



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

MOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA EN  
RESPUESTA AL OSMOCONDICIONAMIENTO NATURAL  
EN LAS SEMILLAS DE PLANTAS DE LA RESERVA DEL  
PEDREGAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

SANDRA ALVARADO LÓPEZ



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

<b>Formato</b>
<p>1. Datos de alumno  Alvarado  López  Sandra  36100614  Universidad Nacional Autónoma de México  Facultad de Ciencias  Biología  096155156</p>
<p>2. Datos del Tutor  Dra  Alicia  Gamboa  De Buen</p>
<p>3. Datos del sinodal 1  Dra  Margarita  Collazo  Ortega</p>
<p>4. Datos del sinodal 2  Dra  Alma Delfina Lucía  Orozco  Segovia</p>
<p>5. Datos del sinodal 3  Dra  Sonia  Vázquez  Santana</p>
<p>6. Datos del sinodal 4  Biól  Diana  Soriano  Fernández</p>
<p>Datos del trabajo escrito  Movilización de las proteínas de reserva en respuesta al osmocondicionamiento natural en las semillas de plantas de la Reserva del Pedregal  67 p  2009</p>

## Agradecimientos.

Esta tesis representa el fin de un ciclo muy largo de mi vida, pero que me sirvió para saber que soy capaz de hacer muchas cosas a pesar de todo lo que implique. Empezare por agradecerle a la persona que me enseñó que lo importante en esta vida no es solo tener metas u objetivos sino tener el coraje de poder llevarlas a cabo y concluir lo que iniciamos no importando los obstáculos que se atravesasen. Le agradezco a mi mamá María Luisa López Orozco el inmenso apoyo que he recibido de su parte desde el inicio de mi vida hasta hoy, ya que sin su gran apoyo seguramente no hubiera terminado la carrera: "Mamá te agradezco el que siempre has estado en los peores momentos y ser mi apoyo en todo momento, por soportar mis errores y ayudarme a salir de ellos". Aunque siempre has estado apoyándome, te estoy inmensamente agradecida por estos últimos años por haberte hecho cargo de mi enana durante los días de clases, en los días que me ausentaba por ir a prácticas de campo y en los que tenía que trabajar y de esta forma permitirme seguir en la escuela y poder concluirla, por lo que esta tesis es totalmente debido a tu apoyo brindado en esos momentos en los que no contaba más que contigo.

A la Dra. Alicia Gamboa de Buen no solo por ser mi Tutora de tesis sino por permitirme estar en su equipo de trabajo y por darme la asesoría adecuada, a su apoyo en todo los aspectos, así como gran comprensión ante todos mis asuntos personales. "Muchísimas gracias por ser una persona tan comprensiva y amable"

A la Dra. Alma Orozco Segovia por permitirme participar en un proyecto tan interesante y aplicable en la restauración ecológica, por sus oportunos y valiosos comentarios durante la realización de la tesis y la revisión de la misma. También quiero agradecerle su comprensión cuando al inicio de mi participación en el laboratorio de Ecología Funcional tuve

un problema de salud y me permitió seguir a pesar de que estuve ausente casi 4 meses.

A la Dra. Sonia Vázquez Santana por su asesoría y sus enseñanzas en la realización de los cortes e histoquímica de las semillas que utilice en la tesis y por sus correcciones hechas a ésta.

A mis sinodales, la Dra. Margarita Collazo y la Bióloga Diana Soriano por sus comentarios y la revisión de esta tesis.

A Esther Zuñiga, por sacarme de las dudas técnicas que tenía durante la realización de la tesis.

A Luz Elena Garza por ser sus consejos y apoyo emocional, por brindarme su amistad y por esos viajes que hicimos y que fueron muy constructivos.

A la coordinadora del Herpetario de la Facultad de Ciencias, la Bióloga Mónica Salmerón y al Biólogo Roberto Romero por permitirme llevar a mi hija Karolina durante la realización de mi servicio social en ese lugar y por ser tan considerados y atentos con ella.

A mis hermanos, Nadia Alvarado y Fernando Alvarado por compartir toda una vida juntos, por su inmenso apoyo en todo momento y en especial a mi hermana por cuidar a mi enana cuando yo no estaba.

A mis primas Angy y Vero, por escucharme y darme sus consejos cuando los necesitaba y a sus hermanos por convivir conmigo y pasar juntos muchas experiencias buenas y malas.

A José Luis Melo por ser mi compañero y pareja durante los últimos 11 años de mi vida. Gracias por estar conmigo.

A mis amigos de toda la carrera: a Nancy Arizpe por brindarme su amistad y apoyo incondicional en todo momento, así como a su mamá y hermano que también me apoyaban cuando lo necesitaba. A Karla Granados que de igual forma que Nancy a estado conmigo y a Mariano Herrera que también ha sido un gran amigo y apoyo en mi vida.

A todos mis demás amigos que durante la carrera he tenido y que en su momento cada uno de ellos ha sido importante en mi vida y en la carrera de Biología. Pero en especial a Gris, Paulina, Isadora, Ursula Emanuel, Fernando, Ricardo y Armando, por hacer más amenos mis últimos años en la Facultad de Ciencias.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico, otorgándome una beca dentro del proyecto "Mecanismos ecofisiológicos inducidos por el priming natural, relacionados con la tolerancia de algunas especies de plantas a diferentes hábitats" con número de registro 2004-C01-47859Q.

Por último hacer notar que aunque hay momentos en los que no sabemos cómo resolver las cosas y pareciera que todo nos sale mal, siempre hay alguien dispuesto a ayudarnos a salir de ese momento malo o hay circunstancias que nos llevan a entender que hacer para estar bien. Finalmente cada situación buena o mala es un instante en la vida y siempre hay formas, circunstancias o personas que nos ayudan a vivir lo mejor que se pueda. "El querer es poder hacer cualquier cosa, hasta la que creíamos imposible realizar"

# Índice.

Resumen.....	1
Introducción.....	3
Objetivos.....	6
Hipótesis.....	6
<b>Antecedentes.</b>	
La semilla.....	7
Latencia.....	8
Germinación.....	9
Proteínas de reserva.....	11
Movilización de las proteínas de reserva.....	14
Priming.....	17
Movilización de las proteínas de reserva durante el priming.....	18
Efecto del priming natural sobre la germinación de <i>D. viscosa</i> , <i>W. urens</i> , <i>B. cordata</i> y <i>O. tomentosa</i> .....	19
Características de <i>Wigandia urens</i> adecuadas para la restauración del Pedregal de San Ángel.....	20
Características generales de <i>Wigandia urens</i> .....	20
La semilla de <i>Wigandia urens</i> .....	21
Características de <i>Buddleia cordata</i> adecuadas para la restauración del Pedregal de San Ángel.....	21
Características generales de <i>Buddleia cordata</i> .....	22
La semilla de <i>Buddleia cordata</i> .....	22
Características de <i>Dodonaea viscosa</i> (L) Jacq adecuadas para la restauración del Pedregal de San Ángel.....	23
Características generales de <i>Dodonaea viscosa</i> (L) Jacq.....	23
La semilla de <i>Dodonaea viscosa</i> (L) Jacq.....	24

Características de <i>Opuntia tomentosa</i> adecuadas para la restauración del Pedregal de San Ángel.....	24
Características generales de <i>Opuntia tomentosa</i> .....	25
La semilla de <i>Opuntia tomentosa</i> .....	26

## **Materiales y Metodos.**

Sitios de estudios:

1) La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA).....	26
2) El Parque Ecológico de la Ciudad de México (PECM).....	29
Material biológico.....	32
Tratamiento de priming natural.....	33
Análisis anatómico e histoquímico.....	34
Extracción y Purificación de las proteínas de reserva.....	36
Identificación de las proteínas de reserva.....	40

## **Resultados y Discusión.**

Presencia de cuerpos protéicos en las semillas de <i>Wigandia urens</i> .....	41
Presencia de cuerpos protéicos y detección de proteínas de reserva en las semillas <i>Buddleia cordata</i> .....	43
Identificación de las proteínas de reserva en <i>Buddleia cordata</i> .....	46
Presencia de cuerpos protéicos y detección de proteínas de reserva en las semillas <i>Dodonaea viscosa</i> .....	48
Detección de proteínas de reserva en las semillas en <i>Opuntia tomentosa</i> .....	52
Identificación de las proteínas de reserva en <i>Opuntia tomentosa</i> .....	54

**Conclusiones**.....56

**Referencias**.....58

## RESUMEN

La reintroducción de algunas especies en las áreas naturales se dificulta por el bajo porcentaje de germinación de las semillas y el poco establecimiento de las plántulas dado que estos procesos son críticos en el ciclo de vida de las plantas, especialmente en condiciones naturales. El osmocondicionamiento natural u "priming" natural promueve y sincroniza la germinación y el establecimiento de las plántulas de diferentes especies de plantas que se encuentran en la reserva del Pedregal de San Ángel como son *Wigandia urens*, *Dodonaea viscosa*, *Buddleia cordata* y *Opuntia tomentosa*. Este tratamiento consiste en enterrar las semillas de las diferentes especies durante aproximadamente dos meses (periodo entre la dispersión de las semillas y la estación de lluvias). La permanencia de las semillas en el suelo parece promover algunos cambios en los procesos metabólicos de la semilla activados por la entrada de agua tal como ocurre con el "priming" en condiciones controladas. La germinación de las semillas enterradas es más rápida y sincrónica con respecto a las semillas control en la mayoría de las plantas estudiadas (González-Zertuche *et al.*, 2001). En este estudio, se realizó la detección de cuerpos protéicos en las semillas del lote control y del sometido a osmocondicionamiento natural de *B. cordata*, *D. viscosa* y *W. urens*. También se realizó la comparación entre los patrones de la fracción proteica de semillas del lote control y del lote sometido a osmocondicionamiento natural de *B. cordata*, *D. viscosa* y *O. tomentosa* lo que permitió determinar si hay cambios en la solubilización y movilización de algunas proteínas de reserva en las diferentes especies de plantas en respuesta al osmocondicionamiento natural. El osmocondicionamiento natural no promueve la movilización de las proteínas de reserva en las semillas de *D. viscosa* mientras que en las semillas tratadas con osmocondicionamiento natural tanto de *B. cordata* como de *O. tomentosa* se determinó la presencia de un tipo de proteína de reserva, una globulina 11-S, en la fracción enriquecida. Estos resultados

demuestran que las semillas de diferentes plantas presentan diferente actividad metabólica durante su estancia en el suelo, tal como se reportó para *W. urens* (Gamboa *et al.*, 2006). Nuestros resultados comprueban, tal como ha sido descrito a nivel fisiológico por la Dra. Alma Orozco-Segovia, que el osmocondicionamiento natural es un tratamiento útil para la restauración ya que promueve cambios metabólicos favorables para la germinación de las semillas y el establecimiento de las plántulas de las diferentes especies estudiadas.

## INTRODUCCIÓN.

La restauración es el proceso de recuperar integralmente un ecosistema que se encuentra parcial o totalmente degradado en cuanto a su estructura vegetal, composición de especies, funcionalidad y autosuficiencia, hasta llevarlo a condiciones semejantes a las presentadas originalmente (Bradshaw, 1987; Ewel, 1987; Jordan III *et al.*, 1987; Meffé y Carroll, 1996). Las áreas a restaurar son sistemas dinámicos que se encuentran influenciados por los factores externos que provocan que las características anteriores varíen dentro de un rango a lo largo del tiempo (Parker y Pickett, 1997).

Para poder lograr que la restauración ecológica sea eficiente, se propone la utilización de especies nativas del área a restaurar (Pennington y Sarukhán, 1968) ya que estas especies están adaptadas a las condiciones de esa área. Las especies restauradoras de acuerdo a Gómez-Pompa y del Amo, 1985; Vázquez-Yanes *et al.*, 1997; deben tener las siguientes cualidades:

- 1) Rápida propagación por vía sexual y/o vegetativa.
- 2) Resistir a condiciones limitantes como baja fertilidad del suelo, sequía, suelos compactos y con pH bajo o alto.
- 3) Rápido crecimiento y alta producción de materia orgánica (hojarasca).
- 4) Crecimiento sin tendencia a adquirir una propagación malezoide, invasora e incontrolable.
- 5) Presencia de nódulos fijadores de nitrógeno o micorrizas que compensen el bajo nivel de nitrógeno, fósforo y otros nutrientes en el suelo.
- 6) Que favorezcan el reestablecimiento de las poblaciones nativas de flora y fauna, proporcionándoles habitats y alimento.

7) Tener alguna utilidad adicional a su efecto restaurador como la producción de leña, forraje, vainas comestibles, maderas y néctar. Sin embargo, a pesar de que la restauración con especies nativas ha demostrado resultados positivos (Pennington y Sarukhán, 1968), la reintroducción de las diferentes especies de plantas a las áreas naturales es un proceso muy complejo ya que la mayoría presenta bajas tasas de germinación y poca eficiencia en el establecimiento de las plántulas. Para resolver este problema, se ha propuesto al osmocondicionamiento natural como un método pregerminativo que aumenta el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas provenientes de semillas que han sido tratadas con osmocondicionamiento natural. El osmocondicionamiento promueve cambios fisiológicos y bioquímicos en las semillas como los que ocurren en la fase I de germinación (imbibición).

El osmocondicionamiento natural consiste en enterrar en un sitio de bosque (abierto, claro o cerrado) un lote de semillas de la especie de interés durante cierto tiempo (las semillas después de ser colectadas en la época de dispersión son enterradas hasta el comienzo de la época de lluvias) mejorando así la germinación, el establecimiento y crecimiento de las plántulas.

En el laboratorio de Ecología Fisiológica del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se ha estudiado el efecto del "priming" (en condiciones de laboratorio o natural) sobre la germinación y el establecimiento de las plántulas de *Dodonaea viscosa*, *Buddleia cordata*, *Opuntia tomentosa* y *Wigandia urens*, especies que presentan diferentes tipos de latencia. El incremento en los porcentajes de germinación, mayor probabilidad de sobrevivencia, mejor establecimiento de las plántulas y movilización de proteínas de reserva de las semillas de *W. urens* tratadas con osmocondicionamiento natural, indican que este tratamiento pregerminativo promueve cambios

fisiológicos y bioquímicos en estas semillas, de manera similar a lo que ocurre con semillas de interés agrícola que han sido sometidas a "priming" de laboratorio (González-Zertuche *et al.*, 2001). Este tipo de "priming" consiste en hidratar a las semillas en presencia de soluciones osmóticas (como el PEG) en condiciones controladas de temperatura y humedad, permitiendo así que ocurran eventos metabólicos pregerminativos (se llevan a cabo los cambios metabólicos que ocurren en la fase I de la germinación), pero sin la emergencia de la radícula (Fase III).

### **Cambios fisiológicos y bioquímicos en las semillas sometidas a "priming".**

En *Arachis hypogaea* se reportó un incremento en la actividad de la enzima isocitrato liasa responsable de la movilización de lípidos de reserva (Fu *et al.*, 1988). En *Zea mays*, las células del endospermo acumulan almidón, movilizan lípidos y hay descondensación del núcleo y nucléolo (Cruz-García *et al.*, 1995). También en maíz existe un incremento en la actividad de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa (Sung y Chang, 1993). En *Avena sativa* (Cheung *et al.*, 1979; Dell'Aquila y Spada, 1992), *Allium porrum* (Davison y Bray, 1991) y *Pisum sativa* (Dell'Aquila y Bewley, 1989) se detectó la síntesis de enzimas como, hidrogenasas (Groot *et al.*, 1988; Bradford *et al.*, 2000), catalasas, cinasas, proteínas de fase tardía de embriogénesis (LEAs) y proteínas de choque térmico (HSP) (Blackman *et al.*, 1991). En *Capsicum annum* se registró un incremento de las proteínas solubles (Smith y Cobb, 1991). En análisis cualitativos del patrón de síntesis de proteínas durante el "priming" de laboratorio de las semillas de *Pisum sativum* (Dell'Aquila y Bewley, 1989) se demostró que todas las proteínas que están normalmente asociadas con la germinación, pero no con el crecimiento, son sintetizadas en el embrión en presencia de un soluto.

Bewley y Black (1994), mencionan que el "priming" de laboratorio además de producir la actividad general del aparato metabólico relacionado con la fase pregerminativa, restaura la integridad de las células (autoreparación enzimática de las membranas) a través de la síntesis de lípidos, proteínas, ARN y ADN.

## **ANTECEDENTES.**

### **La Semilla.**

La semilla es el producto de la fecundación del óvulo con el gameto masculino y es una estructura en reposo porque los procesos metabólicos se encuentran suspendidos o disminuidos, debido principalmente a la ausencia de agua (Taiz y Zeiger, 2002). La semilla desempeña un papel importante en la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones de plantas (Bewley y Black, 1994).

Por lo regular la semilla está compuesta por el embrión (eje embrionario), tejidos de reserva (endospermo y/o perispermo y cotiledones) de diferente naturaleza química (almidón, proteínas y lípidos) y la cubierta seminal. Para que se inicie el proceso de germinación, la semilla debe estar expuesta a una serie de factores ambientales (temperatura, humedad y luz) (Bewley y Black, 1985; Fenner, 1985; Bradbeer, 1994; Baskin y Baskin, 1998) que influyen sobre el estado de latencia y favorecen que se inicie la emergencia de la radícula (Taiz y Zeiger, 2002); también existen factores propios de las semillas, como la viabilidad y la latencia, determinados genéticamente, pero que pueden ser modificados por los factores ambientales. Los requerimientos de la semilla para poder germinar varían de especie a especie e influyen tanto la edad de las semillas como el efecto materno (Bradbeer, 1994).

La diversidad morfológica y funcional presente en las semillas es grande, existen muchas diferencias entre las especies en características como: tamaño, organización de tejidos, tipos de reservas, grado de deshidratación al momento de la diseminación, complejidad en los mecanismos de latencia y longevidad potencial y ecológica (Vázquez-Yanes, 1999).

## **Latencia.**

La latencia es cuando las semillas no germinan a pesar de encontrarse en condiciones de temperatura, aire, luz y humedad adecuadas (Baskin *et al.*, 1998). Ha sido muy difícil definir el concepto de latencia ya que no solo implica la ausencia de germinación sino también otras causas, como factores internos propios de ciertas semillas (embrión inmaduro), hasta factores externos (factores ambientales), por esta razón existe latencia fisiológica o ecológica. La latencia permite ampliar la disponibilidad de genotipos en el tiempo y en el espacio lo que resulta fundamentalmente en la formación de bancos de semillas en el suelo (Vleeshouwers *et al.*, 1995).

