h de imbibidas (Figura 13). La falta de diferencias en los primeros tiempos se puede relacionar con la primera fase de la

germinación o sea con el periodo de imbibición en donde teóricamente no hay actividad metabólica presente.

Los resultados encontrados en la actividad de CAT en las semillas del BE y del CE, concuerdan con los descritos por Bailly *et al.* (2000) en semillas de girasol (*Helianthus annuus*) sometidas a osmopriming. En dicho trabajo se observó que la tasa de germinación obtenida con el Priming está relacionada con un aumento en la actividad de la catalasa y con una disminución en los niveles de Malondialdehído (MDA) el cual es un indicador de lipoperoxidación.

Armenta-Jaime (2007) observó que en las semillas de *Dodonaea*, el principal componente de reserva son los lípidos, por lo que su movilización es muy importante durante la germinación. Se sabe que en las semillas con altos contenidos de lípidos, la catalasa se ocupa de remover el H₂O₂ producido por la enzima glicolato oxidasa durante la β -oxidación de los ácidos grasos (Bewley & Black, 1994; Mittler *et al.*, 2004).

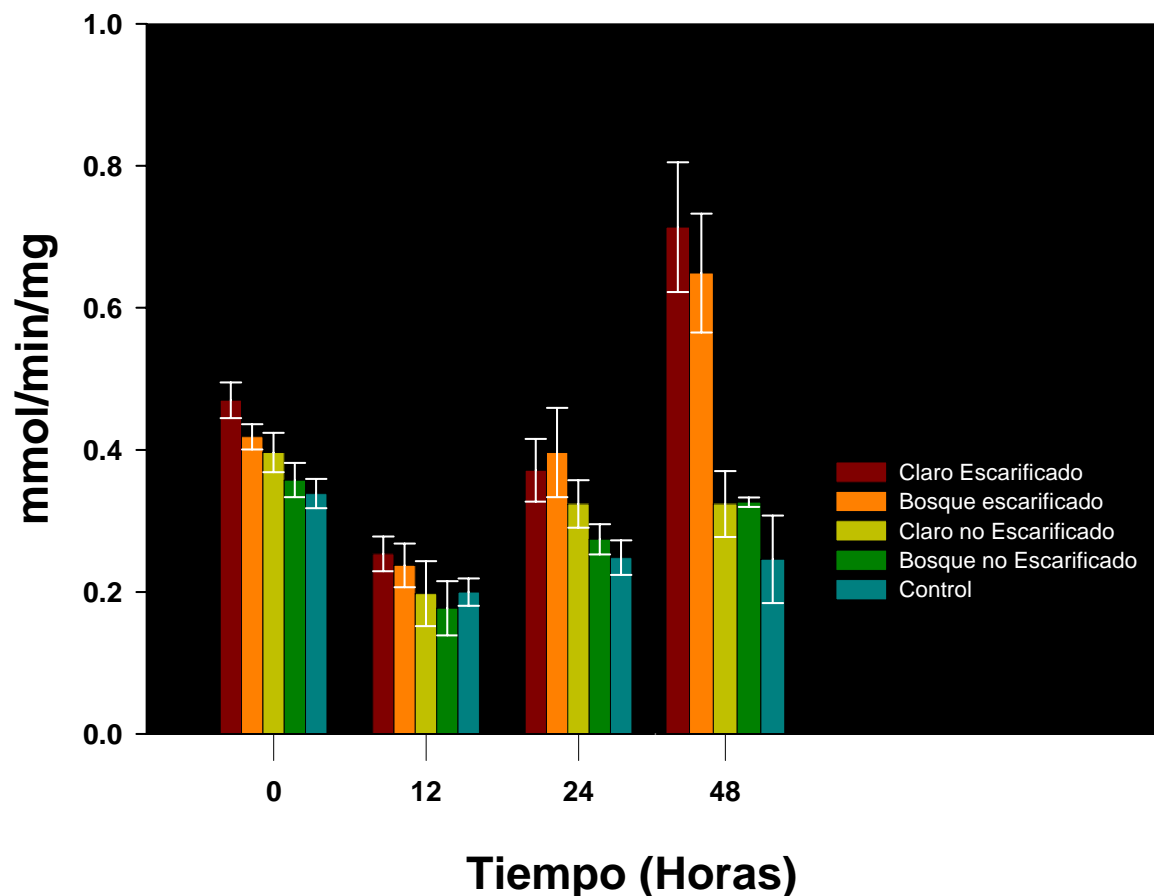


Figura 12.- Actividad de la Catalasa para cada uno de los tratamientos a las 0, 12, 24 y 48h de imbibición. Se llevaron a cabo 3 ensayos independientes de 3 repeticiones por ensayo, se cargaron 100 μ g de proteína para cada ensayo. Las barras de error denotan el error estándar para cada tratamiento. Los tratamientos CE y BE presentan la mayor actividad en todos los tiempos seguido de BNE, CNE y el Control

Al analizar los niveles de H_2O_2 , se observó que a las 0 horas no hay diferencia entre los tratamientos. Después de este tiempo, todas las semillas de los tratamientos a excepción de las del Control mantuvieron los niveles de peróxido más o menos constantes hasta las 48 horas de imbibición (Figura 14). Sin embargo, el análisis de comparaciones múltiples (LSD) mostró que a partir de las 12 horas las semillas del Control incrementan sus niveles de H_2O_2 de manera significativa. Dicho aumento se mantuvo constante hasta las 48 horas de imbibición. Estos resultados se pueden relacionar con los observados para la catalasa, dando lugar a tres patrones característicos. El primero de ellos se da en las

semillas de los tratamientos BE y CE, donde la actividad de catalasa es alta y los niveles de H_2O_2 son bajos. El segundo patrón se presenta en las semillas del Control donde la actividad de catalasa es baja y las concentraciones de H_2O_2 son aproximadamente 50% más altas que en los otros tratamientos. En las semillas del BNE y CNE se observa un tercer patrón donde la actividad de catalasa no es inversa a los niveles de H_2O_2 . En estas semillas, la actividad de catalasa es similar a la de las semillas del Control. Sin embargo, las concentraciones de H_2O_2 son parecidas a las encontradas en BE y CE.

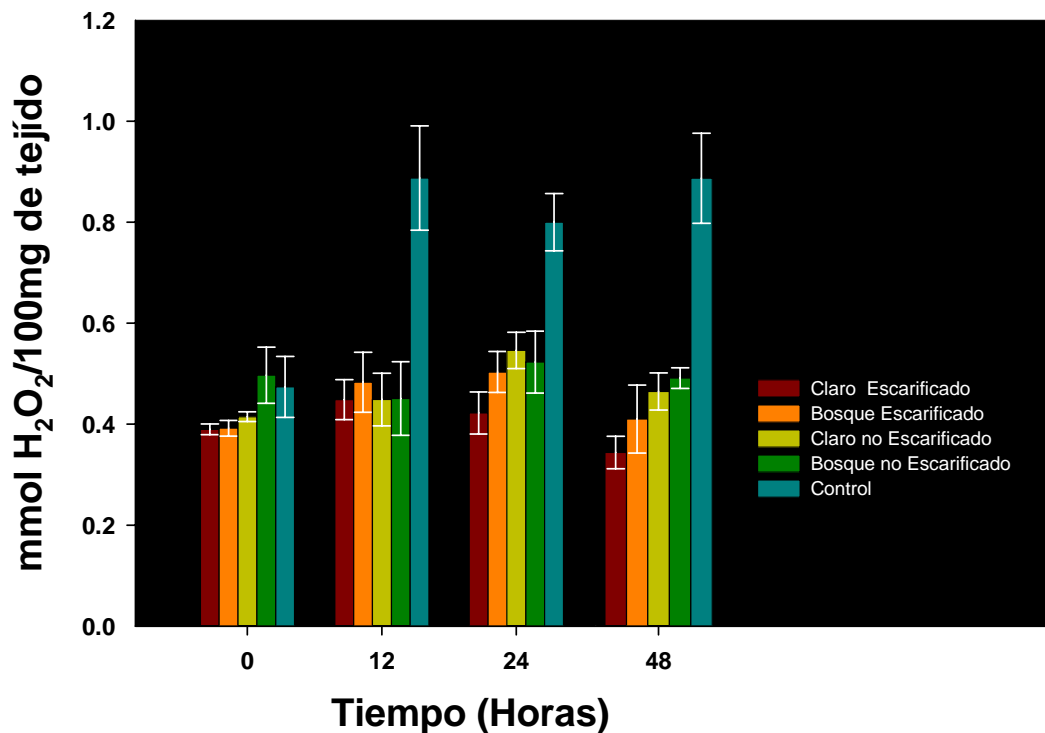


Figura 13.- Niveles de Peróxido de Hidrógeno en 100mg de tejido para cada uno de los tratamientos a las 0, 12, 24 y 48h de imbibición. Se realizaron 3 ensayos independientes con 3 repeticiones cada uno. Las barras de error denotan el error estándar para cada tratamiento. A diferencia con la gráfica anterior, los tratamientos CE y BE presentan la menor concentración de H_2O_2 mientras que BNE y CNE presentan una mayor concentración y el control es el tratamiento que tiene la mayor concentración de todas.

Se sabe que el H_2O_2 se puede generar también fuera de los peroxisomas y glioxisomas como producto de la NADPH oxidasa, las mitocondrias y los cloroplastos (Apel & Hirt, 2004). Como ya se mencionó anteriormente, este radical se origina a partir del ion superóxido (O_2^-) en conjunto con la enzima superóxido dismutasa (SOD) la cual se encarga de dismutar al O_2^- para convertirlo en H_2O_2 (Alscher *et al.*, 2002).

El O_2^- se produce en las regiones de la célula donde se llevan a cabo las cadenas de transporte de electrones; por lo tanto, se puede encontrar a la SOD en estas zonas, por ejemplo en la mitocondria, el cloroplasto, el citosol, el apoplasto, los peroxisomas, los glioxisomas y los microsomas (Alscher *et al.*, 2002). Al analizar la actividad de SOD en *Dodonaea* se utilizó un extracto de proteína que incluye solamente a la SOD presente en el citoplasma.

Los resultados mostraron que la actividad de SOD es considerablemente mas baja en comparación con la obtenida para la catalasa (Figura 14). A las 0 horas se registró una actividad inicial la cual disminuyó en todos los tratamientos a las 12 horas de imbibición, y a las 24 horas se registró un aumento. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos. Al igual que la actividad de la CAT, la SOD a las 48 horas de imbibición en los tratamientos pertenecientes a BNE, CNE y el Control mantienen su actividad en el mismo rango, mientras que las semillas del BE y CE aumentan su actividad (Figura 14). El análisis de comparaciones múltiples (LSD) mostró que la actividad de SOD de las semillas del CE a las 48 h de imbibición fue diferente a la de los otros tratamientos con excepción de las semillas del BE (Figura 15).