La latencia se puede dividir en tres tipos:

- Latencia fisiológica: Se presenta cuando existe algún impedimento fisiológico de la semilla para germinar, ya sea por inmadurez del embrión o la presencia de inhibidores químicos. Se puede romper con la aplicación de ácido giberélico, tiempo de post-maduración y/o escarificación.
- Latencia física: Esta latencia es impuesta por las estructuras que están alrededor del embrión (cubierta seminal, glumas, palea, lema, pericarpio, perispermo o endospermo). Estas estructuras pueden interferir en la absorción de agua y en el intercambio de gases, o bien, contener inhibidores de la germinación y además la cubierta seminal puede actuar como barrera para liberar los inhibidores del embrión, así como ejercer una restricción mecánica. Para romper este tipo de latencia se pueden utilizar tratamientos físicos, químicos o biológicos, por ejemplo: la escarificación que puede modificar la permeabilidad de la cubierta seminal; la perforación de la cubierta seminal; el almacenamiento en seco; la imbibición en agua fría o caliente, periodos alternados de humedad y sequía, entre otros. Este tipo de latencia se

presenta frecuentemente en especies adaptadas a lugares con estaciones alternadas de lluvias y sequías.

- Latencia inducida o secundaria: Esta latencia se observa en semillas que inicialmente están aptas para germinar, pero que entran en latencia cuando se encuentran en un medio desfavorable. El estado latente, en algunos casos se rompe por estímulos hormonales o cambios drásticos de humedad y/o temperatura.

### Germinación

La germinación comprende aquellos eventos que comienzan con la absorción de agua por la semilla y terminan con la elongación del eje embrionario (Bewley y Black, 1994).

La germinación de las semillas bajo condiciones óptimas de suministro de agua ocurre en tres fases de acuerdo a Bewley (1997) (Fig. 1):

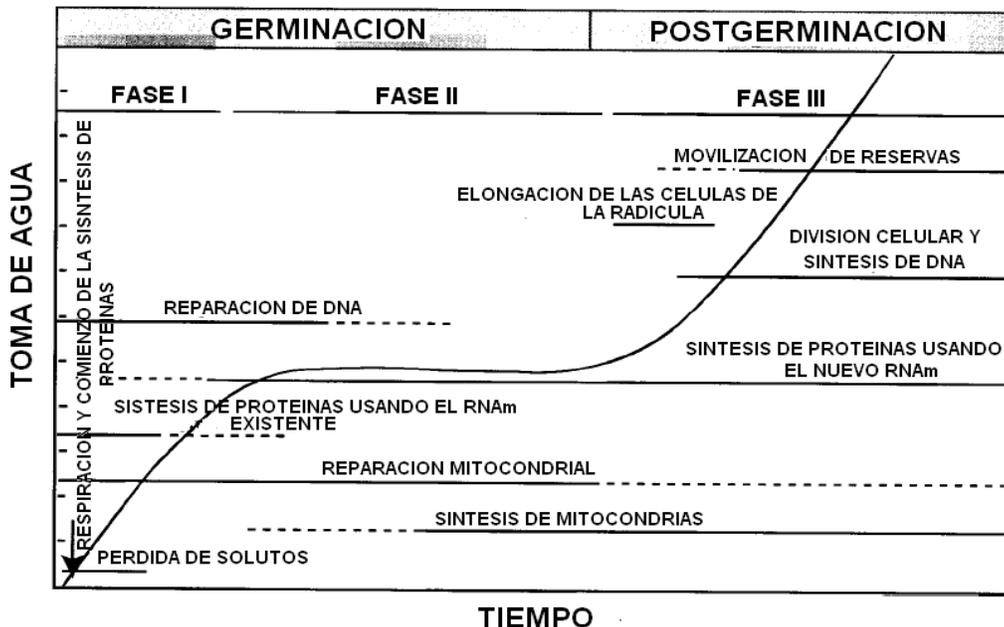


Fig. 1 Eventos metabólicos que ocurren en las semillas de acuerdo al patrón trifásico de absorción de agua (Bewley, 1997)

### **FASE I.** Imbibición del agua.

Las semillas tienen un potencial hídrico altamente negativo (-100 a -200 MPa) como resultado del proceso de maduración y deshidratación de la semilla y a las propiedades coloidales de la cubierta seminal. Las proteínas, la celulosa, el almidón y otras sustancias son las primeras en hidratarse como resultado de una rápida absorción de agua debido al bajo potencial osmótico de la semilla. La imbibición en esta fase da como resultado un ablandamiento o ruptura de la cubierta seminal y un incremento de volumen en la semilla. El potencial hídrico interno de la semilla disminuye. Durante esta fase el DNA y los ribosomas son reparados y las proteínas son sintetizadas a partir del RNA mensajero existente.

### **FASE II.** Activación del metabolismo e hidrólisis.

La continua entrada de agua activa a las enzimas almacenadas y estimula la síntesis de otras nuevas, las cuales transforman e hidrolizan algunas de las reservas almacenadas en energía y en compuestos de bajo peso molecular, estos compuestos son usados para la producción de más células y tejidos. Estos procesos metabólicos provocan una disminución del potencial hídrico en el embrión y en los tejidos circundantes. Debido a la larga duración de esta fase, se generan los suficientes solutos para disminuir el potencial osmótico se induce la suficiente entrada de agua hacia el embrión y los tejidos circundantes. En este periodo se presenta una alta actividad fisiológica. Las actividades celulares son críticas para la germinación normal, ocurriendo así los siguientes eventos metabólicos:

- **Maduración mitocondrial:** las mitocondrias que están presentes en la semilla deben ser rehidratadas, para que las membranas sean enzimáticamente activas. Dentro de las primeras horas de imbibición, tanto la respiración como las síntesis de ATP se incrementan sustancialmente.

- La síntesis de proteínas: aunque el RNA mensajero está presente dentro de las semillas, la síntesis de proteínas no ocurre sino hasta después de la hidratación de la semilla. La nueva síntesis de proteínas durante la fase II es requerida para la germinación.
- Inicia el metabolismo de las reservas almacenadas: esto puede conducir a un cambio en el potencial hídrico de las células que se encuentran dentro del embrión en preparación para la protrusión de la radícula.
- Pueden ser producidas enzimas específicas, incluyendo aquellas responsables del ablandamiento de la pared celular en el embrión y en los tejidos adyacentes a él. Hay también evidencia de ATP activado acidificando las paredes celulares que puede contribuir al emblandecimiento en la preparación para la elongación de la radícula.

### **FASE III.** Emergencia de la radícula y elongación.

La primera evidencia de germinación es la protrusión de la radícula. Ésta es inicialmente el resultado del alargamiento de las células. Sin embargo, poco después del comienzo de la elongación celular, también hay división celular en el meristemo radicular. La iniciación de la protrusión de la radícula ocurre cuando: (a) el potencial osmótico de las células en la radícula llega a ser más negativo debido al metabolismo de las reservas almacenadas; (b) las paredes celulares en la radícula llegan a ser más flexibles, lo que permite la expansión de la misma; o (c) las células en los tejidos adyacentes a la radícula se debilitan y permiten la expansión celular de ésta. Una combinación de estos factores está involucrada en el control de la germinación, dependiendo de la especie de planta.

## **Proteínas de reserva.**

Las proteínas de reserva de las semillas sirven como una fuente de aminoácidos que son usados durante la germinación y el crecimiento de la plántula (Spencer y Boulter, 1984; Bewley y Black, 1994). La síntesis de proteínas está regulada por el contenido de nitrógeno, cisteína, metionina y sulfuro. Las proteínas de reserva son inactivas enzimáticamente, actúan como reservas de alto peso molecular y se forman durante la maduración de las semillas (Shutov *et al.*, 2003). Estas proteínas son almacenadas en cuerpos protéicos, los cuales son generados en el retículo endoplasmático (como en el caso del maíz) o vacuolas de almacén, que son las que se presentan más en la mayoría de las especies (Müntz, 1998). Este tipo de compartimentos protege a las proteínas de reserva de las enzimas hidrolíticas (Müntz *et al.*, 2001, Shutov *et al.*, 2003). Las semillas pueden tener dos o más tipos de proteínas de reserva, aunque un tipo es usualmente el más abundante.

Las proteínas de reserva dependiendo de su solubilidad se clasifican en:

- 1) Albúminas (solubles en agua).
- 2) Globulinas (solubles en medio salino).
- 3) Prolaminas (solubles tanto en alcohol como en agua).
- 4) Glutelinas (solubles en medios ácidos o alcalinos).

Las albúminas, globulinas y prolaminas son las proteínas de reserva que más se presentan en las semillas. Las albúminas están distribuidas en semillas de dicotiledóneas, las prolaminas se encuentran en monocotiledóneas y las globulinas no sólo se encuentran en dicotiledóneas y monocotiledóneas sino también se encuentran en esporas de helechos.

Las albúminas tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa y comprende dos subunidades de aproximadamente 9 y 4 kDa respectivamente. Estas subunidades están unidas por enlaces disulfuros. Aunque en las distintas especies de plantas hay diferencias en la

estructura de las subunidades y en la síntesis de las albúminas, todas las albúminas son proteínas globulares compactas con residuos de cisteína bien conservados.

Las globulinas se pueden dividir en dos grupos dependiendo de su coeficiente de sedimentación:

- 7S vicilina- tipo globulina.
- 11S legumina- tipo globulina.

Tanto las 7S vicilina-tipo globulina y las 11S legumina-tipo globulina están compuestas por múltiples subunidades. Las 7S vicilinas son triméricas, y cada subunidad es de aproximadamente 40-60 kDa, dando como resultado una proteína de aproximadamente 150-190 kDa. Las 11S leguminas son hexaméricas, comprendiendo 6 subunidades de aproximadamente 60 kDa cada una, y tienen interacciones no covalentes entre cada subunidad. Al asociarse las seis subunidades se produce una proteína de 320-450 kDa aproximadamente. Las 7S y 11S globulinas se caracterizan por el bajo contenido de cisteína y metionina.

Las prolaminas son muy diversas en su estructura, variando en el peso molecular de las subunidades (10 a 100 kDa), y en su secuencia de aminoácidos y composición. Las prolaminas se encuentran en mayor cantidad en las semillas de los cereales, en las cuales las prolaminas usualmente almacenan más del 50% del total de nitrógeno. Aunque las únicas excepciones (hasta ahora conocidas) a esta regla son el arroz y la avena, en las cuales la mayor cantidad de proteínas de reserva está representada por las 11-S globulinas y las prolaminas están presentes en cantidades muy bajas (aproximadamente entre el 5 y 10% del total de las proteínas de reserva de la semilla).

Para el caso de las Glutelinas, en la clasificación hecha por Osborne (1924) las consideró como un grupo distinto de los demás tipos de proteínas debido a su solubilidad, en la actualidad se consideran dentro del grupo de las prolaminas.

Las proteínas de reserva son sintetizadas inicialmente en los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso con un pequeño péptido señal, la proteína es translocada al interior del lumen del retículo endoplasmático (RE) y el péptido señal es removido por actividad proteolítica (Shewry, 2000). El plegamiento y la formación de enlaces disulfuros en la proteína ocurren dentro del lumen del RE, después pasan al Aparato de Golgi de donde salen los cuerpos proteicos (Shewry, 2000).

Los eventos que ocurren durante la síntesis de las proteínas de reserva no están claros, y puede variar no sólo entre diferentes especies sino también entre las mismas especies, dependiendo del tipo de proteína y el estado de desarrollo de la semilla.

Las proteínas de reserva son almacenadas en dos regiones separadas en los granos de los cereales (monocotiledóneas): en los granos de la capa de la aleurona (más del 30% del total de las proteínas almacenadas), y en los cuerpos proteicos del endospermo. Una menor cantidad de las proteínas de reserva está presente en el escutelo y en el eje embrionario, y éstas pueden ser hidrolizadas para proveer de aminoácidos durante el crecimiento del eje embrionario antes de la movilización masiva de las proteínas de reserva.

Para el caso de las leguminosas (dicotiledóneas), los cotiledones almacenan la mayor cantidad las proteínas de reserva y en algunos casos también en el eje embrionario.

### **Movilización de las proteínas de reserva.**

La utilización de las sustancias de reservas en las semillas que han experimentado absorción de agua es el evento más importante para el crecimiento y el desarrollo de la plántula. Las proteínas de reserva se encuentran almacenadas formando estructuras insolubles denominadas cuerpos proteicos. Durante la germinación, las proteínas de reserva son movilizadas y degradadas por una variedad de proteasas,

convirtiéndolas en péptidos solubles y en aminoácidos libres. Estos compuestos son movilizados al embrión para ayudar al crecimiento proveyéndole de energía (ATP) por medio de la oxidación de su esqueleto de carbono después de la desaminación (Bewley y Black, 1994). Muchas semillas que han sido tratadas con priming presentan una movilización temprana de las proteínas al inicio de la germinación.

Durante el periodo de maduración de la semilla la degradación y movilización de las proteínas de reserva es nula y esto indica que las proteínas son protegidas contra el ataque proteolítico prematuro (Madison *et al.*, 1981; Müntz *et al.*, 2001). Las proteínas de reserva son movilizadas durante la germinación y el crecimiento de la plántula. El inicio de la movilización de las proteínas de reserva indica que los mecanismos que protegían a las proteínas de reserva en contra de la degradación durante la maduración de las semillas han sido eliminados (Müntz *et al.*, 2001).

La iniciación de la movilización de las proteínas de reserva es atribuida a la formación de endopeptidasas de *ново* que conjuntamente con las enzimas existentes comienzan a degradar a la mayoría de las proteínas en los órganos y tejidos de reserva durante y después de que las semillas han germinado (Müntz *et al.*, 2001). Las carboxipeptidasas parecen ser las principales exopeptidasas involucradas en la movilización de las proteínas de reserva, son una de las mayores clases de proteasas encontradas en las semillas y están localizadas en los cuerpos protéicos de las dicotiledóneas y en el endospermo de cereales (Palma *et al.*, 2002). Durante la movilización de las proteínas de reserva los cuerpos protéicos o las vacuolas de almacén tienen un papel clave, primero como compartimentos de almacenamiento y después como órganos líticos (Bethke *et al.*, 1998).

La movilización de las proteínas en los tejidos de almacén no se inicia simultáneamente en todas las regiones, durante la germinación

pequeñas cantidades de proteínas de reserva se degradan en regiones limitadas (Müntz *et al.*, 2001). No se conoce si la movilización de las proteínas de reserva en el eje embrionario es mediada por las enzimas de *novo* o por las proteasas almacenadas (Müntz *et al.*, 2001), ni se conoce hasta qué punto la biosíntesis temprana de las proteínas, durante la germinación en el eje embrionario y en los tejidos de almacén, depende de los aminoácidos liberados por la movilización de las proteínas de reserva (Bewley, 1982, 1997).

En las semillas de los cereales hay tres sitios en donde se presenta mayor actividad proteolítica, en la capa de la aleurona, en el endospermo y en el eje embrionario (incluido al escutelo). La cantidad de péptidos en el endospermo de los cereales está determinada por un balance entre tres procesos: el transporte de péptidos del endospermo a través de la epidermis escutelar, la aparición de péptidos en el endospermo provenientes de la actividad de la endopeptidasa en las proteínas de reserva y de la degradación de péptidos a aminoácidos por la acción de las exopeptidasas (Waterworth *et al.*, 2001).

La percepción de la presencia de la giberelina por parte de las células de la aleurona inicia una cascada de señales que promueve la acidificación del lumen de la vacuola y la activación de enzimas y transportadores (Bethke *et al.*, 1998). Así la hidrólisis enzimática de las proteínas de reserva que se encuentran en el endospermo produce péptidos y aminoácidos que son translocados a través del escutelo para proporcionar nitrógeno orgánico para el crecimiento del embrión.

La movilización de las proteínas de reserva en las dicotiledóneas ocurre en dos fases: primero, la modificación de las proteínas insolubles (globulinas) almacenadas a proteínas solubles; seguido por la degradación en aminoácidos y pequeños péptidos.

Muchas de las proteínas de reserva son depositadas en las semillas en forma insoluble (que es el caso de las globulinas), y para hacerlas

susceptibles a la hidrólisis deben ser modificadas. Esto se logra por el ataque limitado de ciertas endopeptidasas que transforman a las proteínas insolubles en una forma más soluble y susceptibles a la hidrólisis. Un ejemplo de esto es lo encontrado en los cotiledones en *Curcubita moschata*, en los cuales no es posible extraer proteínas de alto peso molecular que sean globulinas solubles durante el primer día después de la imbibición, pero con el paso del tiempo, las globulinas almacenadas comienzan a ser solubilizadas y ya se puede aislar proteínas solubles de 28-56 kDa, debido a la proteólisis que ha dado como resultado la solubilización de las globulinas. La limitada actividad hidrolítica que tienen las globulinas almacenadas es seguida por la hidrólisis completa de los polipéptidos solubilizados.

### **“Priming”.**

El tratamiento de “priming” consiste en poner a las semillas en soluciones osmóticas (“osmopriming”) o en agua (“hydropriming”) durante cierto tiempo con o sin deshidratación previa a la siembra (Heydecker *et al.*, 1973), teniendo así una hidratación controlada de las semillas que permite los eventos metabólicos pregerminativos, pero no permite la emergencia de la radícula. El “priming” incrementa la germinación, el establecimiento y vigor de las plántulas de muchas especies. La hidratación controlada de las semillas permite que se alcance rápidamente el nivel de humedad y el estado metabólico deseado como consecuencia de la activación de numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos relacionados con la germinación, la tolerancia al estrés ambiental y a la autoreparación de membranas celulares (Bewley y Black, 1982; Henckel, 1982; Bray, 1995; Heydecker y Coolbear, 1997). La hidratación controlada en las semillas se logra en el laboratorio a diferentes concentraciones de PEG (Polietileno-glicol) y bajas temperaturas.

Se ha demostrado que los tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación son eficientes para revigorizar semillas envejecidas, acelerar y uniformar la germinación e incrementar los rendimientos de los cultivos bajo condiciones adversas; estos tratamientos se conocen como revigorización o "seed reinvigoration", acondicionamiento o "seed priming" y robustecimiento o "seed hardening", respectivamente (Sánchez *et al.*, 2001).

La mayoría de las semillas que han sido tratadas con "priming" presentan una rápida y sincrónica germinación, aunque se han reportado algunos casos en los que la respuesta fisiológica no es muy satisfactoria como el caso de las semillas de girasol, *Helianthus annuus*, las cuales al ser tratadas con "priming" presentan una disminución de la longevidad (Bailly *et al.*, 1996).