Con respecto a las concentraciones de O_2^- encontramos que los niveles de este radical fueron realmente bajos (Figura 15). En el tiempo inicial, a las 0 horas, es cuando la concentración de O_2^- fue mayor. A partir de las 12 horas los niveles de O_2^- disminuyeron y se mantuvieron constantes hasta las 48 horas (Figura 16). Estos niveles bajos pueden deberse a que el radical superóxido es más reactivo que el H_2O_2 y tiene una vida media muy corta. Por otro lado, la técnica utilizada para determinar las concentraciones de O_2^- involucra la presencia de la SOD en el mismo tubo de reacción (Ver metodología). Vreeburg & Fry (2005) mencionan que cuando se busca determinar los niveles de O_2^- en medios con una actividad endógena de SOD (como en este caso), muy probablemente el O_2^- sea dismutado rápidamente a H_2O_2 .

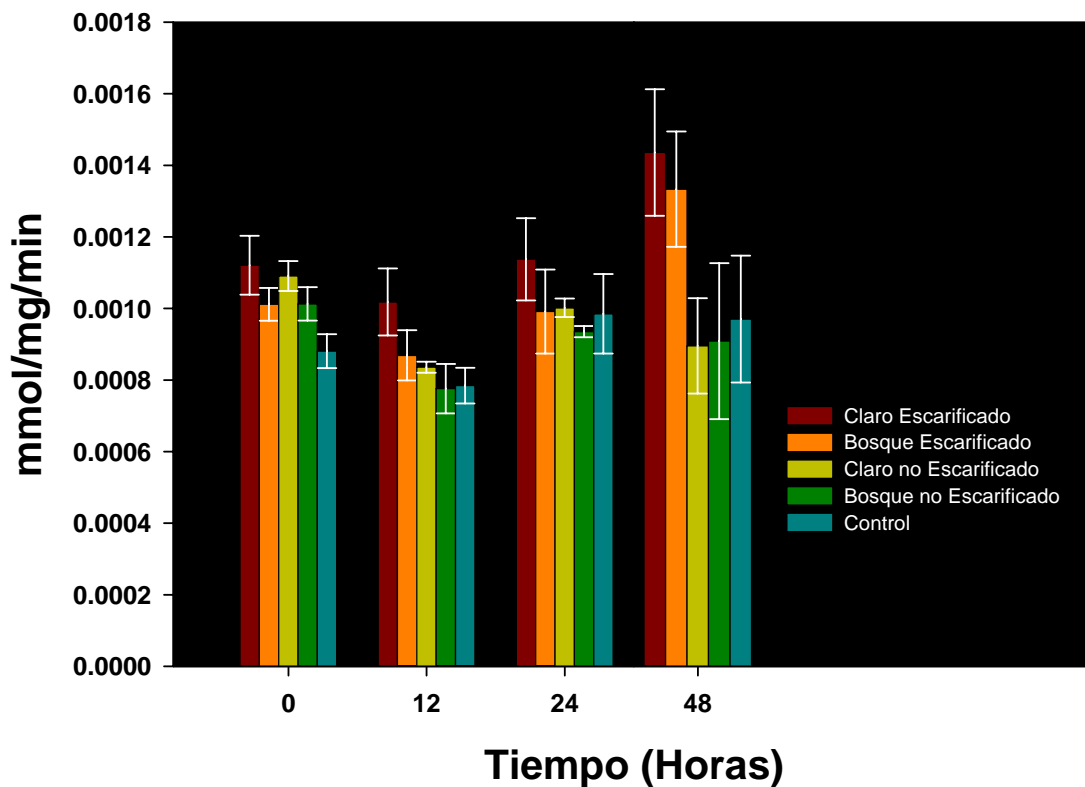


Figura 14.- Actividad de la Superóxido Dismutasa, para cada uno de los tratamientos a las 0, 12, 24 y 48h de imbibición. Se llevaron a cabo 3 ensayos independientes de 3 repeticiones por ensayo, se cargaron 50 μ g de proteína para cada ensayo. Las barras de error denotan el error estándar para cada tratamiento.

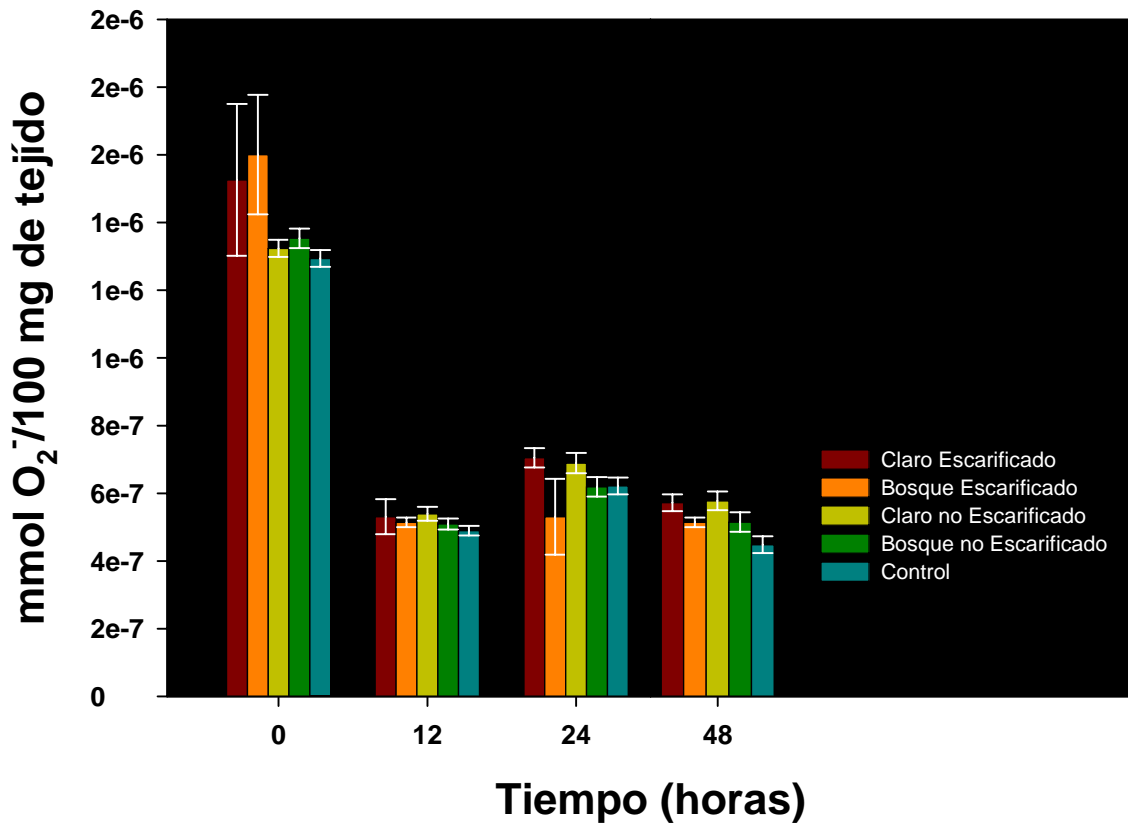


Figura 15.- Niveles de Ion Superóxido en 100 mg de tejido para cada uno de los tratamientos a las 0, 12, 24 y 48h de imbibición. Se realizaron 3 ensayos independientes con 3 repeticiones cada uno. Las barras de error denotan el error estándar para cada tratamiento.

En este caso no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, por otro lado se detecta un decremento en las concentraciones a las 12hrs de imbibición. Los niveles tan bajos de este ion se pudieron haber obtenido ya que el O₂⁻ es una molécula muy reactiva y con una vida media muy corta.

Además de determinar las actividades de la catalasa, la superóxido dismutasa y los niveles de peróxido de hidrógeno y del radical superóxido, también se midió la actividad de ascorbato peroxidasa (APX) y de la glutathion reductasa (GR). Estas dos enzimas están involucradas en el ciclo del Ascorbato-Glutathion (Apel & Hirt, 2004; Tomasi *et al.*, 2001). Los elementos que integran a este ciclo, se encuentran como en el caso de la SOD en cloroplastos, mitocondrias, citosol, peroxisomas y en el apoplasto (Mittler *et al.*, 2004). El hecho de que los elementos de este ciclo se encuentren en tantos compartimentos celulares y que la APX tenga una alta afinidad por el H₂O₂ sugiere que este ciclo juega un papel muy importante en controlar los niveles de ROS en estos

compartimentos, sobretodo en aquellos donde no se encuentra otro antioxidante enzimático muy importante, como la catalasa (Mittler, 2002). Sin embargo, para el caso de *Dodonaea* no se detectó actividad alguna tanto de APX como de GR (datos no mostrados). Lo que sugiere que probablemente el ciclo del ascorbato-glutation no está involucrado en las primeras fases de la germinación.

Los niveles de ROS (principalmente de H₂O₂) reflejan el balance que existe entre su producción y su degradación (Wojtyla *et al.*, 2006). Por lo tanto, estos niveles nos pueden dar una idea sobre la eficacia con la que cada lote de semillas de *Dodonaea* esta conteniendo con el estrés oxidativo. Según los resultados obtenidos, las semillas enterradas con un pre-tratamiento de escarificación (BE y CE) están tolerando de manera más eficiente el estrés oxidativo causado por la germinación. Le siguen las semillas que fueron sometidas al enterramiento (BNE y CNE) y por último el Control.

Además de los mecanismos aquí estudiados, existen otras moléculas que pueden actuar en la dinámica del estrés oxidativo en las plantas. La respuesta encontrada en las semillas de los tratamientos BNE y CNE sugiere que otros antioxidantes podrían tener algún efecto en las semillas. Varios compuestos como los polifenoles y flavonoides (Aalen, 1999), las tioredoxinas (Buchanan & Balmer, 2005) o las peroxidasas (Mittler, 2002) poseen también una función antioxidante.

Bailly (2000) menciona que en semillas de girasol (*Helianthus annuus*) tanto la GR como la SOD están presentes en las semillas, sin embargo estas parecen no tener un papel relevante en la germinación.

Con respecto a *Dodonaea*, el hecho de que la catalasa fuera la enzima con mayor actividad enzimática; que la actividad de SOD fuera relativamente baja y que la actividad de GR y APX fuera nula, sugiere que uno de los eventos que se está modificando mas notablemente durante el *Priming* Natural está en los glyoxisomas, donde se encuentra principalmente la catalasa y donde se lleva a cabo la movilización de reservas. Armenta-

Jaime (2007), observó que en semillas de *Dodonaea* sometidas a *Priming* Natural, así como en las semillas del Control, la movilización de lípidos comienza alrededor de las 12 horas de imbibición, y que esta movilización es más veloz en las semillas que fueron enterradas. Estos resultados concuerdan con el hecho de que los niveles de H_2O_2 en las semillas del Control aumentan considerablemente a partir de las 12 horas de imbibición. Por otro lado, cabe mencionar que los cambios más importantes en cuanto al sistema antioxidante se registraron a las 48 horas de imbibición. Este momento concuerda con la fase III de la germinación la cual se caracteriza por presentar una movilización masiva de reservas (Bewley & Black, 1994). En resumen las concentraciones de H_2O_2 encontradas en las semillas del Control de las 12 a las 48 horas podrían estar relacionadas con la movilización de lípidos más que con otro proceso metabólico. Las semillas sometidas al enterramiento, pudieran ser capaces de tolerar el estrés oxidativo generado por esta movilización de manera más eficiente. Sin embargo para poder confirmar esta hipótesis, se tendrían que realizar ensayos para determinar lipoperoxidación, así como ensayos que nos permitan localizar a nivel celular al H_2O_2 .