Las semillas de plantas silvestres que están en el banco de semillas, y que permanecen en el suelo desde la diseminación hasta el inicio de la época de lluvias, también experimentan una hidratación determinada por las condiciones de humedad del suelo y el potencial hídrico de la semilla, que no siempre conduce a la germinación (González-Zertuche, 2001). Esta hidratación controlada por el ambiente del suelo está definida como "osmocondicionamiento natural" (González-Zertuche, 2001). Las respuestas fisiológicas y metabólicas que se han encontrado en las semillas sometidas a osmocondicionamiento natural son muy parecidas a las que se presentan en semillas sometidas a "priming" de laboratorio y también son similares en los cambios metabólicos que ocurren en las primeras fases de la germinación. Las respuestas ocurridas durante el osmocondicionamiento natural pueden ser consecuencia de los procesos de adaptación a las variaciones del ambiente (Gurusinghe *et al.*, 2001).

### **Mobilización de las proteínas de reserva durante el "priming".**

Durante la maduración de las semillas se almacenan una gran cantidad de proteínas LEA y sus respectivos mensajeros, y durante la germinación son degradados. Campos *et al.* (2002) encontró que los niveles de los transcritos correspondientes a los genes *lea: Pvlea 18, Pvlea 4-25 y Pvlea 17.19* en las semillas de frijol con "priming" descendieron notablemente con respecto a las semillas que no fueron tratadas con "priming". Para el caso de los niveles de las proteínas que son codificadas por los 3 genes anteriores, también descendieron durante el "priming". En las semillas de maíz se encontró que los niveles de los transcritos correspondientes a los genes *lea: rab 17 y Zmhsp 17.4* disminuyeron durante los 3 primeros días de "priming" y posteriormente los niveles de estos transcritos aumentaron al prolongar el tiempo en el que las semillas estuvieron sometidas a "priming". Los niveles de las proteínas que son codificadas por los 2 genes anteriores, también descendieron durante los primeros días de tratamiento y posteriormente aumentan. Lo anterior indica que las proteínas codificadas por los genes *lea* antes mencionados, para frijol y maíz, están correlacionadas con los niveles de acumulación de sus respectivos transcritos, por lo que se sugiere que durante el "priming" los niveles de estas proteínas están regulado por la vía transcripcional.

### **Efecto del osmocondicionamiento natural sobre la germinación de *D. viscosa*, *W. urens*, *B. cordata* y *O. tomentosa*.**

Los efectos benéficos del "priming" han sido asociados a varios eventos bioquímicos, moleculares y celulares incluyendo la síntesis de RNA y de proteínas. Se ha reportado que la capacidad germinativa de las semillas de *D. viscosa* no presenta una diferencia significativa cuando se colocan en un claro de un bosque y en el interior del mismo, sin embargo el número de semillas germinadas es mayor en las semillas sometidas a

osmocondicionamiento natural, así como disminución en el contenido de algunos carbohidratos y lípidos totales (Armenta-Jaime, 2007). Debido a las fluctuaciones de temperatura de los distintos sitios de enterramiento e rompe parcialmente la latencia física de las semillas de *D. viscosa*, así mismo hay un incremento en la sobrevivencia de las plántulas tratadas con osmocondicionamiento natural con respecto a las semillas control (Benítez-Rodríguez, 2005), como ocurre normalmente en otras especies que presentan latencia física. (Thompson *et al.*, 1997; Takaki *et al.*, 1981; Fenner, 1985; Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

Para el caso de *W. urens* y *B. cordata* se ha reportados que las semillas previamente enterradas en el campo, germinan más rápido y en forma más sincrónica que aquellas que no son enterradas (González-Zertuche *et al.*, 2001; Aguilera, 2003). En *O. tomentosa* hay un aumento en el porcentaje de germinación de las semillas enterradas, debido a que el conjunto de factores bióticos y abióticos que se presentan durante el enterramiento en el Pedregal de San Ángel promueven la geminación al liberar a las semillas de su estado de latencia (Olvera-Carrillo, 2001).

### **Características de *Wigandia urens* adecuadas para la restauración del Pedregal de San Ángel.**

Generalmente crece en sitios abiertos, bajo condiciones desfavorables es una especie ruderal, típica de vegetaciones secundarias y áreas perturbadas, es característica de la vegetación de los pedregales, como el Pedregal de San Ángel donde forma parte del matorral de *Senecio praecox* (Cano, 1987).

Tienen caracterizas biológicas como una especie de gran capacidad colonizadora y potencialmente valiosa para la restauración ecológica en sitios deforestados o muy perturbados, ya que es una especie típica de la vegetación secundaria, que permite la formación de suelo con la acumulación de hojarasca y que al mismo tiempo ayuda a protegerlo del

intemperismo ambiental, también permite el establecimiento de otras especies. El papel ecológico de *W. urens* está relacionado con varias especies de insectos, en su ciclo de vida o en alguna etapa de éste, asociados a sus frutos, flores y raíces o como espacio físico donde encuentren alimento y abrigo temporal (Cano, 1987).

### **Características generales de *Wigandia urens*.**

*W. urens* pertenece a la familia Hydrophyllaceae, es una planta perenne, erecta, robusta, arbustiva o arborescente, hasta de 6 m de altura, pubescente, seríceo a esparcido o densamente cerdoso-hirsuto y muchas veces con pelos urticantes dándole una coloración áurea o blanca. Hojas con pecíolos de 2.5 a 10 cm de longitud, ápice por lo general terminal; corolas moradas, violáceas, azules o lila-blancuecinas, ligeramente pilosas, de 15 a 22 mm de longitud, anchamente campaneadas; estambres unidos a la corola. Nombre común "Tabaquillo" "ortiga de tierra caliente" "tabaco cimarrón" (Ochoa, 1985). Esta especie se distribuye dentro de la República Mexicana en los estados de Sinaloa, Durango, San Luis Potosí, Hidalgo, Michoacán, Jalisco, Veracruz, Guerrero, Puebla, Oaxaca y en los alrededores del Valle de México (Cano, 1997). Dentro del valle de México se localiza en Teoloyucan, Contreras, Coyoacan, Tlalpan, Xochimilco y La Paz, está mejor representada en la parte suroeste del Valle, de 2250 a 2600 m s. n. m.

### **Las semillas de *Wigandia urens*.**

Esta planta presenta numerosas semillas, de forma variable: poliédricas, trícuetras o cilíndricas, de 0.7 mm de largo por 0.5 mm de ancho, castaño amarillentas, finamente reticuladas o alveoladas (Ochoa, 1985). Son semillas fotoblásticas positivas.

### **Características de *Buddleia cordata* adecuadas para la restauración del Pedregal de San Ángel.**

*B. cordata* es una especie arbórea asociada a sitios perturbados por las actividades humanas (Rzedowski, 1978; González-Espinosa *et al.*, 1991; Cano-Santana y Meave, 1996). Esta especie tolera sitios donde la disponibilidad de agua y nutrimentos en el suelo están limitados. Presenta pubescencia en las hojas, misma que favorece la retención de agua y su fenología foliar está asociada a las épocas de secas y de lluvias (Pozos, 1991). *B. cordata* ha sido usada en la reforestación de sitios con baja disponibilidad de agua y bajas concentraciones de nutrimentos (González-Kladiano y Camacho-Morfin, 1994; Elizalde, 1996) o como forraje para complementar la dieta del ganado ovino en los Altos de Chiapas (Morfin *et al.*, 1995). Desde un punto de vista ecológico, representa un importante eslabón en las comunidades en que se presenta; pues constituye una importante fuente de alimento para los insectos durante todo el año (Cano, 1994). También se ha demostrado que esta especie actúa como nodriza para crear micrositios adecuados para el establecimiento de especies de etapas sucesionales más avanzadas como los encinos (Cabrera *et al.*, 1997)

### **Características generales de *Buddleia cordata*.**

*B. cordata* pertenece a la familia Loganiaceae, en México se encuentran nueve géneros distribuidos en el centro y en el sur del país (Rzedowski, 1978). Son arbustos o árboles que pueden alcanzar más de 20 m de alto, son dioicos, con tallos muy ramificados y con corteza muy fracturada. Las panículas contienen flores de color blanco o amarillo, campanuladas. Los frutos son ovoide-elípticos de 2.5 a 6 mm de largo por 1.5 a 4 mm de ancho, con una dehiscencia septicida y loculícida (Meyer, 1973; Sánchez, 1978; Rzedowski y Rzedowski, 1985). Nombre común: "Tepozan"

La temporada de floración inicia entre agosto y octubre; la fructificación se presenta de noviembre a enero. La época de mayor dispersión ocurre entre enero y marzo (P. Mendoza-Hernández *obs. pers.*) y las semillas pasan en el suelo de cinco a seis meses antes de que germinen al inicio de la época de lluvias.

Esta especie está dividida en dos subespecies, de las cuales solo *Buddleia cordata ssp. cordata* habita en el Valle de México en diversas localidades: la Cañada de Contreras, Desierto de los Leones, Xitle, Texcoco, Cerro de Santa Catarina y el Pedregal de San Ángel; aunque también se presenta en altitudes de 2250-3000 m s.n.m. en matorrales, pastizales y bosques, pero preferentemente en la vegetación secundaria y en lugares intensamente perturbados, incluyendo zonas urbanas.

#### **Las semillas de *Buddleia cordata*.**

Las semillas de *B. cordata* son de forma lanceolada con una textura áspera, miden entre 1 a 1.5 mm de largo y 0.2 a 0.4 mm de ancho por lo que son dispersadas con facilidad por el viento. Estas semillas presentan fotoblastismo positivo ya que incluso pequeñas cantidades de luz favorecen su germinación al momento de que son desenterradas del suelo (Vázquez-Yanes y Orozco-Segovia, 1990). Estas semillas caen al suelo entre los meses de octubre a marzo, y deben pasar varios meses ahí antes de que inicien las lluvias y se favorezca la germinación (Rzedowski y Rzedowki, 1985).

#### **Características de *Dodonaea viscosa* adecuadas para la restauración del Pedregal de San Ángel.**

*D. viscosa* crece en suelos con alta erosión, así como con limitación de agua (Camacho *et al.*, 1991). Este arbusto tolera diversos tipos de suelos, crece sobre tepetate de grano fino o arenisca y en condiciones de sequía, es muy ramifica proporcionando sombra y produce una gran

cantidad de hojarasca durante todo el año, favoreciendo la formación de suelo. Se ha recomendado para reforestar terrenos secos, desnudos y rocosos, pendientes secas y desnudas y para estabilizar arena (FAO, 1956, Miembro, 1986). La Comisión de Recursos Naturales y Desarrollo Rural (CORENA), dentro del Programa Integral de la Recuperación de Bosques y Áreas Verdes del Distrito Federal, propone a esta especie como una alternativa para la reforestación de parques y jardines dentro del área metropolitana.

#### **Las semillas de *Dodonaea viscosa*.**

Las semillas de *D. viscosa* son de forma circular, miden 3.1 mm de largo y 2.9 mm de ancho, de color negro y tiene una textura lisa y glabra. Esta especie presentan una impermeabilidad al agua y a los gases impuesta por la cubierta seminal propiciando una latencia física (Plata-Álvarez, 2002) y una latencia fisiológica que impide que el embrión poco maduro rompa la cubierta seminal (Baskin y Baskin, 2004; Benítez-Rodríguez, 2005). Esta especie tiene fotoblástismo neutro. La presencia de una latencia física parece ser común a todas las especies de *Dodonaea* (Baskin *et al.*, 2004)

#### **Características generales de *Dodonaea viscosa* (L) Jacq.**

*D. viscosa* pertenece a la familia Sapindaceae, es un arbusto pequeño muy resinoso de 1 a 5 m de altura, perennifolio, y forma parte de los matorrales originados por la destrucción del bosque de *Quercus* y selvas bajas, su floración es en agosto, sus flores son unisexuales o poligamodioicas, actinomorfas, hojas oblongo-lanceoladas, con pecíolo corto y fructifica de diciembre a abril, los frutos son capsulares, membranosos, trialados en el dorso, con dos o seis valvas y frecuentemente con una semilla (Stanley, 1923; Martínez, 1969 y Rzedowski y Rzedowski, 1985).

Se distribuye de manera natural en Baja California, Chihuahua, Durango, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nuevo León, San Luís Potosí y Distrito Federal. Crece en climas templados y semiáridos tanto secos como húmedos (Rzedowski y Rzedowski, 1985). Este arbusto no es frecuente en el valle de México; pero si en la zona baja del Pedregal de San Ángel donde se encuentra asociado a comunidades sucesionales de bosques perturbados (particularmente encinares), vegetación mesófila, barrancos taludes, bordes de arroyos, pastizales deteriorados, lugares expuestos, claros de bosques, matorrales y terrenos erosionados (Rzedowski y Rzedowski, 1985).

### **Características de *Opuntia tomentosa* adecuadas para la restauración del Pedregal de San Ángel.**

*O. tomentosa* al igual que otras especies de *Opuntia* que habitan en el Pedregal de San Ángel, se consideran de gran importancia ecológica dentro de la comunidad ya que sus frutos pueden representar una fuente importante de alimento para diversas especies de animales (Olvera-Carrillo, 2001).

*Opuntia* sp. está siendo utilizada en programas para prevenir la erosión del suelo y combatir la desertificación, ya que tiene una gran capacidad de adaptación en tierras pobres nutrimentos, inapropiadas para otro tipo de cultivos, debido a que las distintas especies pueden sobrevivir y extenderse bajo condiciones de lluvia escasa y errática, así como altas temperaturas, y desempeña también un importante papel en la producción de la fauna local (Stephen y Arias 2003).

*Opuntia* es un valioso recurso natural y económico, que no es aprovechado al máximo en muchos países, pero que puede proveer de forraje a ganado, sustento alimentario, y en los últimos años se ha

descubierta propiedades de su mucílago para la obtención de polímeros que ayudaran en un futuro al sector industria (Ramírez, 2008).

### **Características generales de *Opuntia tomentosa*.**

Pertenece a la familia Cactáceae, es una planta arborescente, de tres a seis m de altura, con una copa abierta, tronco con corteza crustácea de 30 a 70 cm de ancho y hasta 220 cm de largo, sus cladodios se expanden en un área de 1 a 5 m de diámetro, los troncos tienen 1-1.6 m de largo y 30 cm de diámetro. Los cladodios adultos son aproximadamente tres veces más largos que anchos, de 24 a 26 cm de largo y 8.5 a 10 cm de ancho; pubescentes, de color verde oscuro a verde grisáceo oscuro. Las areolas están distantes de 2 a 2.5 cm entre sí con lana de color gris negruzco y glóquidas de color amarillo oscuro. Las espinas generalmente ausentes en las areolas inferiores, o bien, hay una o dos en las inferiores y hasta cuatro en las superiores, son de color grisáceo. La epidermis presenta tricomas muy abundantes. Tiene flores tubulares de color rojo de aproximadamente 6 cm de largo y 5.5 cm de ancho, las anteras son dorsifijas y el filamento es de color rosa rojizo; el grano de polen es poliporado con muros verrugosos; el estilo es púrpura y el estigma presenta seis o nueve lóbulos. Tiene frutos son elipsoides, con hilo profundo, de 3.3 a 5 cm de largo y de 2.7 a 3 cm de ancho, con el pericarpelo de paredes delgadas de color rojo purpúreo, posee glóquidas abundantes, distantes de 6 a 8 mm entre sí, de color castaño con espinas setosas (Bravo-Hollis, 1978; Benson, 1982).

Los nombres comunes de esta variedad son: "Nopal chamacuero", "nopal de San Gabriel" y nopal (Scheinvar, 1982). Se distribuye en México y Guatemala, es abundante en el Valle de México y se encuentra en vegetación de matorral xerófilo a una altitud de 2300-2600 m s.n.m. también se encuentra en pastizales a una altitud de 2275-2800 m s.n.m

### **La semilla de *Opuntia tomentosa*.**

Las semillas son discordes, de color amarillento, con arilo ancho e irregular, de 4 a 6 mm de diámetro, con tricomas y drusas sobre la cubierta seminal. Las semillas presentan dos tipos de latencia: una exógena, debido a la presencia de una cubierta funicular adicional y la cubierta seminal que imponen una restricción mecánica a la emergencia de la radícula; y otra endógena, probablemente por la inmadurez del embrión. *O. tomentosa* es una especie fotoblástica positiva, aunque con el paso de tiempo y dependiendo de las condiciones de almacenamiento los dos tipos de latencia cambian. También hay cambios en el tipo de latencia que presentan las semillas dependiendo del año de colecta y esto probablemente ocurra debido a los efectos maternos que están involucrados en la maduración de las semillas (Olvera-Carrillo, 2001).

## OBJETIVOS.

1. Comparar la presencia de cuerpos protéicos en cortes histológicos de semillas control y sometidas a osmocondicionamiento natural de *W. urens* y *B. cordata* y *D. viscosa*.
2. Determinar el efecto del osmocondicionamiento natural sobre la movilización de las proteínas de reserva en semillas de *D. viscosa*, *B. cordata* y *O. tomentosa*.
3. Identificar las proteínas de reserva.

## HIPÓTESIS.

El osmocondicionamiento natural promueve la movilización de proteínas de reserva de las especies que responden a este tratamiento.

## MATERIALES Y METODOS.

### Sitios de estudio

1) La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA). Se ubica en los terrenos de Ciudad Universitaria, UNAM al sur del Distrito Federal. Es un mal país o matorral xerófilo perturbado producto de la erupción de hace 2500 años del volcán Xitle y bocas adyacentes (Rzedowski, 1994). Por encontrarse en el eje neovolcánico, donde confluyen dos regiones biogeográficas, y presentar una topografía muy heterogénea, resultado del derrame de la lava, en esta área se han establecido poblaciones animales y vegetales con afinidades neárticas y neotropicales, incluso algunas especies endémicas (Panti, 1984).

Sus coordenadas geográficas son 19°18'31" y 19°19'17" latitud Norte, 99°10'20" y 99°11'52" longitud Oeste, a una altitud de 2200 a 2700 m s.n.m (Castillo-Argüero *et al.*, 2004).

El derrame volcánico original ocupaba 80 km<sup>2</sup>, desde la parte sur de la Cuenca de México, en las faldas del Ajusco, donde se establecieron asociaciones de bosques de pino y encino, hasta los matorrales de *Senecio praecox* (Rzedowski, 1994). Esta última asociación vegetal ocupaba 40 Km<sup>2</sup>, pero el crecimiento de la ciudad ha transformado el 90% de este Pedregal en zonas urbanas, quedando pequeños fragmentos aislados (Rojo, 1994).