Además de lo mencionado, los ROS pueden estar involucrados en otros procesos de la germinación que también se pueden explorar. Por ejemplo: en monocotiledóneas, el H_2O_2 promueve la germinación en *Zinnia elegans* al oxidar inhibidores de la germinación posiblemente ubicados en el pericarpo (Ogawa & Iwabuchi, 2001). Además de esto, los ROS pueden inducir la expresión de genes y pueden estar involucrados en las modificaciones de la pared celular necesarias para la elongación de la radícula (Bailly 2004). También pueden jugar un papel protector del embrión hacia patógenos durante la germinación (Shopfer *et al.*, 2001).

Con respecto a nuestros resultados, si los ROS estuvieran participando principalmente en la elongación de la radícula de las semillas de *Dodonaea*, encontraríamos que los niveles de ROS serían mayores en BE y CE dado que estos mostraron las mayores tasas de germinación. Por otra parte, no tenemos suficiente evidencia de que las semillas enterradas hubieran sido invadidas por patógenos, sin embargo en caso de que esto

hubiese ocurrido, encontraríamos una mayor concentración de ROS en las semillas que potencialmente pudieran haber estado en contacto con patógenos (BE, CE, BNE y CNE).

El *Priming* Natural involucra cambios a nivel fisiológico, morfológico y metabólico

Como se pudo observar en este trabajo, durante el *Priming* Natural, las semillas sufren modificaciones morfológicas en cuanto al debilitamiento de la cubierta seminal el cual favorece que las semillas sean más susceptibles a los periodos de hidratación y deshidratación propios del enterramiento. Estos eventos de hidratación-deshidratación generan cambios a nivel metabólico los cuales podrían estar relacionados con la movilización de reservas y con la tolerancia al estrés oxidativo. Este adelanto metabólico prepara a la semilla para una germinación rápida aumentando las probabilidades de establecimiento y de sobrevivencia.

Conclusiones

- La escarificación previa al enterramiento fue el principal factor que provocó que las semillas BE y CE logaran un *Priming* Natural y que los tratamientos BNE y CNE no respondieran completamente al enterramiento.
- El desgaste de la cubierta seminal está directamente relacionado con la permeabilidad de la cubierta y con la pérdida de la latencia.
- Los cambios a nivel bioquímico que se dan con el enterramiento son graduales, por lo que las semillas que no permanecen en el suelo el tiempo suficiente pueden sufrir modificaciones parciales, lo cual no se traduce necesariamente en un aumento en las tasas de germinación
- El enterramiento provocó una respuesta a nivel bioquímico en las semillas de BNE y CNE la cual no es suficiente para influir en los patrones de germinación.
- El aumento en la actividad de la catalasa está relacionado con el aumento en la tasa de germinación de las semillas de *Dodonaea viscosa* sometidas al *Priming* Natural
- El ciclo del Ascorbato Glutación en esta especie parece que no es relevante durante las primeras etapas de la germinación

ANEXOS

Tabla 1.- ANOVA de dos vías para los datos de germinación en semillas de *Dodonaea viscosa*

| Fuente | Suma de cuadrados | gl | Cuadrado medio | Valor de F | P |
|------------------------------|-------------------|----|----------------|------------|--------------|
| Enterramiento | 0.005 | 2 | 0.002 | 0.254 | 0.78 |
| Escarificación | 0.188 | 1 | 0.188 | 19.27 | 0.001 |
| Enterramiento*Escarificación | 0.179 | 2 | 0.09 | 9.213 | 0.004 |
| Error | 0.117 | 12 | 0.01 | | |

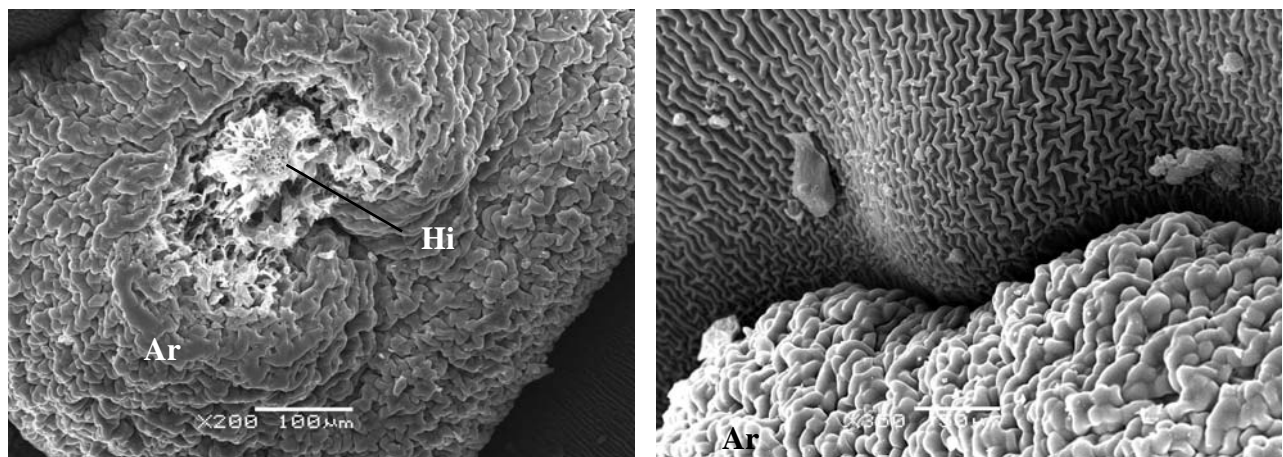


Figura 1.- Microfotografías del MEB de la región Hilo-micropilar. (A) Arilo e Hilo, (B) Arilo.
Ar; Arilo, Hi;Hilo.