La reserva presenta una vegetación de tipo matorral xerófilo con una comunidad de *Senecio praecox*, la cual está constituida predominantemente por un estrato herbáceo bien desarrollado, un estrato arbustivo y pocos elementos arbóreos (Rzedowski, 1954). Las especies más importantes dentro de la reserva, por su aporte a la productividad primaria neta a la comunidad son, en orden decreciente: *Verbesina virgata* (Asteraceae), *Senecio praecox* (Asteraceae), *Muhlenbergia robusta* (Gramineae), *Buddleia cordata* (Loganiaceae), *Dahlia coccinea*, *Echeveria gibbiflora* (Crassulaceae), *Manfreda brachystachya* (Amaryllidaceae), *Cissus sicyoides* (Vitaceae), *Buddleia parviflora* (Loganiaceae), *Eupatorium petiolare* (Asteraceae),

*Eysenhardtia polystachya* (Leguminosae) y *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae) (Cano-Santana, 1994). También existen asociaciones de bosque de pino-encino, bosque de pino, bosque de oyamel y bosque de aile (Negrete y Soberón, 1994).

La fauna está representada por 37 especies de mamíferos, entre las que destacan 12 especies de murciélagos y 16 de roedores, que constituyen el 75% de la fauna; también hay conejos, cacomixtles, zorrillos y el tlacuache, un marsupial. Han desaparecido del área las zorras, el linco, la comadreja y el puma. Hay 106 especies de aves, que representan a 76 géneros y 54 familias, aproximadamente el 41% de la avifauna del Distrito Federal, además cuatro de estas especies son endémicas de México (Rojo y Rodríguez, 2002).

La Reserva del Pedregal de San Ángel presenta un clima templado, sin estación fría pronunciada, propio de las planicies altas de regiones tropicales y subtropicales (Rzedowski, 1954). El clima es Cb (w<sub>0</sub>)(w)(i')g que corresponde a un clima templado subhúmedo con lluvias en el verano (García, 1964). En el pedregal existe una estacionalidad muy marcada con una temporada seca de noviembre a mayo y una lluviosa de junio a octubre. Presenta una precipitación total anual de 843 mm (Camacho *et al.*, 1993a) y la temperatura máxima del año corresponde al mes de abril y la mínima a enero (Fig. 1, Camacho *et al.*, 1993b, c)

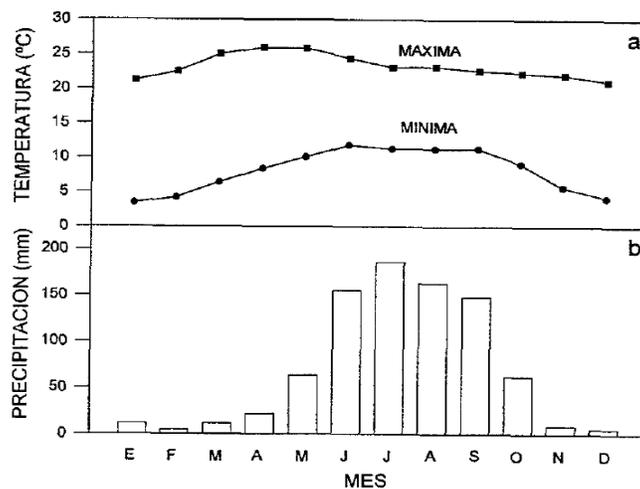


Fig. 1. a) Temperatura mínima y máxima mensual (°C). b) Precipitación promedio mensual (mm) Camacho *et al.*, 1993a, b y c.

La Reserva ha permitido la protección del hábitat de numerosas especies de animales y plantas que antes estaban distribuidas ampliamente en la cuenca del Valle de México y que ahora se encuentran restringidas a la Reserva (Rojo, 1994), por lo que es importante hacer una restauración ecológica en esta área debido a la gran perturbación ecológica que presenta.

Comparando los registros de la flora del Pedregal de San Ángel realizados por Rzedowski, (1954) con los de Valiente *et al.*, (1991) se estima que han desaparecido de esta asociación vegetal alrededor de 150 especies de plantas y se han introducido 100 especies representativas de los hábitats más perturbados.

2) El Parque Ecológico de la Ciudad de México (PECM). Se ubica en las faldas del Ajusco, cerca del kilómetro seis y medio de la carretera Picacho-Ajusco al sur del Distrito Federal y comprende un área de 600 hectáreas. Geográficamente el PECM se encuentra ubicada entre los 19° 16' y 19° 14' norte y entre los 99° 13' y 99° 10' oeste (INEGI, 2000).

El parque fue decretado en 1989 como área sujeta a conservación ecológica (Diario Oficial, 1989). En esta zona hay fuertes presiones sobre las comunidades bióticas debido a las actividades humanas de los asentamientos cercanos (Cabrera, 1995). La vegetación de esta zona estaba originalmente compuesta por un bosque de encinos inmerso en un matorral xerófilo bien establecido (Soberón *et al.*, 1991). Esta comunidad biótica representaba una fase sucesional del proceso iniciado después del derrame de lava del volcán Xitle y conos adyacentes ocurrida hace más de 2000 años (White *et al.*, 1990; Cano-Santana y Meave, 1996).

De acuerdo con Soberón *et al.* (1991) en el PECM se pueden reconocer cuatro unidades de vegetación: 1) bosque denso de encinos, dominado por varias especies de *Quercus*; 2) bosque abierto de encinos que constituye una transición entre el bosque denso y el matorral xerófilo; 3) matorral xerófilo perturbado o mal país, donde *Buddleia cordata* es la

especie arbórea más conspicua, aunque no siempre la más abundante, y 4) matorral denso de *Sedum oxipetalum*, en sitios donde aparentemente no han ocurrido perturbaciones recientes.

El clima del PECM es Cb(W<sup>2</sup>) wig (templado subhúmedo con lluvias en verano) de acuerdo a la clasificación de Köpen modificada por García (1981). Los meses de diciembre y enero son los más fríos del año y la época de secas se extiende desde noviembre hasta mayo. Los meses más calurosos son en abril y mayo, y la época de lluvias abarca desde junio hasta octubre. La precipitación anual es de 1000 mm, la temperatura media anual oscila entre 12 y 14°C y ocasionalmente durante los meses fríos pueden ocurrir heladas (White *et al.*, 1990). El PECM se encuentra ubicado entre dos estaciones meteorológicas Ajusco y Tlalpan de las cuales se obtuvieron los datos climatológicos (Fig. 2).

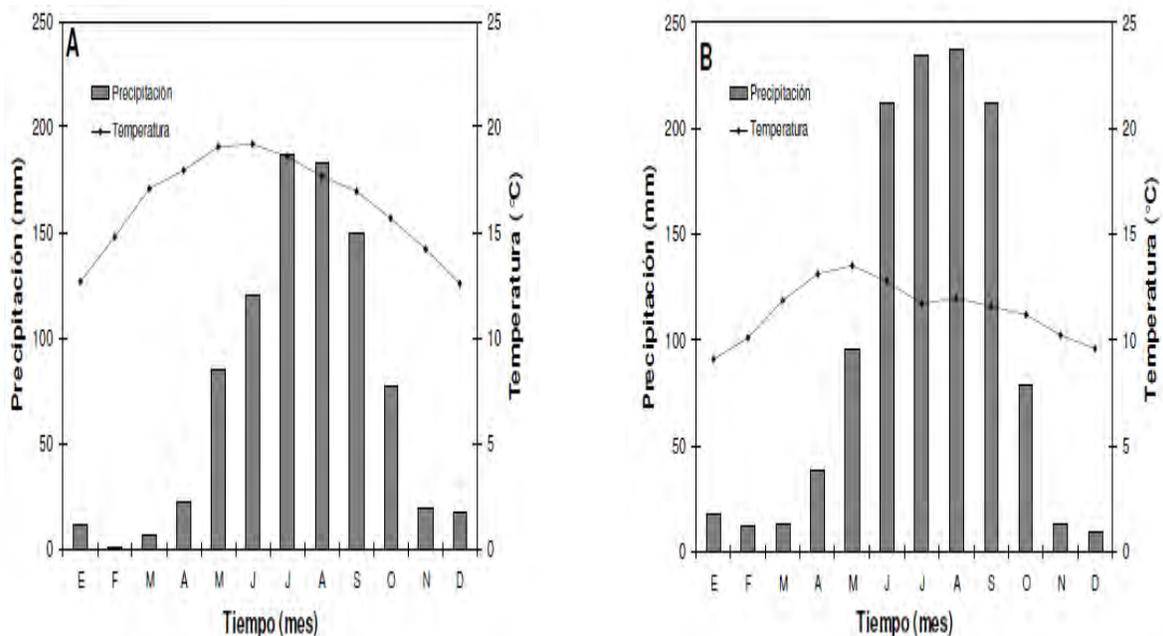
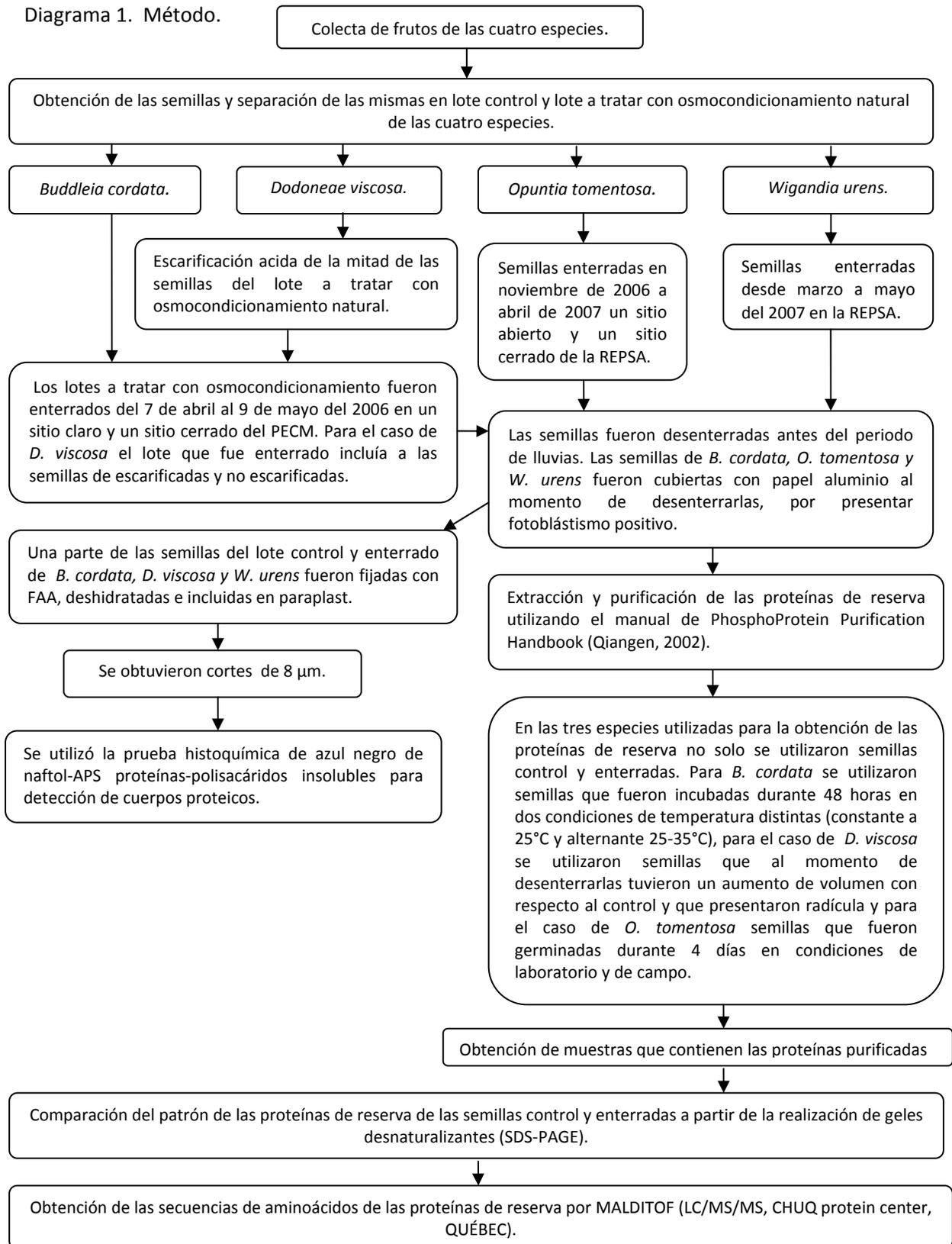


Fig. 2 Temperatura y precipitación promedio mensual (A) Estación de Tlalpan. (B) Estación del Ajusco (INEGI 2000).

Los aspectos generales que se siguieron en la metodología se muestran en el Diagrama 1.

Diagrama 1. Método.



## Material biológico:

### *Buddleia cordata.*

Las semillas de *B. cordata* fueron colectadas en el mes de marzo del 2006 en el PECM. Las semillas fueron extraídas directamente de las panículas maduras, introduciendo cada panícula en bolsas de plástico y sacudiéndolas fuertemente hasta liberar las semillas en el interior de la bolsa. Se separaron las semillas de los restos de los frutos. Se dividieron en dos lotes para su posterior tratamiento, uno de ellos se consideró como control y permaneció en el Laboratorio de Ecología Fisiológica del Instituto de Ecología, UNAM en condiciones ambientales (temperatura entre 23 y 25°C y una humedad relativa de 40 a 50%) y el otro lote se sometió al osmocondicionamiento natural en el PECM.

### *Dodonaea viscosa*

Se colectaron semillas de *D. viscosa* en el mes de marzo del 2006 en el PECM. Para obtener las semillas que fueran viables se les eliminaron los tejidos del fruto, posteriormente se seleccionó a las de color negro y se eliminaron las que presentaban lesiones, color opaco, blancuzco o café, tamaño pequeño o forma incompleta y que no flotaban. Las semillas se dividieron en dos lotes para su posterior tratamiento, uno de ellos se consideró como control y permaneció en el Laboratorio de Ecología Fisiológica en condiciones ambientales (temperatura entre 23 y 25°C y una humedad relativa de 40 a 50%) y el otro lote se sometió al osmocondicionamiento natural.

Dado que las semillas de *D. viscosa* presentan una latencia física, la mitad de las semillas del lote que iban a ser tratadas con osmocondicionamiento natural se sometieron a escarificación ácida (para promover la imbibición), la cual consistió en poner las semillas en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado durante 2 minutos y se enjuagaron con agua corriente para quitar el exceso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de este tiempo se les

dejó secar. Este lote (tanto de las semillas escarificadas y no escarificadas) se sometió a osmocondicionamiento natural.

### ***Opuntia tomentosa.***

En la REPSA se colectaron en noviembre del 2006, los frutos de *O. tomentosa* que tenían el pericarpelo totalmente rojo. Los frutos se colocaron en bolsas de papel y se trasladaron al Laboratorio de Ecología Funcional para extraer las semillas, se les quitó el pericarpelo y se presionó la pulpa, se lavaron con agua corriente para eliminar la pulpa. Se dejaron secar durante 24 horas sobre papel estraza y finalmente se almacenaron en frascos de vidrio en condiciones ambientales (temperatura entre 23 y 25°C y una humedad relativa de 40 a 50%) para su posterior utilización.

### ***Wigandia urens.***

Las semillas de *W. urens* fueron colectadas en la REPSA en marzo del 2007. Las semillas fueron extraídas introduciendo cada panícula en bolsas de plástico y sacudiéndolas fuertemente hasta liberar las semillas en el interior de la bolsa. Se separaron las semillas de los restos de los frutos. Las semillas de *W. urens* se dividieron en dos lotes para su posterior tratamiento, uno de ellos se consideró como control y permaneció en el Laboratorio de Ecología Fisiológica del Instituto de Ecología, UNAM en condiciones ambientales (temperatura entre 23 y 25°C y una humedad relativa de 40 a 50%) y el otro lote se sometió al osmocondicionamiento natural.

### **Tratamiento de osmocondicionamiento natural.**

Los lotes de semillas a tratar con osmocondicionamiento natural de *B. cordata*, de *D. viscosa*, de *O. tomentosa* y de *W. urens* se metieron en bolsas de organza. Estas bolsas se colocaron en unas bolsas más grandes de malla, las cuales se enterraron a una profundidad 10 cm en dos sitios del PECM (sólo para el caso de *B. cordata* y de *D. viscosa*): un

sitio claro y un sitio cerrado del bosque desde el 7 de abril al 9 de mayo del 2006. Las semillas de *O. tomentosa* se enterraron en dos sitios de la REPSA: un sitio abierto y un sitio cerrado desde el mes de noviembre de 2006 al mes de abril de 2007. Para el caso de *Wigandia ureas* las semillas fueron enterradas durante dos meses y medio, desde marzo a mayo del 2007 en la REPSA.

Las semillas de las cuatro especies utilizadas se desenterraron antes del establecimiento de la época de lluvias, para evitar que germinaran. La temperatura fue registrada en cada uno de los sitios de enterramiento con sensores electrónicos (data loggers) Hobo Temp H01-001-01 (Onset Computer Corporation Pocasset, MA, USA).

En el momento de desenterrar las semillas de *B. cordata*, de *O. tomentosa* y de *W. urens* fueron colocadas en papel aluminio, debido a que estas semillas son fotoblásticas positivas. Las semillas desenterradas de las cuatro especies se sacaron de las bolsas de organza y se pusieron a secar durante 24 horas en el cuarto oscuro del Laboratorio de Ecología Funcional. Solo las semillas de *B. cordata* una vez secas se pasaron por un tamiz de metal (Mont-Inox, No. 80) para quitar los residuos florales que se les había quedado. Las semillas escarificadas de *D. viscosa* que fueron enterradas en el sitio claro presentaron una gran cantidad de semillas con aumento de volumen con respecto al control y de semillas con radícula, ambos tipos de semillas se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a -78 °C hasta ser utilizadas. Las semillas desenterradas de las cuatro especies se almacenaron en condiciones ambientales, las de *D. viscosa* en bolsas de papel estraza y las de las otras 3 especies en frascos de vidrio.

#### **Análisis anatómico e histoquímico.**

Para conocer la anatomía de las semillas de *W. ureas*, *B. cordata* y *D. viscosa*, así como la probable degradación de los cuerpos protéicos por la movilización de las proteínas de reserva en respuesta al enterramiento, se obtuvieron cortes longitudinales y transversales en los

cuales se aplicaron técnicas histoquímicas (azul negro de naftol-APS proteínas-polisacáridos insolubles) para poder observar y comparar los cambios en los cuerpos protéicos de las semillas control con respecto a las enterradas.

Se utilizaron semillas control de *W. urens*, *B. cordata* y *D. viscosa*, así como semillas enterradas de *W. urens* debido a que se ha reportado que éstas presentan una movilización de las proteínas de reserva tanto del tipo de globulinas como vicilinas, en respuesta la osmocondicionamiento natural (Gamboa-deBuen *et al.*, 2006); semillas enterradas en un sitio claro del PECM de *B. cordata* debido a que éstas presentaron un mayor capacidad germinativa y semillas escarificadas enterradas en el sitio claro y cerrado de *D. viscosa* ya que éstas presentaron semillas germinadas al momento de desenterrarlas.