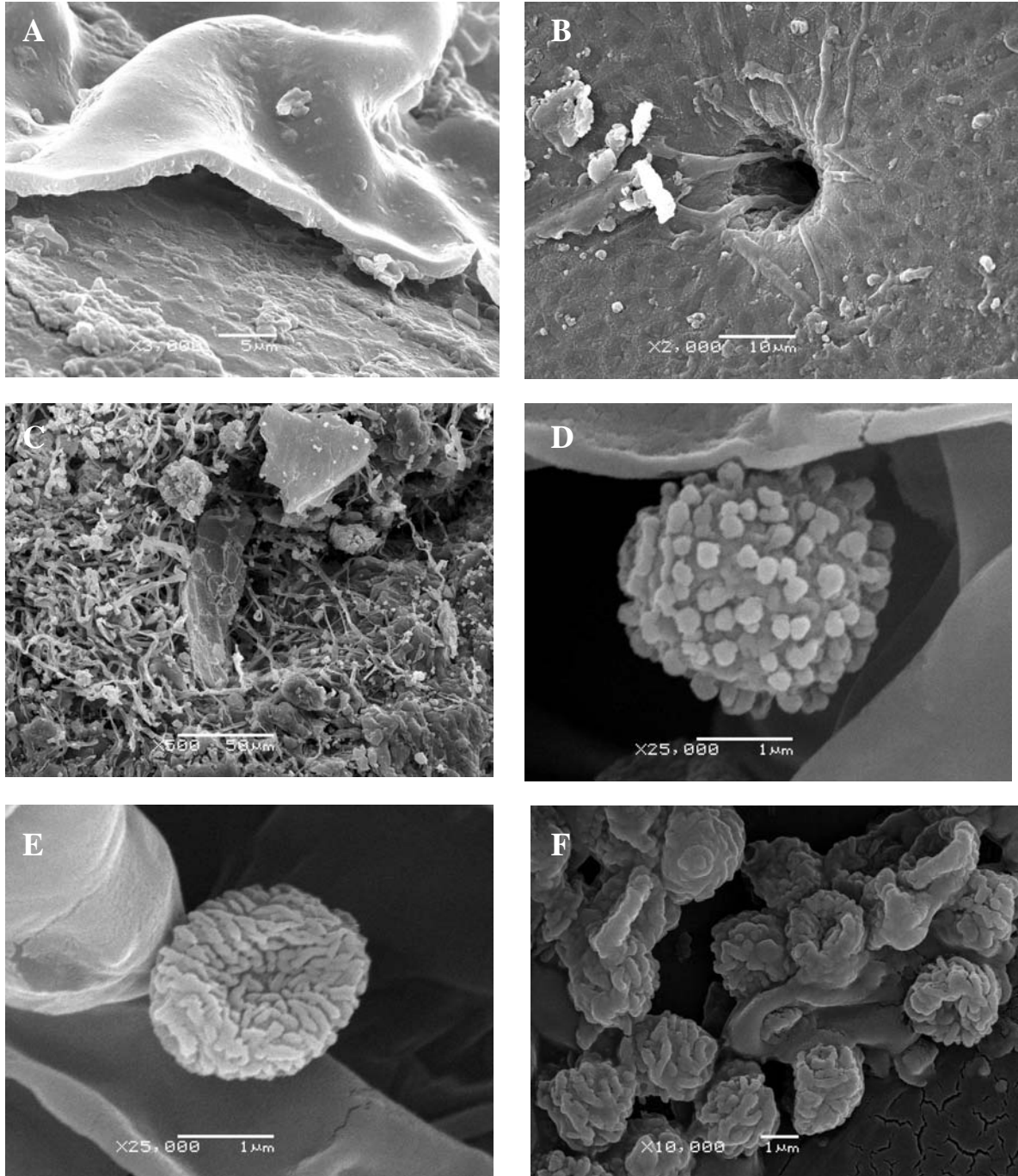


Figura 2.- Microfotografías observadas al MEB. (A) Cutícula en desprendimiento. (B-F) Hifas y esporas observadas en aquellos tratamientos donde las semillas fueron sometidas al enterramiento. B (Bosque Escarificado (BE)), C,D (Claro Escarificado (CE)), E (Bosque no Escarificado (BNE)), F (Claro no Escarificado (CNE)).