Las semillas fueron fijadas en FAA (Formaldehido ácido acético y alcohol), deshidratadas e incluidas en paraplast y se hicieron cortes de 8 µm. Una vez obtenidos los cortes, se utilizó la prueba histoquímica de azul negro de naftol-APS proteínas-polisacáridos insolubles. El protocolo que se siguió fue el siguiente (López *et al.*, 2005):

1. Se desparafinarón y se hidrataron los cortes hasta agua.
2. Se aplicó ácido peryódico durante 15 minutos.
3. Se lavó con agua durante unos minutos.
4. Se aplicó el reactivo de Schiff durante 15 minutos.
5. Se lavó con agua.
6. Posteriormente se lavó con ácido acético al 2% durante un minuto para evitar la formación de cristales.
7. Se enjuagó con agua.
8. Se deshidrataron los cortes hasta etanol al 50%.
9. Posteriormente se aplicaron unas gotas de azul negro de naftol (al 11% en etanol al 50%) durante 1 minuto.
10. Se enjuagó con butanol.
11. Se pasaron los cortes por xilol durante 1 minuto.
12. Una vez lista la preparación se montó con entellan.

### **Extracción y purificación de las proteínas de reserva:**

Para poder determinar si las semillas enterradas movilizan proteínas de reserva como respuesta al enterramiento se realizó la extracción y purificación de las proteínas de reserva.

Se utilizaron semillas de *B. cordata* del lote control y tratadas con osmocondicionamiento natural, de las cuales solo se utilizaron las que fueron enterradas en un sitio claro del PECM por presentar una mayor capacidad germinativa. También se realizó la extracción y purificación de las proteínas de reserva de las semillas del lote control y del enterrado en un sitio claro del PECM de *B. cordata* que fueron incubadas durante 48 horas en dos condiciones de temperatura distinta. Para poder llevar a cabo lo anterior se pusieron a germinar 500 mg tanto de las semillas del lote control como del enterrado en un sitio claro en cajas de petri con agar al 1% (3 cajas de petri para cada uno de los tratamientos) en dos cámaras de ambiente controlado Biotronette Plant Growth Chamber 884 (LAB LINE Instruments, Inc.; Melrose Park, Illinois, USA), una a 25°C con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y otra a una temperatura alternante de 25-35°C con un fotoperiodo largo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), durante 48 horas para ambos tratamientos. Después de las 48 horas se colectaron las semillas de todas las cajas de petri, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -78°C.

Lo anterior se realizó para poder saber si la movilización de las proteínas de reserva está involucrada en el aumento de la capacidad germinativa que presentan las semillas que han sido germinadas en condiciones de temperatura alternante (Gonzalez-Zertuche, 2005).

En el caso de *D. viscosa* se utilizaron semillas del lote control y semillas escarificadas y no escarificadas enterradas en un sitio claro del PECM, debido a que las semillas de este sitio presentaron un aumento de volumen con respecto al control y una mayor cantidad de semillas germinadas al momento de desenterrarlas. También se hizo la extracción y purificación de las proteínas de reserva de las semillas del

lote enterrado en un sitio claro que presentaron un incremento en volumen con respecto a las semillas control y de las que presentaron raíz al momento de desenterrarlas. Lo anterior se realizó debido a que se consideró que las semillas que presentaron un incremento en volumen con respecto a las semillas control si se imbibieron en el tiempo que estuvieron enterradas por lo que si presentaron algún tipo de cambio fisiológico.

Las semillas de *O. tomentosa* presentan una cubierta seminal muy dura por lo que se decidió extraer el embrión de cada una de las semillas y trabajar con éstos. Se utilizaron semillas de *O. tomentosa* del lote control y del enterrado en un sitio abierto y cerrado en la REPSA. También se realizó la extracción de las proteínas de reserva de los embriones extraídos de las semillas germinadas en condiciones controladas y en condiciones de campo, para ambas condiciones se utilizaron semillas del lote control y del enterrado en un sitio abierto. Las semillas germinadas en condiciones controladas fueron incubadas en una cámara de ambiente controlado Biotronette Plant Growth Chamber 884 (LAB LINE Instruments, Inc.; Melrose Park, Illinois, USA) a una temperatura constante de 25°C y un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y las semillas que fueron germinadas en campo se pusieron en un sitio abierto en la REPSA. Lo anterior se realizó con 3 replicas de 30 semillas tanto del lote control como del enterrado en un sitio abierto y se germinaron en ambas condiciones (de campo y de laboratorio) durante 4 días. Las semillas se colocaron dentro de canastas elaboradas con una malla de nylon y forradas con una tela de malla fina y porosa, las cuales contenían tierra orgánica. Durante los cuatro días tanto las semillas germinadas en condiciones controladas y en campo se regaron con agua corriente. Después de los 4 días las semillas se colectaron, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a - 78°C en el Laboratorio de Ecología Funcional hasta su utilización.

Lo anterior se realizó para comparar el patrón proteico obtenido de las semillas tratadas con osmocondicionamiento natural contra el patrón proteico obtenido de las semillas germinadas y de esta forma encontrar si las proteínas de reserva presentes en las semillas de *O. tomentosa* que fueron tratadas con osmocondicionamiento natural es similar al patrón proteico obtenido de las semillas que fueron germinadas, así como saber si el patrón proteico se afecta por las condiciones en las que son germinadas las semillas (de campo o de laboratorio).

La extracción y purificación de las proteínas de reserva de las semillas de *W. urens* tratadas con osmocondicionamiento natural se logro con las columnas de PhosphoProtein Purification Kit (Qiagen, 2000), por lo que se decidió utilizar el mismo protocolo para la extracción y purificación de las proteínas de reserva de *D. viscosa*, *B.cordata* y *O. tomentosa*.

Para realizar la extracción y purificación de las proteínas de reserva se utilizaron 500 mg de semillas de cada uno de los tratamientos antes mencionadas de cada especie. Las semillas se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron en un mortero, hasta obtener un molido fino y se siguió el protocolo descrito en el manual de PhosphoProtein Purification Handbook (Qiagen, 2002):

1. Se añadieron 875  $\mu$ l de la solución stock CHAPS (10%[w/v]) a 35 mL del Buffer de lisis; y a 3 mL de el Buffer de Elusión se añadieron 75  $\mu$ L de la solución stock CHAPS (10%[w/v]), para tener una concentración final en ambos buffer de 0.25% [w/v].
2. Se añadió una tableta del inhibidor de proteasas y 10 uL de la solución de Benzonase a 5 mL del Buffer de lisis que se preparó en el punto anterior y se mezcló.
3. En la mezcla anterior se resuspendieron los 500 mg de semillas.
4. Se incubó durante 30 min a 4<sup>o</sup> C y cada 10 min se homogenizaba la mezcla con un vortex.
5. Después de los 30 min de incubación se centrifugaron durante 30 min las células lisadas a 13000 rpm a 4<sup>o</sup> C.

6. Durante la centrifugación se prepararon las columnas. Se aplicaron 4 mL del buffer de lisis (preparado en el paso 1), para equilibrar la columna.
7. Una vez terminado el tiempo de la centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de las proteínas (utilizando el método de Bradford).
8. Se tomó un volumen del sobrenadante de aproximadamente 2.5 mg de proteína total y se ajustó la concentración de las proteínas a  $0.1 \text{ mg/mL}^{-1}$  al añadir Buffer de lisis y se tuvo un volumen total de 25 mL (sobrenadante + Buffer de lisis).
9. Se vertió la mitad de la mezcla anterior (12.5 mL) en la parte superior de la columna y posteriormente la otra mitad de la mezcla. Se colectó 1 mL de lo que pasó por la columna y se cuantificó la concentración de las proteínas (utilizando el método de Bradford).
10. Una vez que pasaron los 25 mL obtenidos en el paso 8, se pasaron 6 mL del Buffer de Lisis a través de la columna de purificación.
11. Después de que pasaron los 6 mL de Buffer de Lisis a través de la columna, se vertieron 500  $\mu\text{L}$  del Buffer de Elusión a través de la columna, colectándose en tubos eppendorf de 1 mL.
12. Se repitió el paso 11 cuatro veces más. En este paso se obtuvieron cinco eluciones de 500  $\mu\text{L}$ , las cuales se enumeraron del 1 al 5.
13. Se concentró la elusión 2 y 3 al centrifugarlas a 13000 rpm durante 10 minutos en filtros (Nanosep ultrafiltration columns 10 kDa). Se determinó la concentración de proteínas utilizándose el método de Bradford.

Se obtuvo una fracción enriquecida de proteínas fosforiladas (obtenidas en el paso 13) por cada una de las muestras de cada tratamiento mencionado para cada una de las especies, con las cuales se realizaron

varios geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12% de Acrilamida que se corrieron a 20 mA y se tiñeron con Azul de Coomassie.

### **Identificación de las proteínas de reserva.**

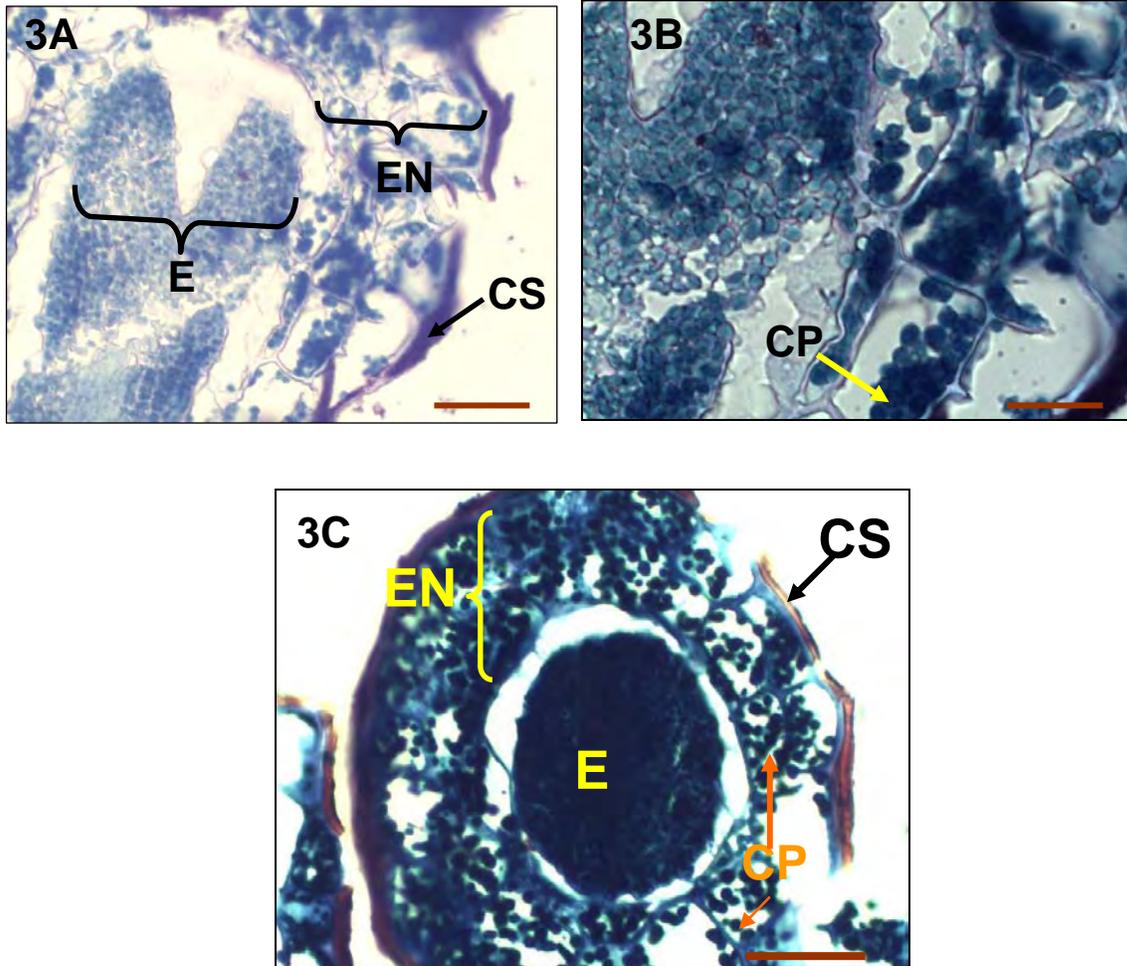
A partir de los geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) obtenidos para cada especie se cortaron las bandas correspondientes a las proteínas de reservas presentes en la fracción proteica obtenida de las semillas tratadas que no estaban presentes en la fracción proteica de las semillas de los lotes control. Las proteínas se identificaron por MALDITOF (LC/MS/MS, CHUQ protein center, QUÉBEC). El análisis consistió en la digestión de las proteínas con tripsina y los péptidos resultantes se separaron por medio de una cromatografía capilar líquida (nano/LC) y fueron analizados por espectrometría de masas (ES-MS/MS). Todas las MS/MS muestras se analizaron usando Mascot (Matrux Science, London, UK). El programa Scaffold se utilizó para validar los péptidos y, en consecuencia, identificar las proteínas. Se consideraron los péptidos con un valor mayor del 95% y las proteínas correspondientes a dos o más péptidos se consideraron al presentar un valor mayor del 95%. Todas las proteínas identificadas en este trabajo cumplieron estos requisitos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### **Presencia de cuerpos protéicos en las semillas de *Wigandia urens*.**

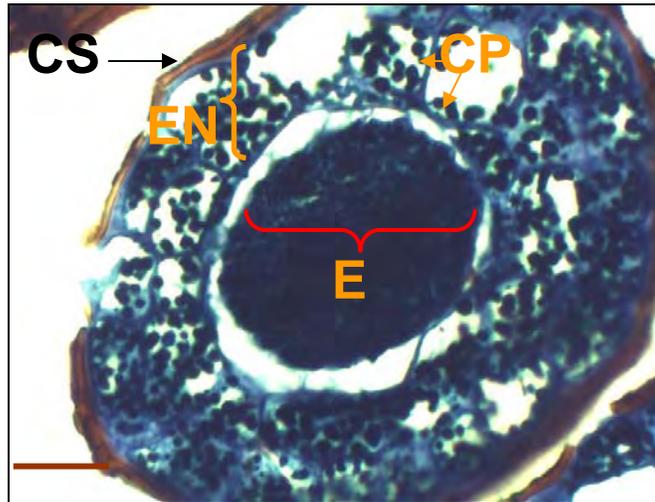
El osmocondicionamiento natural promueve la movilización de las proteínas de reserva, tanto de globulinas y vicilinas, de las semillas de *W. urens* (Gamboa-deBuen *et al.*, 2006).

En la figura 3 se muestra el corte longitudinal de una semilla control de *W. urens*. Esta semilla presenta un embrión mediano, con una cubierta seminal y de 2-3 estratos de células de endospermo (Fig. 3A). Los cuerpos protéicos se observan tanto en las células embrionarias como en las del endospermo. En un acercamiento se puede observar los cuerpos protéicos teñidos de azul en las células del endospermo. (Fig. 3B), también se muestra un corte transversal de una semilla control de *W. urens*. Se puede observar el embrión, el endospermo y la cubierta seminal (Fig. 3C). En las células del endospermo se observan los cuerpos protéicos bien definidos (Fig. 3C).



**Fig. 3** Semilla control de *Wigandia urens*. (3A) Corte longitudinal mostrando embrión (E), endospermo (EN) y cubierta seminal (CS) (Tinción de azul negro de naftol-APS, aumento 20x) Escala 13  $\mu$ m (3B) Corte longitudinal mostrando los cuerpos protéicos (CP) de las células del endospermo (Tinción de azul negro de naftol-APS, aumento 40x). Escala 6  $\mu$ m (3C) Corte transversal mostrando embrión (E), endospermo (EN), cubierta seminal (CS) y los cuerpos protéicos (CP) de las células del endospermo (Tinción de azul negro de naftol-APS, aumento 20x). Escala 11  $\mu$ m.

En la figura 4 se muestra un corte transversal de una semilla del lote enterrado en la REPSA de *W. urens*. Se puede observar el embrión, el endospermo y la cubierta seminal. En las células del endospermo se observan los cuerpos protéicos similares a los de las semillas control. La anatomía y la presencia de cuerpos proteicos de las semillas del lote enterrado son igual a las semillas del lote control, por lo que no se encontró ninguna diferencia entre las semillas de ambos lotes.



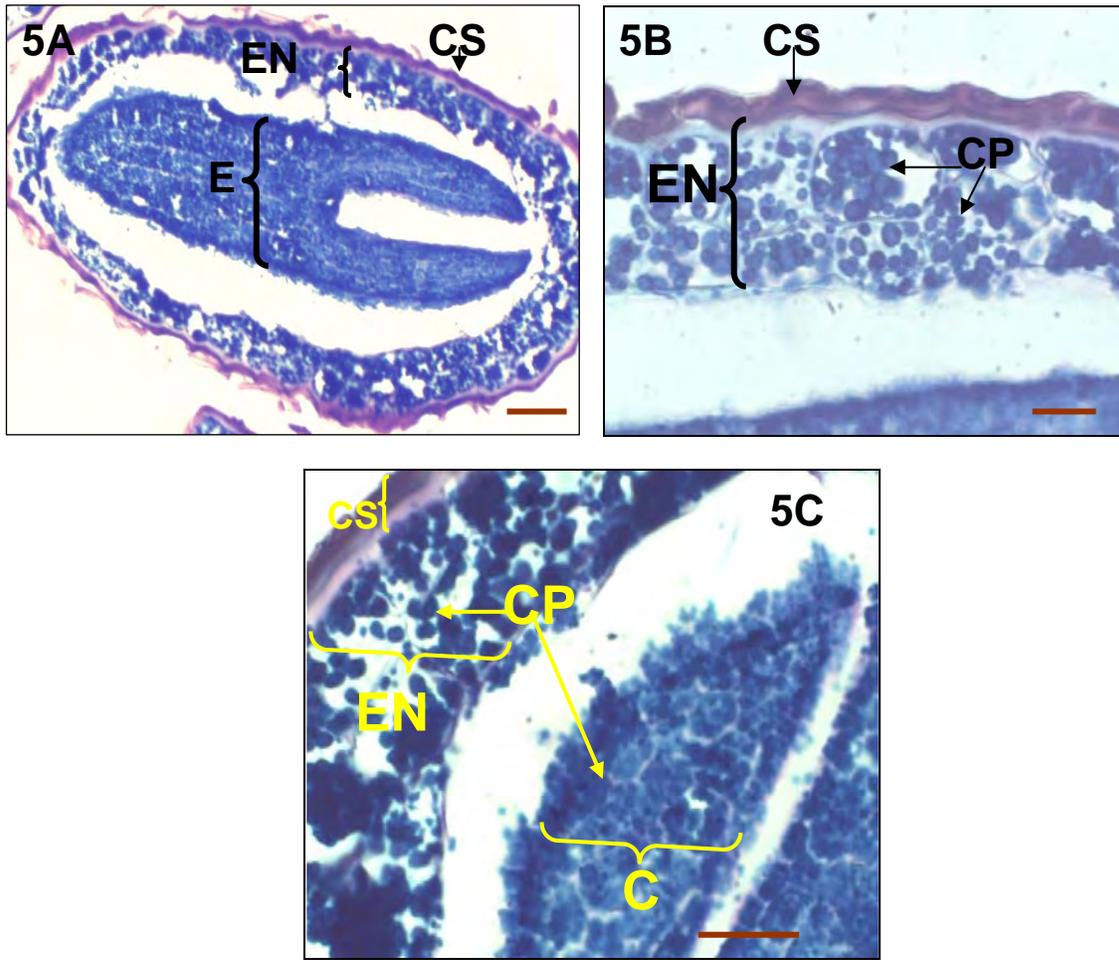
**Fig. 4** Semilla enterrada en la REPSA de *W. urens*. Corte transversal mostrando embrión (E), endospermo (EN), los cuerpos protéicos (CP) (Tinción de azul negro de naftol-APS, aumento 20x). Escala 11  $\mu$ m.