Bibliografía

- **Aalen, R.B.**, 1999, Peroxiredoxin antioxidants in seed physiology. *Seed Science Research*, 9:285-295
- **Allen, P.S., Meyer, S.E., Khan, M.A.**, 2000, Hydrothermal Time as a Tool in Comparative Germination Studies. En: *Seed Biology: Advances and Applications*, 2000, New York, CAB Int. pp 508.
- **Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S.**, 2002, Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *Journal of Experimental Botany*, 53: 1331-1341.
- **Alvarado, V., Bradford, K.J.**, 2002, A hydrothermal time model explains the cardinal temperatures for seed germination, *Plant Cell and Environment*, 25:1061-1069.
- **Apel, K., Heribert, H.**, 2004 Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative stress and Signal transduction, *Annual Review of Plant Biology*., 55:373-99
- **Armenta-Jaime, S.**, 2007, Efecto del Priming natural en la movilización de carbohidratos en la germinación de semillas de *Dodonaea viscosa*: papel de las invertasas ácidas, Tesis de Licenciatura, UNAM, pp 64.
- **Bailey-Serres, J., Mittler, R.**, 2006, The roles of reactive oxygen species in plant cells, *Plant Physiology*, 141:311.
- **Bailly, C.**, 2004, Active Oxygen species and antioxidants in seed biology, *Seed Science Research*, 14:93-107.
- **Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., Come, D.**, 2000, Antioxidant systems in sunflower (*Heliantus annuus* L.) seeds as affected by priming, *Seed Science Research*, 10:35-42.
- **Bardgett, R., Yeates, G., Anderson, J.**, 2005, Patterns and determinants of soil biological diversity en: *Biological Diversity and Function in Soils*, 2005, Cambridge, Cambridge University Press, pp 100-118.
- **Baskin, C. & Baskin, J.**, 1998, *Seeds, Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. San Diego, Academic Press, pp 665.
- **Baskin, J. & Baskin, C.**, 2000, Evolutionary considerations of claims of physical dormancy-break by microbial action and abrasion by soil particles, *Seed Science Research*, 10:409-413.
- **Baskin, C. & Baskin, J.**, 2004, A Classification System for Seed Dormancy, *Seed Science Research* 14:1-16.
- **Baskin, J., Davis, B., Baskin, C., Gleason, S., Cordell, S.**, 2004, Physical dormancy in seeds of *Dodonaea viscosa* (*Sapindales*, *Sapindaceae*) from Hawaii, *Seed Science Research* 14: 81-90.
- **Benitez, R.J.L.**, 2005, Estudio Ecofisiológico de Germinación y Crecimiento de *Dodonaea viscosa* (L.)Jacq. Con fines de Restauración en Zonas Perturbadas del Valle de México, Tesis de Maestría, UNAM, pp 60.
- **Bewley, D.J.**, 1997, Seed Germination and Dormancy, *The Plant Cell*, 9: 1055-1056.
- **Bewley, D.J., Black, M.**, (1994) *Seeds. Physiology of development and germination*, (2da ed.). New York, Plenum Press, en: **Bailly, C.**, 2004, Active Oxygen species and antioxidants in seed biology, *Seed Science Research* 14:93-107.
- **Boesewinkel D.F., Bouman, F.**, 1995, *The Seed: Structure and Function*. En: *Seed Development and Germination*, 1995, Marcel Dekker, Inc., pp 1-24.
- **Bradford, K.J.**, 1990, A water relations analysis of seed germination rates, *Plant Physiology*, 94: 840- 849.

- **Buchanan, B., Balmer, Y.**, 2005, Redox regulation: A broadening horizon, Annual Review of Plant Biology, 56:187-220
- **Burrows, C.J.**, 1995, Germination behavior of the seeds of six New Zealand woody plant species, New Zealand Journal of Botany, 33:365-377.
- **Camacho, M., Bustillo, O.O. y Gonzales, K.V.** 1991. Potencial del Chapulixtle (*Dodonea viscosa*) para la formación de setos en áreas sin riego. En: Memoria de la Segunda Reunión Nacional sobre Ecología y Reforestación Urbana. Academia Nacional de Ciencias Forestales. 20pp.
- **Cheng, Z., Bradford, K.J.**, 1999, Hydrothermal time analysis of tomato seed germination responses to priming treatments, Journal of Experimental Botany, 50: 89-99.
- **Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, E., Van Breusegem, F.**, 2000, Dual action of the reactive oxygen species during plant stress responses, Cellular and Molecular Life Science., 57: 779-795
- **Debeaujun, I., Léon-Kloosterziel, K.M., Koornnef, M.** 2000, Influence of the testa on seed Dormancy, Germination and Longevity in Arabidopsis, Plant Physiology, 122: 403-413.
- **Fath, A., Bethke, C.P., Jones, R.L.**, 2001, Enzymes That Scavenge Reactive Oxygen Species Are Down-Regulated Prior To Gibberellic Acid-Induced Program Cell Death In Barley Aleurone, Plant Physiology, 126: 156-166
- **Feirabend, J.**, 2005, Catalase in plants: molecular and functional properties and role in stress defense, En: Antioxidants and reactive oxygen species in plants, Blackwell publishing, Oxford, pp302.
- **Fenner, M.**, 1985. Seed Ecology. London: Chapman and Hall. 151 pp.
- **Finch-Savage y Leubner-Metzger**, 2006, Seed dormancy and the control of germination, New Phytologist 171: 501-523.
- **Gallardo, K., Job, C., Groot, P.C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., Job, D.**, 2001, Proteomic Analysis of Arabidopsis Seed Germination and Priming, Plant Physiology, 126: 835-848.
- **Gamboa-de Buen, A., Cruz-Ortega, R., Martínez-Barajas, E., Sanchez-Coronado, M.E., Orozco-Segovia, A.**, 2006, Natural priming as an important metabolic event in the life history of *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae) seeds, Physiologia Plantarum 128: 520-530.
- **González-Hidalgo, B.**, 1998. Reporte técnico de la vegetación del Parque Ecológico Ecoguardas, Ajusco Medio. CORENA, D.F. México.
- **González-Zertuche, L., Orozco-Segovia, A., Vázquez-Yanes, C.**, 2000, El ambiente de la semilla en el suelo: su efecto en la germinación y en la sobrevivencia de la plántula, Boletín de la Sociedad Botánica de México, 65:73-81.
- **González-Zertuche, L., Vázquez-Yanes, C. (in memoriam), Gamboa, A., Sánchez-Coronado, M.E., Aguilera P., Orozco-Segovia, A.**, 2001, Natural priming of *Wigandia urens* seeds during burial: effects on germination, growth and protein expression, Seed Science Research 11:27-34.
- **Graham, L.E., Graham, J.M., Wilcox, L.W.**, 2006, Plant Biology, 2nd ed., Pearson -Prentice Hall, New Jersey, pp 670.
- **Grant, J.J. & Loake, G.J.**, 2000, Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance, Plant Physiology, 124: 21-29.
- **Hernández, V.**, 2006, Reservas en semillas y su papel en las primeras etapas de desarrollo de especies leñosas de selva baja caducifolia, Tesis de Maestría, UNAM pp 112.