### Presencia de cuerpos protéicos y detección de proteínas de reserva en las semillas *Buddleia cordata*.

*B. cordata* presenta una mayor capacidad germinativa en las semillas que fueron enterradas en un sitio claro del PECM, posiblemente debido a que en este sitio de enterramiento, las semillas se enfrentaron a importantes fluctuaciones de la temperatura y al estrés hídrico (González-Zertuche, 2005). El osmocondicionamiento natural promueve un incremento en la velocidad y en la sincronía de la germinación de las semillas *B. cordata* (González-Zertuche, 2005).

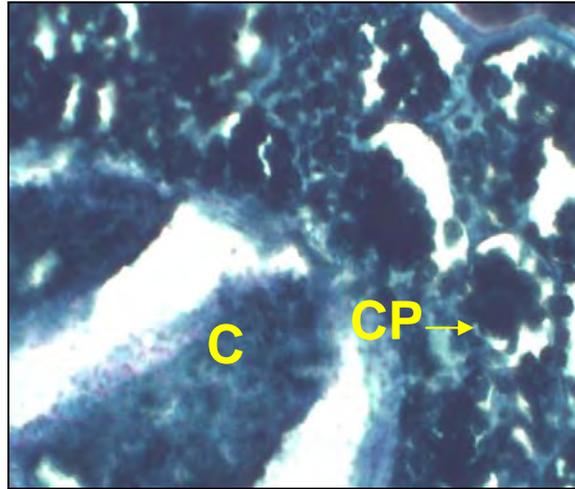
En la figura 5 se muestra el corte longitudinal y transversal de una semilla del lote control de *B. cordata*. Esta semilla presenta un embrión grande, con una cubierta seminal uniestratificada y tienen la presencia de dos capas de células del endospermo (Fig. 5A). Los cuerpos protéicos se observan tanto en las células embrionarias como en las del endospermo. En un acercamiento se pueden observar una gran cantidad de cuerpos protéicos en las células del endospermo los cuales están teñidos de azul. (Fig. 5B). También se muestra el corte transversal de una semilla del control de *B. cordata* en la cual se pueden observar los dos cotiledones, el endospermo y la cubierta seminal. En las células del

endospermo y de los cotiledones se observan los cuerpos protéicos bien definidos (Fig. 5C).



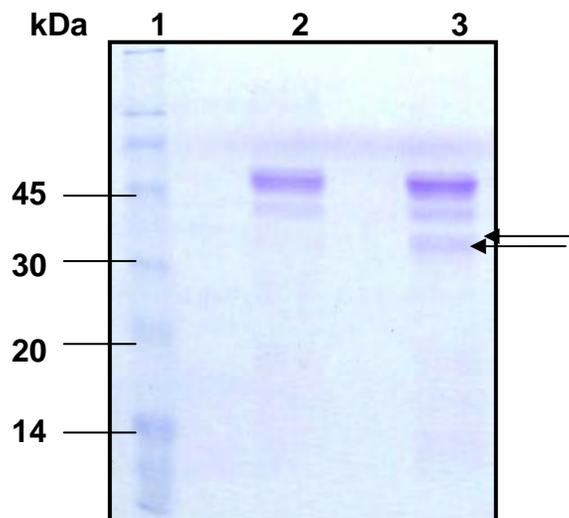
**Fig. 5** Semilla control de *B. cordata*. (5A) Corte longitudinal mostrando embrión (E), endospermo (EN) y cubierta seminal (CS) (Tinción de azul negro de naftol-APS, aumento 20x). Escala 14  $\mu$ m (5B) Corte longitudinal mostrando los cuerpos protéicos (CP) de las células del endospermo (EN) (Tinción de azul negro de naftol-APS, aumento 40x).Escala 7.5  $\mu$ m (5C) Corte transversal mostrando cotiledones (C), endospermo (EN), cubierta seminal (CS) y los cuerpos protéicos (CP) de las células del endospermo y de los cotiledones (Tinción de azul negro de naftol-APS, aumento 40x). Escala 13  $\mu$ m.

En la figura 6 se muestra un corte transversal de una semilla enterrada en un sitio claro del PECM de *B. cordata*. Se puede observar uno de los cotiledones y el endospermo. En las células del endospermo se observan los cuerpos protéicos similares a los observados en las semillas control. Tanto en la anatomía y en la presencia de cuerpos protéicos no hay diferencias entre las semillas del lote control y las enterradas en un sitio claro del PECM.



**Fig. 6** Semilla enterrada en un sitio claro del PECM de *B. cordata*. Corte transversal mostrando cotiledones (C), los cuerpos protéicos (CP) en las células del endospermo (Tinción de azul negro de naftol-APS, aumento 40x).

En la figura 7 se muestran los patrones protéicos de las semillas control (carril 2) y de las enterradas del PECM (carril 3) en un gel desnaturizante (SDS-PAGE) al 12% de Acrilamida. Se observa la diferencia entre los dos patrones protéicos; la muestra de semillas enterradas presenta dos bandas de aproximadamente 31 y 32 kDa en no se observan en las semillas control.



**Fig. 7** Efecto del natural priming sobre la movilización de las proteínas de reserva en las semillas de *Buddleia cordata*. Gel de acrilamida al 12 % (SDS-PAGE, tinción con Azul de Coomassie). (1) Peso Molecular. (2) Control. (3) Semillas enterradas en un sitio claro del PECM.

### Identificación de las proteínas de reserva en *Buddleia cordata*.

Las dos bandas de 31 y 32 Kda se identificaron como 11S globulinas por medio de un análisis de MALDITOF como se muestra en la figura 6.

Se identificaron 9 péptidos de la banda de 31 kDa que corresponden al 20% de la 11S globulina de *Sesamum indicum* (Tabla 1A). Los diez péptidos correspondientes a la banda de 32 Kda corresponden al 11% de la isoforma 4 de la 11S globulina de *S. indicum* (Tabla 1B).

**Tabla 1.** Secuencias de aminoácidos de dos proteínas de reserva tipo 11S globulina (1A) Pépticos obtenidos (aminoácidos en azul) a partir de la identificación por MALDITOF de la banda de 31 kDa de la Figura 3. (1B) Pépticos obtenidos (aminoácidos en azul) a partir de la identificación por MALDITOF de la banda de 32 kDa de la Figura 3.

**1A. 11S globulina isoforma 4 (*Sesamum indicum*, Q2XSW6)**

MAKLFLLSLLT FLLLFSLSFA LRGSTWQQGQ CRISRINAQE PTRRIQAEQG VSEFWDHNSD  
 EFQCAGVSIH RHRLQARALM LPAYHNAPIL AYVQQGRGMY GVMISGCPET FESSQQQFEE  
 GRGAQRFRDR HQKIGQFREG DILAFPAGAA HWAYNNGDQE LVIVVLQDNA NNANQLDPNP  
**RSFFLAGNPA GRGQEQQEYA PQLGRKRQGH QFGNVFRGFD VQILSEVFGV DEQAARSLQG**  
 ENDERGHIIIT VARGLQVISP PLQREEYGRQ EEPYGRRD NGLEETICSA **KLRENIDKPS**  
**RADIYNPRAG** RFSTINSLTL PILSFLQLSA ARGVLYRNGI MAPHWCVNAH SVIYVTRGES  
 DMQIVSHNGQ AVFDGRVREG **QVVVVVQNFV VVKRAGEQGC** EWVEFNTNDN ALINTLSGRG  
 SALRGLPADV IANAYQISRE EAQRLKYSRR ETMMFSGSFR SSRERVASA

**2B. 11S globulina (*Sesamum indicum*, AAK15087)**

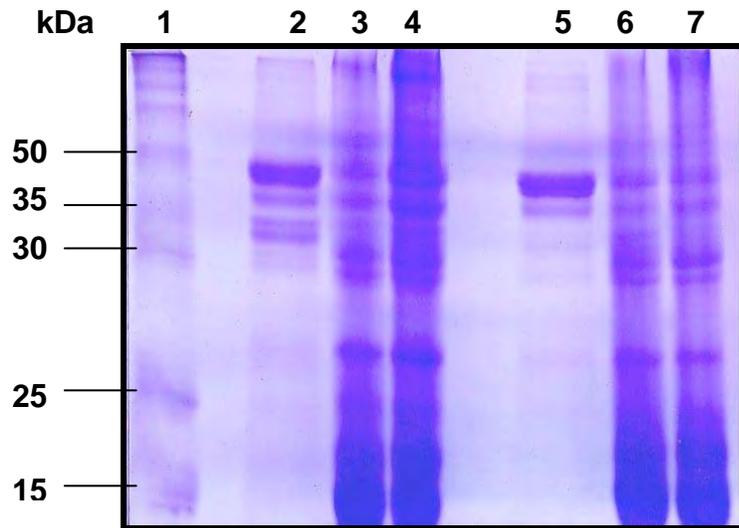
MAKLFLLSLLT IVVTLIRLIRGL SAQLAGEQDF YWQDLQSQQQ HKLQARTDCR **VERLTAQEPT**  
**IRFESEAGLT** EFWD**RNNQQF** **ECAGVAAVRN** **VIQPRGLLLP** **HYNNAPQLLY** **VVRGRGIQGT**  
 VIPGCAETFE RDTQPRQDRR RRFMDRHQKV RQFRQGDILA LPAGLTLWFY NNGGEPLITV  
 ALLDTGNAAN QLDQTFRHFF LAGNPQGGRQ SYFGRPQTEK QQGETKNIFN GFDDEILADA  
 FGVDVQTARR LKGQDDLGR IVRAERLDIV LPGEEEEERW ERDPYSGANG LEETLCTAKL  
 RENLDEPARA DVYNPHGGRI SSLNSLTLTPV LSWLRLSAEK GVLRYRNLVA PHWNLNHAHSI  
 IYITRSGSRF QVVGHTGRSV FDGVV**REGQL** **IIVPQNYVVA** **KRASQDEGLE** **WISFKTNDNA**  
**MTSQLAGRLS** AIRAMPEEVV MTAYQVSRDE ARRLKYNREE SRVFSSTSRV SWPRSSRPMS  
 YMPKPFYVVL DVIKSM

Estos resultados sugieren que el osmocondicionamiento natural promueve la movilización de las globulinas en semillas de *B. cordata*. Sin embargo, no se detectó la degradación de vicilinas como en las semillas enterradas de *W. urens* (Gamboa-deBuen *et al.*, 2006).

Se ha reportado que las semillas tratadas con osmocondicionamiento natural y que posteriormente germinaron a una temperatura alternante de 25 a 35° C, presentan una capacidad germinativa mayor que las que germinaron a una temperatura constante de 25° C. Esto es debido a que las temperaturas alternantes rompen con la latencia secundaria que fue impuesta durante el enterramiento (Gonzalez-Zertuche, 2005). Para determinar si este aumento en la capacidad germinativa causado por la alternancia de temperaturas podría estar relacionada con la movilización de proteínas de reserva, se compararon los patrones de proteínas de la

fracción proteica obtenida a partir de semillas control y enterradas germinadas a 25°C y a una temperatura alternante de 25-35°C.

En la figura 8 se muestra el patrón de las diferentes fracciones proteicas obtenidas a partir de las semillas control y de las enterradas en un sitio claro de bosque sin germinar, así como el de las semillas control y las enterradas en un sitio claro de bosque incubadas en dos condiciones de temperatura diferentes cada una: a temperatura constante (25° C) y a temperatura alternante (25-35° C). Se observa que el patrón de proteínas de las semillas germinadas a una temperatura constante (carriles 3 y 6) es igual al patrón de proteínas de las semillas germinadas a una temperatura alternante (carriles 4 y 7). Sin embargo se observan diferencias del patrón de la fracción de proteínas de las semillas enterradas en un sitio claro de bosque y las control ambas sin germinar (carriles 2 y 5, respectivamente) con respecto a las que fueron germinadas a una temperatura constante y una temperatura alternante. Así que para el caso de esta fracción de proteínas la temperatura a la cual se germinan las semillas no afecta dicho patrón, por lo que la movilización de las proteínas de reserva no está involucrada en el aumento de la capacidad germinativa que se observa en las semillas germinadas a una temperatura alternante de 25-35°C. Al igual que *W. urens*, las semillas germinadas de *B. cordata* presentan diferencias en el patrón de proteínas de las semillas con osmocondicionamiento natural no germinadas y el patrón de proteínas de las semillas germinadas a diferentes temperaturas.

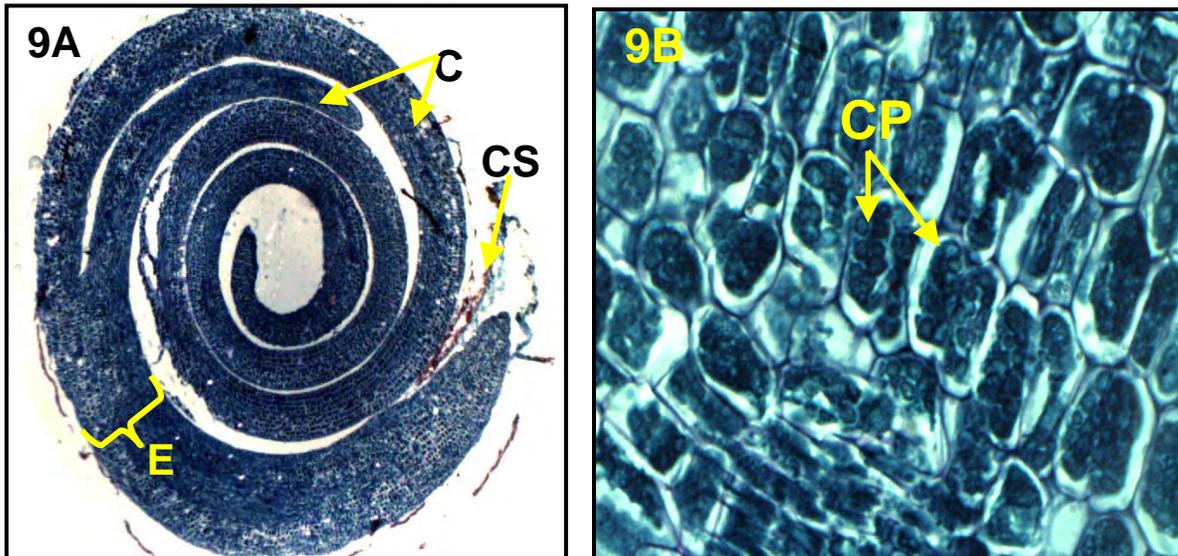


**Fig. 8** Efecto del natural priming sobre la movilización de las proteínas de reserva en las semillas de *B. cordata* sin germinar y semillas incubadas durante 48 horas en dos condiciones diferentes de temperatura. Gel de acrilamida al 12 % (tinción con Azul de Coomassie). (1) Peso Molecular. (2) Semillas sin germinar enterradas en un sitio claro de bosque. (3) Semillas enterradas en un sitio claro de bosque germinadas a 25° C. (4) Semillas enterradas en un sitio claro de bosque germinadas de 25-35° C. (5) Semillas control sin germinar. (6) Semillas control germinadas a 25° C. (7) Semillas control germinadas de 25-35° C.

### Presencia de cuerpos protéicos y detección de proteínas de reserva en las semillas de *Dodonaea viscosa*.

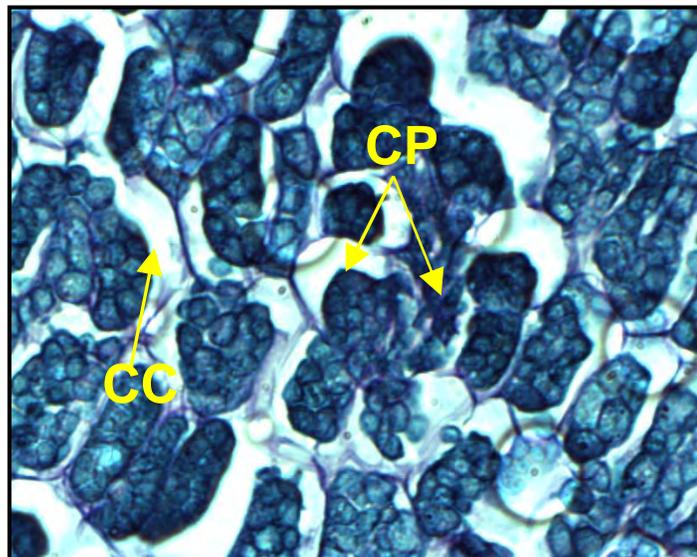
Otra planta importante de la reserva del pedregal que presenta respuestas positivas al acondicionamiento natural es *D. viscosa* (Benítez-Rodríguez, 2005).

En la figura 9 se muestra el corte transversal de una semilla control de *D. viscosa*, en donde se observa un embrión grande con dos cotiledones, los cuales se enrollan de la periferia al centro de la semilla. Se observa el endospermo casi consumido (Fig. 9A). Los cuerpos protéicos se observan en las células del embrión. En un acercamiento se pueden observar una gran cantidad de cuerpos protéicos en las células de los cotiledones los cuales están teñidos de azul (Fig. 9B).



**Fig. 9** Semilla control de *D. viscosa*. (8A) Corte trnasversal mostrando embrión (E), cotiledones (C) y fragmentos de la cubierta seminal (CS) (Tinción de azul negro de naftol-APS, aumento 20x). (8B) Corte longitudinal mostrando los cuerpos protéicos (CP) de las células de uno de los cotiledones (Tinción de azul negro de naftol-APS, aumento 40x)

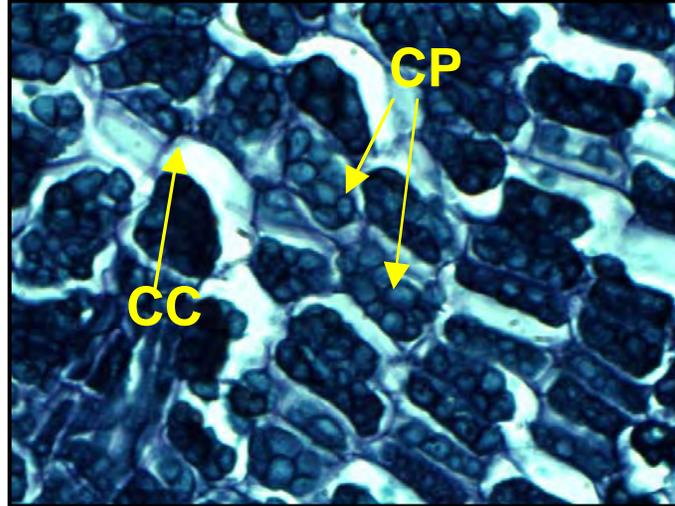
En la figura 10 se muestra un corte transversal de una semilla de *D. viscosa* enterrada en un sitio cerrado del PECM. En un acercamiento a las células de uno de los cotiledones se observan los cuerpos protéicos similares a los observados en las semillas control.



**Fig. 10** Semilla enterrada en un sitio cerrado del PECM de *D. viscosa*. Corte transversal mostrando células de cotiledones (CC) y los cuerpos protéicos (CP) en las células de los cotiledones (Tinción de azul negro de naftol-APS, aumento 40x).

En la figura 11 se muestra un corte transversal de una semilla de *D. viscosa* enterrada en un sitio claro del PECM. En un acercamiento a las

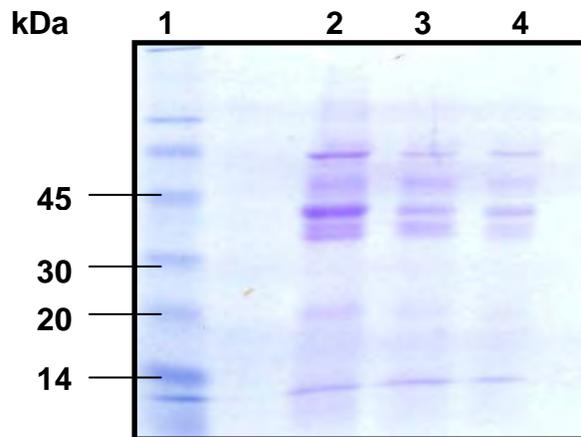
células de uno de los cotiledones se observan los cuerpos protéicos similares a los observados en las semillas control.



**Fig. 11** Semilla enterrada en un sitio claro del PECM de *D. viscosa*. Corte transversal mostrando células de cotiledones (CC), los cuerpos protéicos (CP) en las células de uno de los cotiledones (Tinción de azul negro de naftol-APS, aumento 40x).

En la figura 12 se muestran los patrones protéicos obtenidos a partir de las semillas de *D. viscosa* tanto del control como de las enterradas en un sitio claro en el bosque. El patrón de proteínas de las semillas control (carril 2) y de las enterradas escarificadas y no escarificadas (carriles 3 y 4 respectivamente) es el mismo.

Una parte de las semillas de esta especie fueron escarificadas antes de ser enterradas, esperando así que la escarificación modificara su permeabilidad al agua y con ello hubiera cambios metabólicos debidos a la absorción de la misma, pero este tratamiento tampoco influyo en el cambio del patrón de esta fracción proteica.

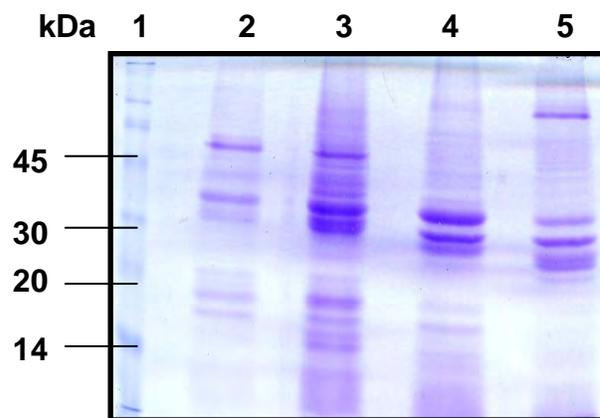


**Fig. 12** Efecto del natural priming sobre la movilización de las proteínas de reserva en las semillas de *D. viscosa*. Gel de acrilamida al 12 % (tinción con Azul de Coomassie). (1) Peso Molecular. (2) Control. (3) Semillas no escarificadas enterradas en un sitio claro del PECM. (4) Semillas escarificadas enterradas en un sitio claro del PECM. (10  $\mu$ L de cada muestra).

Con el fin de saber si en los eventos tempranos de germinación el patrón de esta fracción proteica se modifica, se realizó el aislamiento de la fracción proteica de semillas control, semillas escarificadas enterradas en un sitio claro de bosque sin germinar, semillas escarificadas que al momento de desenterrarlas tenían un aumento en volumen con respecto al control; considerando que este aumento en volumen indica que las semillas experimentaron una imbibición de agua y presentan procesos tempranos de germinación; y semillas escarificadas enterradas en un sitio claro de Bosque que al momento de desenterrarlas presentaron radícula.

El patrón proteico de las semillas control y el de las semillas escarificadas enterradas en un sitio claro de bosque y de las semillas germinadas derivadas de ambas condiciones se muestra en la figura 13. El patrón de la fracción proteica de las semillas que tuvieron un incremento de volumen con respecto al control (carril 4) y de las que presentaron radícula al momento de desenterrarlas es diferente de las semillas control (carril 2) y enterradas sin germinar (carril 3), observando la ausencia de la banda con un peso aproximado de 46 kDa para el caso del patrón de la fracción proteica de las semillas con un incremento de volumen y de las semillas germinadas (carril 4 y 5,

respectivamente), así como la presencia de una banda con un peso molecular mayor a 45 kDa y la ausencia de dos bandas de peso molecular menor a 20 kDa en el patrón de la fracción proteica de las semillas con radícula (carril 5). En esta planta el patrón de la fracción de proteínas fosforiladas no tiene diferencias en las semillas enterradas que no presentan una imbibición visible (aumento de volumen) con respecto al control, aunque en semillas que presentaron un aumento de volumen con respecto al control si se pudo observar una movilización de las proteínas de reserva, así como en las semillas que presentaron radícula.

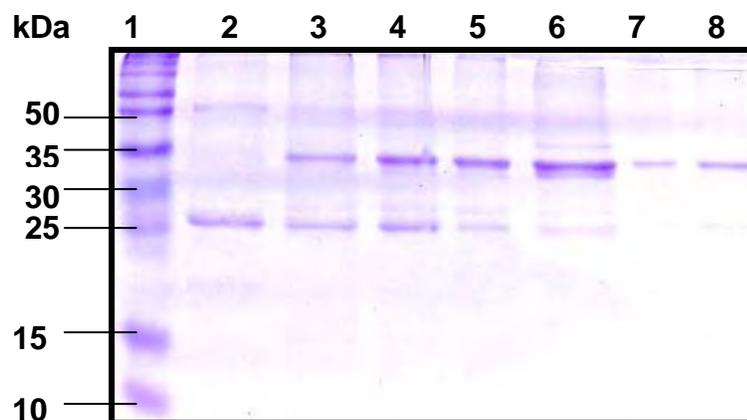


**Fig. 13** Efecto del natural priming en la movilización de proteínas de reserva en la germinación temprana de *D. viscosa* Gel de acrilamida al 12 % (tinción con Azul de Coomassie). (1) Peso Molecular. (2) Control. (3) Semillas escarificadas sin germinar enterradas en un sitio claro del PECM. (4) Semillas escarificadas con aumento de volumen con respecto al control. (5) Semillas escarificadas germinadas enterradas en un sitio claro del PECM.

### **Detección de proteínas de reserva en las semillas de *Opuntia tomentosa***

En la figura 14 se observa el patrón de las diferentes fracciones proteicas obtenidas a partir de los embriones de las semillas control y las enterradas en un sitio abierto y cerrado de bosque sin germinar y semillas germinadas durante 4 días en condiciones de campo y en condiciones controladas en el laboratorio. En las semillas enterradas tanto en el sitio abierto y cerrado del bosque que no fueron germinadas (carriles 3 y 4) tienen la presencia de una banda de aproximadamente 35 kDa con respecto a las semillas control (carril 2). Para el caso de las semillas germinadas durante 4 días, se observa que no hay diferencias entre el patrón proteico de las semillas control germinadas en el campo con respecto a las semillas control germinadas en laboratorio (carriles 5

y 6, respectivamente), y lo mismo ocurre con las semillas enterradas germinadas tanto en el campo como en el laboratorio (carriles 7 Y 8, respectivamente). Al comparar el patrón proteico de las semillas control y las semillas enterradas (carriles 5 y 7 respectivamente) que fueron germinadas en campo, se puede observar que la banda de 25 kDa no está presente en las semillas enterradas en un sitio abierto y si lo está en las semillas control. Para el caso del patrón proteico de las semillas control y las semillas enterradas en un sitio abierto (carriles 6 y 8 respectivamente) germinadas en el laboratorio, se puede observar que la banda de 25 kDa no está presente en las semillas enterradas en un sitio abierto y si está en las semillas control. Lo anterior indica que las semillas que fueron sometidas a osmocondicionamiento natural presentan movilización de proteínas de reservas cuando son germinadas, ya sea en condiciones de campo o de laboratorio, lo que no ocurre en las semillas que no fueron tratadas con osmocondicionamiento natural (semillas control) y que fueron germinadas.



**Fig. 14** Efecto del osmocondicionamiento natural sobre la movilización de las proteínas de reserva en las semillas sin germinar y semillas con 4 días de germinación de *Opuntia tomentosa* Gel de acrilamida al 12 % teñido con Azul de Coomassie. (1) Peso molecular (2) Control (3) Enterrado en abierto (4) Enterrado en sitio cerrado (5) Control con 4 días de germinación en campo (6) Control con 4 días de germinación en laboratorio (7) Enterrado en sitio abierto con 4 días de germinación en campo (8) Enterrado en sitio abierto con 4 días de germinación en laboratorio.

### Identificación de las proteínas de reserva en *Opuntia tomentosa*.

De la banda de 35Kda se identificaron por medio de un análisis de MALDITOF 4 péptidos correspondientes al 44% de la 12S cruciferina (proteína de reserva) de *Arabidopsis thaliana* (Tabla 2A), 6 péptidos

correspondientes al 24% de la 2S CRA1 (proteína de reserva) de *A. thaliana* (Tabla 2B), y 4 péptidos correspondientes al 11% de una proteína LEA del grupo 3 de *A. thaliana* (Tabla 2C).

**Tabla 2.** Secuencias de aminoácidos. Péptidos obtenidos (aminoácidos en azul) a partir de la identificación por MALDITOF de la banda de 25 kDa de la Figura 15. (2A) 12S cruciferina, proteína de reserva de *A. thaliana*. (2B) 12S CRA1, proteína de reserva de *A. thaliana*. (2C) Proteína LEA del grupo 3 de *A. thaliana*.

### 2A. 12S cruciferina proteína de reserva (*A. thaliana*, Q96318)

MVKLSNLLVA TFGVLLVLNG CLARQSLGVP PQLQNECNLD NLDVLQATET IKSEAGQIEY  
 WDHNHQPQLRC **VGVSVARYVI** **EQGGLYLPTF** **FTSPKISYVV** **QGTGISGRVV** **PGCAETFMD**  
**QPMQGGQQGQ** **PWQGRQGGQ** **QPWEGQGGQ** **QQGRQGQPWE** **GQGQQGQQGR** **QGQQGQPWEG**  
**QGQQGQQGFR** DMHQKVEHVR RGDVFANTPG SAHWIYNSGE QPLVIALLD IANYQNQLDR  
 NPR**VFHLAGN** **NQQGGFGGSQ** **QQEQK**NLWS GFDAQVIAQA **LKIDVQLAQQ** **LQNQQDSRGN**  
 IVRVKPFPV VRRPLRQPYE SEEWRHPRSP QNGLEETIC SMR**SHENIDD** **PARADVYKPS**  
 LGR**VTSVNSY** **TLPILEYVRL** SATRGVLQGN AMVLPKYNMN ANEILYCTGG QGR**IQVVNDN**  
**GQNVLDQQVQ** **KGQLVVIPQG** **FAYVVQSHGN** **KFEWISFKTN** **ENAMISTLAG** **RTSLLRALPL**  
 EVISNGFQIS PEEARKIKFN TLETTLTRAA GRQQQLIEE IVEA

### 2B. 12S CRA1, proteína de reserva (*A. thaliana*, P15455)

MARVSSLLSF CLTLLILFHG YAAQQGQQGQ QFPNECQLDQ LNALEPSHVL KSEAGRIEVW  
 DHHAPQLRCS GVSFARYLIE SKGLYLPSSF NTAKLSFVAK GRGLMGK**VIP** **GCAETFQDSS**  
**EFQPR**FEGQG QSQRFRDMHQ KVEHIRSGDT IATTPGVAQW FYNDGQEPLV IVSVFDLASH  
 QNQLDRNRP FYLAGNPNPQG QVWLQGREQQ POKNIFNGFG PEVIAQALK**I** **DLQTAQQLQN**  
**QDDNRGNIVR** VQGPFGVIRP PLRGQRPQEE EEEGRHGRH GNGLEETICS ARCTDNLDDP  
 SRADVYKPOL GYISTLNSYD LPILRFIRLS ALRGSIRQNA MVLQPWNANA NAILYVTDGE  
 AQIQIVNDNG NRVFDGQVSQ GQLIAVPQGF SVVKRATSNR FQWVEFK**TNA** **NAQINTLAGR**  
 TSVLR**GLPLE** **VITNGFQISP** **EEARRVKFNT** **LETTLTHSSG** **PASYGRPRVA** AA

### 2C. Proteína LEA del grupo 3 (*A. thaliana*, Q96246)

MASDKQKAER AEVAARLAAE DLHDINKSGG ADVTMYKVTE RTEHPPEQD RPGVIGSVFR  
 AVQGTYEHR DAVVGKTHEA AESTKEGAQI ASEKAVGAKD ATVEKAKETA DYTAEK**VGEY**  
**KDYTVDKAKE** AKDTTAEKAK ETANYTADKA VEAKDKTAEK IGEYKDYAVD KAVEAKDKTA  
 EKAKETSNTY ADKAKEAKDK TAEK**VGEYKD** **YTVDKAVEAR** DYTAEKAIEA **KDKTAEKTGE**  
**YKDYTV**EKAT EGKDVTVSKL **GELKDSAVET** **AKRAMGFLSG** KTEEAKGKAV ETKDTAKENM  
 EKAGEVTRQK MEEMLREGKE LKEEAGAKAQ EASQKTREST ESGAQKAEET KDSPAVRGNE  
 AKGTIFGALG NVTEAIAKSKL TMPSDIVEET RAAREHGGTG RTVVEVKVED SKPGKVATSL  
 KASDQMTGQT FNDVGRMDDD ARKDKGKL

La banda de 25 kDa corresponde a una 11 S globulina pero sólo se identificó un péptido. Es posible que las proteínas de *O. tomentosa* presenten poca similitud con las proteínas que se encuentran reportadas en las bases de datos actuales, ya que la identificación de las proteínas de *O. tomentosa* ha sido muy limitada.

Este tratamiento también promueve la movilización y degradación de las sustancias de reserva; en el caso de las semillas de *W. urens* presentaron una movilización de las proteínas de reserva y de sacarosa

como respuesta al enterramiento (González-Zertuche *et al.*, 2001 y Gamboa-deBuen *et al.*, 2006).

La movilización de las sustancias de reservas (proteínas, lípidos y carbohidratos), es un proceso metabólico que tiene lugar en las primeras fases de la germinación de la mayoría de las plantas. Este proceso es importante porque aporta energía y los compuestos necesarios para el establecimiento de la plántula. La movilización y degradación de las proteínas de reserva tiene la función de proveer al embrión de aminoácidos libres que le servirán para poder sintetizar nuevas proteínas. Estas proteínas intervienen en los procesos metabólicos que ocurren durante la germinación, como son la elongación del meristemo radicular, reparación de las membranas celulares, formación de nuevos tejidos, entre otros.

La presencia de globulinas en la fracción proteica soluble de las semillas enterradas de *B. cordata* y de *O. tomentosa* indica la solubilización de las proteínas de reserva incluidas en los cuerpos protéicos presentes en el embrión (Figuras 7 y 14 respectivamente). No se determinó la degradación de vicilinas, proteínas de reserva solubles, en estas semillas a diferencia de lo reportado para *W. urens* (Gamboa-deBuen *et al.*, 2006). Esta movilización, resultado del osmocondicionamiento natural, podría jugar un papel importante en la promoción de la sincronía y el aumento en la velocidad de la germinación, así como en el establecimiento de la plántula.

Las semillas de *D. viscosa* presentan una latencia física, impidiendo la entrada de agua, por lo tanto, la activación del metabolismo para iniciar la germinación. En las semillas con aumento en el volumen durante el enterramiento y que por lo tanto experimentaron permeabilidad al agua se observa un patrón de proteínas diferente al de las semillas control (figura 13). Una banda de 47 kDa aproximadamente, presente en las semillas control y enterradas sin imbibir, no se detecta en las semillas con aumento de volumen con respecto al control y las que presentaron

radícula al momento de desenterrarlas. Es posible que esta banda corresponda a una proteína de reserva.

El osmocondicionamiento natural refleja las condiciones a las que se enfrentan las semillas durante su permanencia en el suelo. Las semillas de las diferentes plantas deben presentar una serie de cambios metabólicos, generales y específicos, como resultado de las señales que perciben del suelo que les permiten tener una mayor eficiencia en el proceso de germinación y en el establecimiento de la plántula. La movilización de las proteínas de reserva durante el enterramiento descrita para semillas con latencia física (*D. viscosa*), latencia fisiológica (*O. tomentosa*) y sin latencia (*B. cordata*) sugiere que es un proceso general resultado de los cambios hídricos en el suelo que va a conferir a las diferentes especies ventajas, optimizando la germinación y el establecimiento de la plántula.