- **Henzler, T., Steudle, E.,** 2000, Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels, Journal of Experimental Botany., 51:2053-2066.
- **Heydecker, W.** 1978, "Primed" seeds for better crop establishment? Span 21:12-14.
- **Job, D., Capron, I., Job C., Dacher, F., Corbineau, F., Come D.,** 2000, Identification of Germination-specific Protein Markers and their Use in Seed Priming Technology, en: Seed Biology: Advances and Applications, 2000, CAB Int. pp 508.
- **Laloi, C., Stachowiak, M., Pers-Kamczyk, E., Warzych, E., Murgia, I., Apel, K.,** 2006, Cross-talk between singlet oxygen-and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*, Proceedings of the National Academy of Sciences 104: 672-677.
- **Lambers, H., Chapin, III S.F., Pons, T.L.,**1998, Plant Physiological Ecology, Springer, New York, pp 540.
- **Lopez-Curto, M.L., Márquez-Guzmán, J., Mungia-Sanchez, G.,** 1998, Técnicas para el estudio del desarrollo de Angiospermas. Coordinación de Servicios Editoriales de la Facultad de Ciencias de la UNAM, México, 116pp
- **Manz, B., Muller, K., Kucera, B., Volke, F., Metzger-Leubner, G.,** 2005, Water Uptake and Distribution in Germinating Tobacco Seeds Investigated *in Vivo* by Nuclear Magnetic Resonance Imaging, Plant Physiology 138: 1538-1551.
- **Marroquin, J.S.** 1985. Sapindaceae. En: Rzendowski, J. y Rzendowski, G.C. (Ed.).Flora Fanerogámica del Valle de México. Vol I. Continental. México. pp.44-46.
- **Mittler, R.,**2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, Trends in Plant Science7:405-410.
- **Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, M.,** 2004, Reactive oxygen gene network in plants, Trends in Plant Science, 9: 490-498.
- **Muller, K., Tintelnot, S., Leubner-Metzger, G.,** 2006, Endosperm-limited Brassicaceae Seed Germination: Abscisic Acid Inhibits Embryo-induced Endosperm Weakening of *Lepidium sativum* (crees) and Endosperm Rupture of Crees and *Arabidopsis thaliana* , Plant Cell Physiology, 47: 864-877
- **Nikolaeva, M.G.,** 2004, On criteria to use in studies of seed evolution, Seed Science Research 14: 315-320.
- **Ogawa, K., Iwabuchi, M.,** 2001, A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide, Plant Cell Physiology, 43:286-291.
- **Perez, G., Orozco, A., Martorell, C.,** 2006, Efectividad de algunos tratamientos pre-germinativos para ocho especies leñosas de la mixteca alta oaxaqueña con características relevantes para la restauración, Boletín de la Sociedad Botánica de México., 79: 9-20.
- **Phartyal, S., Baskin, J., Baskin, C., Thapliyal, R.,** 2005, Physical dormancy in seeds of *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae) from India, Seed Science Research, 15:59-61.
- **Plata-Álvarez, M.A.** 2002. Estudio ecofisiológico de la germinación en dos especies arbustivas del Pedregal de San Ángel *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. (Sapindaceae) y *Senna multiglandulosa* (Jacq.) Irwin & Barnaby (Caesalpinaceae). Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM. 71 pp.

- **Raven, H.P., Evert, R.F., Eichhorn, S.E.**, 1999, *Biology of Plants*, 6th ed., Freeman and Company, New York, pp 944.
- **Schadt, C.W., Martin, A.P., Lipson, D.A., Schmidt, S.K.**, 2003, Seasonal dynamics of previously unknown fungal lineages in tundra soils, *Science*, 301:1359-1361.
- **Rzendowsky, J.**, 1954. Vegetación del Pedregal de San Ángel. *Ann. Esc. Nal. De Cien. Biol. Mex.*, 8: 59-139.
- **Srivastava, M.L.**, 2002, *Plant Growth and Development Hormones and Environment*, Academic Press, San Diego, pp 772.
- **Staniek, K., Nohl, H.**, 2000, Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species?, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1460:268-275.
- **Soeda Y., C.J.M Konings, Vorst O., Houweligen, M.M.L., Stoopen, G.M., Maliepaard C.A., Kodde J., Bino R.J., Groot P.C., Geest A.H.M.**, 2005, Gene Expression Programs during *Brassica oleracea* Seed Maturation, Osmopriming, and Germination Are Indicators of Progression of the Germination Process and the Stress Tolerance Level, *Plant Physiology*, 137: 354-368.
- **Tommasi F., Paciolla C., de-Pinto M., de-Gara L.**, 2001, A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds, *Journal of Experimental Botany*, 52: 1647-1654.
- **Vander Wall, S., Forget, P., Lambert, J., Hulme, P.**, 2005, Seed Fate Pathways: Filling the Gap between Parent and Offspring. En: *Seed Fate Predation, Dispersal and Seedling Establishment*, 2005, Oxford, CABI Publishing, pp 409.
- **Vázquez-Yañes, C., Orozco-Segovia, A.**, 1993. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24:69-87.
- **Vleeshouwers, L.M., Boumeester, H.J.**, 2001, A simulation model for seasonal changes in dormancy and germination of weed seeds, *Seed Science Research*, 11:77-92.
- **Vreeburg, R., Fry, S.**, 2005, Reactive oxygen species in cell walls. En: *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*, Oxford, CABI Publishing, pp215-249.
- **Wojtyla, L., Garnczarska, M., Zalewski, T., Bednarski, W., Ratajczak, L., Jurga, S.**, 2006, A comparative study of water distribution, free radical production, and antioxidative metabolism in germinating pea seeds, *Journal of Plant Physiology*, 163:1207-1220.