## CONCLUSIONES.

- Los resultados confirman, desde un punto de vista bioquímico, que el osmocondicionamiento natural es una herramienta importante para optimizar la germinación y el establecimiento de las plántulas de especies nativas usadas en restauración del Pedregal de San Ángel y del Ajusco.
- La movilización de las proteínas de reserva, resultado del osmocondicionamiento natural podría jugar un papel importante en la promoción de la sincronía y el aumento en la velocidad de la germinación, así como en el establecimiento de las plántulas de las especies estudiadas de la REPSA y del PECM.
- Las semillas de las diferentes especies, independientemente del tipo de latencia que presentan, presentaron una serie de cambios metabólicos, generales y específicos, como resultado de las señales que perciben del suelo que les permiten tener una mayor eficiencia en el proceso de germinación y en el establecimiento de la plántula.

## Referencias.

- Aguilera-Jiménez P. 2003. Efecto del endurecimiento de las semillas de *Buddleia cordata* H. B. K. en las etapas iniciales de su ciclo de vida. Tesis de Licenciatura. Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Armenta-Jaime S. 2007. Efecto del osmocondicionamiento natural en la movilización de carbohidratos en la germinación de las semillas de *Dodoneae viscosa*: papel de las invertasas ácidas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F. y Côme, D. 1996. Changes in melondialdehyde content and in peroxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiology Plant* 97: 104-110
- Baskin, C. C. y Baskin, J. M. 1998. *Seed Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. USA. Academic Press.
- Baskin, J. M. y Baskin, C. C. 2004. A Classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 10:409-413.
- Baskin, J. M. y Baskin, C. C. Y Li, X. 2000. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seed. *Plant Species Biology*, 15:139-152
- Benitez-Robriguez, J. L. 2005. Estudio ecofisiológico de la germinación y crecimiento de *Dodoneae viscosa* (L.) Jacq. Con fines de restauración en zonas perturbadas del Valle de México. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bethke, P. C., Swanson, S. J, Hillmer, S., Jones, R.L. 1998. From storage compartment to lytic organelle: the metamorphosis of the aleurone protein storage vacuole. *Annals of Botany* 82: 399-412.
- Bewley, J. D. 1982. Protein and nucleic acid synthesis during seed germination and early seedling growth. En: Boutler, D., Parthier, B., editors. *Nucleic and proteins in plant*. Encyclopedia of plant physiology, New series (Pirson, A., Zimmermann, M. H., editors, Vol. 14A. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.

- Bewley, D. J., y Black, M. 1982. Physiology and Biochemistry of SeEds in Relation to Germination. 2. Viability, Dormancy and Environmental Control. Berlin: Springer-Verlag.
- Bewley, D. J. y Black, M. 1985. Seed: Physiology of development and germination. U.S.A., New York: Plenum Press.
- Bewley, D. J. y Black, M. 1994. Seed: Physiology of development and germination. 2ed. Plenum Press, New York.
- Bewley, D. J. 1997. Seed Germination and Dormancy. The Plant Cell 9: 1055-1066
- Blackman, S. A., Wettlaufer, S. H. Obendorf, R. L. Leopoldo, A. C. 1991. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. Plant Physiology 96: 225-230.
- Bradbeer, J. W. 1994. Seed Dormancy and Germination. Tertiary Level Biology Series. Blackie Academic and Professional Press, London.
- Bradford, K. J., Chen, F., Cooley, M. B., Dahal, P., Downie, B., Fukunaga, K. K., Gee, O. H., Gurusinghe, S., Mella, R. A., Nonogaki, H., 2000. Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. In M Black, K.J., Bradford, J. Vázquez-Ramos, (Eds.) Seed Biology: Advances and Applications. CABI International, Wallingford, UK, pp 231-251
- Bradshaw, A. D. 1987. Restoration: An acid test for ecology. En: W. R. Jordan III, M. E, Gilpin y J. D Aber (Eds.) Restoration ecology: A synthetic approach to ecological. Cambridge University Press. New York, N. Y.
- Bray, C. M. 1995. Biochemical processes during the osmopriming of seEds. In: Kigel J, Galili G (Eds.) Seed Development and Germination. M. Dekker, New York, pp 767-789
- Cabrera, G. L. 1995. Ecología comparativa de dos comunidades de aves en un bosque templado del Ajusco Medio. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cabrera, G. L., Mendoza, P. Peña, V., Bonfil, C., y Soberón, J. 1997. Evaluación en una plantación de encinos (*Quercus rugosa*) en el Ajusco Medio México, D. F. Agrociencia 32 (2): 149-156

- Camacho, M., Bustillo, O. O. y González, K. V. 1991. Potencial de Chapulixtle (*Dodoneae 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.
- Camacho-Salazar, J. G., Hernández, H. F., Pacheco-Chavez, S. F. 1993a. *Precipitación pluvial* 1963-1992. Boletín Meteorológico. Facultad de Filosofía y Letras, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Camacho-Salazar, J. G., Hernández, H. F., Pacheco-Chavez, S. F. 1993b. *Temperatura mínima* 1963-1992. Boletín Meteorológico. Facultad de Filosofía y Letras, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Camacho-Salazar, J. G., Hernández, H. F., Pacheco-Chavez, S. F. 1993c. *Temperatura máxima* 1963-1992. Boletín Meteorológico. Facultad de Filosofía y Letras, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Campos, A. F., Cruz, G. F., Torres, E. A., Sánchez, J. M., Colmero, F. J., Smitm, E. C., Covarrubias, R. A. y Vázquez, R. J. 2002. Expresión de genes codificantes para proteínas abundantes en embriogénesis tardía (LEA), durante el osmocondicionamiento de semillas de maíz y frijol. *Agrociencia* 36: 461-470
- Cano-Santana, Z. 1987. Ecología de la relación entre *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae) y sus herbívoros en el Pedregal de San Ángel, D.F. (México). Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Cano-Santana, Z. 1994. Flujo de energía a través de *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Acrididae) y productividad primaria neta aérea en una comunidad xerófito. Tesis Doctoral. Centro de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cano-Santana, Z. 1994. La reserva del Pedregal como Ecosistema: estructura trófica. En Rojo, A. (Eds.) Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel: Ecología, Historia Natural y Manejo, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cano-Santana, Z. y Meave, J. 1996. Sucesión primaria en derrames volcánicos: el caso del Xitle. *Ciencias* 41:58-68
- Castillo-Argüero, S., Montes-Cartas, G., Romero-Romero, M.A., Martínez-Orea. Y., Guadarrama-Chávez, P., Sánchez-Gallén, I. y

Núñez-Castillo, O. 2004. Dinámica y conservación de la flora del matorral xerófilo de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (D.F., México). Bol. Soc. Bot. México. 74:51-61.

- Cheung, C. P., Wu, J. y Suhadolnik, R. J. 1979. Dependence of protein synthesis on RNA synthesis during the early hours of germination of wheat embryos. Nature 277: 66-67
- Cruz-García, F., Jiménez, L. F. y Vázquez-Ramos, J.M., 1995. Biochemical and cytological studies on osmopriming maize seeds. Seed Science Research 5:15-23
- Davison, P. A. y Bray, C. M. 1991. Protein synthesis during osmopriming of leek (*Allium porrum* L.) seeds. Seed Science Research 5: 15-23
- Dell'Aquila, A. y Bewley, J. D. 1989. Protein synthesis in the axes of PEG treated pea seeds and during subsequent germination. Journal of Experimental Botany 2:75-80
- Dell'Aquila, A. y Spada. 1992. Regulation of protein synthesis in germination wheat embryos under PEG and salt stress. Seed Science Research 2:75-80
- *Diario Oficial de la Federación*: 28 de junio de 1989, México D. F.
- Elizalde-López, C. L. 1995. Estudio de la germinación y plantación de dos especies útiles en la recuperación de suelos: *Buddleia cordata* y *Nicotiana glauca*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ewel, J. J. 1987. Restoration is the ultimate test of ecological theory. En: W. R. Jordan III, M. E, Gilpin y J. D Aber, (Eds.) Restoration ecology: A synthetic approach to ecological. Cambridge University Press. New York, N. Y.
- Fenner, M. 1985. Seed Ecology. London: Chapman and Hall.
- Fu, J. R., Lu, X. H., Chen, R.Z., Zhang, B. Z., Liu, Z. S., Li Z. S., Cai. D. Y. 1988. Osmoconditioning of peanut (*Arachis hypogea*L.) seeds with PEG to improve vigour and some biochemical activities. Seed Science and Technology 16 (1): 197-212
- Gamboa-deBuen, A., Ortega, C. R., Baraja, M. E., Coronado, S. M. y Segovia, O. A. 2006. Natural priming as an important metabolic event in the life history of *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae) seEds. Physiologia Plantarum 128: 520-530

- García, E., 1964. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Primera edición, Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gómez-Pompa, A. y del Amo, S. (Eds.). 1985. Investigaciones sobre regeneración de selvas. Vol. II. Editorial Alambra. México, D. F.
- González-Espinosa, M., Quintana-Ascencio P. F., Ramírez-Marcial, N. y Gaytan-Guzmán, P. 1991. Secondary succession en disturbed *Pinus-Quercus* forest in the highlands of Chiapas, México. *Journal of vegetation Science* 2:351-360
- González-Kladiano, V y F. Camacho-Morfin 1994. Avances en la propagacion de cuatro especies presentes en el Pedregal de San Ángel D.F. En: Rojo, A. (Eds.) Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel: Ecología, Historia Natural y Manejo, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gonzalez-Zertuche, L., 2005. Tratamientos de endurecimiento en semillas de *Buddleia cordata* (Loganiaceae) y *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae), dos especies utiles para reforestar o restaurar áreas perturbadas. Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- González-Zertuche, L., Gamboa-de Buen A, Sánchez-Coronado E, Aguilera P y Orozco-Segovia, A. 2001. Natural Priming of *Wigandia urens* during burial: effects on germination, growth and protein expression. *Seed Sci. Res.* 11:27-34
- González-Zertuche, L., Baskin, C., Baskin, J. M., y Orozco-Segovia, A. 2002. Effects of priming on germination of *Buddleia cordata* ssp. *Cordata* (Loganiaceae) seeds and possible ecological significance. *Seed Science & Technology.* 30: 535-548.
- Groot, S. P. C., Kieliszewska-Rokicha, B., Vermeer, E., Karssen, C. M. 1988. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta* 174: 500-504
- Gurusinghe, S. Bradford, K. J. 2001. Galactosyl-sucrose oligosaccharides and potential longevity of primed seeds. *Seed Sci. Res.* 11: 121-133
- Henckel, P. A. 1982. Fisiología de las plantas al calor y a la sequía. Nauka, Moscú.

- Heydecker, W., Higgins, J. y Gulliver, R. L. 1973. Accelerated germination by osmotic seed treatment. *Nature* 246: 42-44
- Heydecker, W., y Coolbear, P. 1977. Seed treatments for improved performance-survey and attempted prognosis. *Seed Sci. Technol.* 5: 353-425
- Heywood, V. H., 1978. Flowering plants of the world. Oxford University Press. Oxford.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) 2000. Cuaderno estadístico delegacional. Tlalpan. D. F.
- Jordan, III, W. R., Gilpin, M. E. y Aber, J. D. (Eds.) 1987. Restoration ecology: a synthetic approach to ecological research. Cambridge University press. New York, N.Y.
- López, C. M., Guzmán, M. J. y Sánchez, M. G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Las prensas de ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Madison, J. T., Thompson, J. F. Muester, A. E. 1981. Turnover of storage protein in seed of soybean and pea. *Annals of Botany.* 47: 65-73.
- Meffe, G. K. y C. R. Carroll. (Eds.) 1994. Principles of Conservation Biology. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Meyer, N. E., 1973. The genus *Buddleia* in North America. En Bailey, L. H. [ed.], Hortirium of The New York, 47-103 pp., College of Agriculture and Life Science, University Ithaca, New York
- Morfin, C. D., Nahed, T. J., Soto, P. L., Jiménez, F. G., Ochoa, G. S. y Grande D. C. 1995. Evaluación del potencial forrajero del género *Buddleia* en la región de los Altos de Chiapas. Colegio de la Frontera Sur, Chiapas, México.
- Müntz, K. 1998. Deposition of storage proteins. *Plant Molecular Biology* 28: 77-79
- Müntz, K., Belozersky, M. A., Dunaevsky, Y. E., Schlereth, A. y Tiedemann, J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in sedes during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany* 52 (362): 1741-1752

- Negrete, Y. A. y Soberón, J. 1994. Los mamíferos silvestres de la Reserva Ecológica del pedregal. En: Rojo (Comp) Reserva Ecológica El Pedregal de San Angel: Ecología, Historia Natural y Manejo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ochoa G., S. 1985. Hydrophyllaceae. En: Rzedowski, J. y G. C. Rzedowski (Eds.). En: Flora fanerogámica del Valle de México. Vol. II. Instituto de Ecología. México. pp. 262-267.
- Olvera-Carrillo, Y. 2001. Estudio Ecofisiológico de la germinación, sobrevivencia y crecimiento de *Otuntia tomentosa* S. D. en la Reserva del Pedregal de San Ángel. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Palma, J .M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Romero-Peurtas, M. C., McCarthy, I., del Río, L.A. 2002. Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes.-Plant Physiol. Biochem. 40: 521-530.
- Panti-Madero, M. A. 1984. Contribución al conocimiento del Pedregal de San Ángel sobre el problema de su flora y su conservación. Tesis de Licenciatura, Facultad de ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Parker, T.V. y S.T. Pickett. 1997. Restoration as an ecosystem process: implications of the modern ecological paradigm. En: Urbanska, K. M., Wobb, N. R. y Edwards, P.J. (Eds.) Restoration Ecology and Sustainable development. Cambridge University Press. U.K.
- Pennington, T. D. y Sarukhan, J. 1968. Árboles Tropicales de México. 1968. United Nations/FAO. 413 p. Card Number 68-57357
- Plata-Álvarez, M. A. 2002. Estudio ecofisiológico de la germinación de dos especies arbustivas del Pedregal de San Ángel *Dodoneae viscosa* (L.) Jacq. (Sapindaceae) y *Senna multiglandulosa* (Jacq.) Irwin & Barnaby (Caesalpinaceae). Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pozos-Hernández, B. A. 1991. Relaciones hídricas internas en *Senecio praecox* D.C. y *Buddleia cordata* H.B.K. de la Reserva del Pedregal de San Ángel. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Quinlivan, B. J. 1971. Seed coat impermeability in legumes. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Sciences*, 37: 283-295.
- Ramírez-Sóstenes, J. L. 2008. Alteraciones en el metabolismo de carbon durante priming natural de semillas de *Opuntia tomentosa*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. Universidad Autónoma Nacional de México.
- Rojo, A. (comp). 1994. Reserva Ecológica El Pedregal de San Angel: Ecología, Historia Natural y Manejo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rojo, A. y Rodríguez J. 2002. La flora del Pedregal de San Ángel. SEMARNAT, Instituto Nacional de Ecología. México, D. F.
- Rzedowski, J. 1954. Vegetación del pedregal de San Ángel. *Anales. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, (13): 59-122.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México.
- Rzedowski, J. 1994. Vegetacion del Pedregal de San Angel(Distrito Federal, México). En: A. Rojo (Comp) Reserva Ecológica El Pedregal de San Ángel: Ecología, Historia Natural y Manejo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rzedowski, J. y G. Rzedowski, 1985. Flora fanerogámica del Valle de México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México
- Sánchez, A. J., Orta, R. y Muñoz, C. B., 2001. Tratamientos Pregerminativos de hidratación-deshidratación de las semillas y sus efectos en las planta de interés agrícola. *Agronomía Costarricense* 25(1): 67-92
- Sánchez, A. M. I., 1978. La comunidad "el capulin" como parte del problema de la Sierra del Ajusco, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sánchez, S. O., 1976. La flora del valle México. Herrero, S.A. México. D. F.
- Scheinvar, L., 1982. La familia de las cactáceas en el Valle de México. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Shewry, R. P. 2000. Seed proteins. En: Blank, M. y Bewley, D. J. (Eds). Technology and its biological basis. Academic Press U. S. A. pp 43-77
- Shutov, A. D., Bäumlein, H., Blather, F. R. y Müntz K. 2003. Storage and mobilization as antagonistic functional constraints on seed storage globulin evolution. *Journal of Experimental Botany* 54 (388):1645-1654
- Smith, P. T. y Cobb, B.G. 1991. Physiological and enzymatic activity of pepper seeds (*Capsicum annum* L.) during priming. *Physiologia Plantarum* 82: 433-439
- Soberon, J., de la Maza, R., Hernández, A., Bonfil, C., Careaga, S. 1991. Informe técnico del primer año del proyecto "Restauración Ecológica de Lomas del Seminario". *Centro de Ecología, UNAM y Coordinación General de Reordenamiento Urbana y Ecologica-DDF México.*
- Spencer, D. y Boulter, D. 1984. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 304 (1120): 275-285.
- Stephen, G. R. y Arias, J. E. 2003. El nopal (*Opuntia ssp*) como forraje. En estudio FAO producción y protección vegetal 169 ISSN 1014-1227 ISBN 92-5-304705-4. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.
- Sung, J. M. y Chang, Y. H. 1993. Biochemical activities associated with priming of sweet corn seeds to improve vigor. *Seed Sci. Technol.* 21: 97-105.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology. Segunda Edición.* Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. USA.
- Takaki, M., Kendrick, R. E. y Dietrich, S. M. 1981. Interaction of light and temperature on the germination of *Rumex obtusifolius* L. *Planta* 152: 209-214
- Thompson, K., Grimer, J. P. y Mason, G. 1997. Seed Germination in response to diurnal fluctuations of temperature. *Nature* 67: 147-149.
- Vázquez-Yanes, C. 1999. Ecología de las semillas y su relación con la conservación. En: Orellana, R., Escamillas, J. A. y Larqué-

Saavedra, A. (Eds.) *Ecofisiología Vegetal de la Conservación de los Recursos Genéticos*, pp. 51-57. México. CICY. 222 pp.

- Vázquez-Yanes, C. y A. Orozco-Segovia 1990. Ecological significance of light controlled seed germination in two contrasting tropical habitats. *Oecologia* 83: 171-175
- Vázquez-Yanes, C., Orozco-Segovia, A., Rojas-Aréchiga, M., Sánchez-Coronado, M. E., y Cervantes, V. 1997. *La reproducción de las plantas: semillas y meristemos*. Fondo de Cultura Económica. México. 167 pp.
- Vleeshouwers, L. M., Boumeester, H. J. and Karssen, C. M. (1995). Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *J Ecol* 83: 1031–1037.
- White, E. S., Reyes, C. M., Ortega, R. J. y Valastro S. 1990. *El Ajusco: geomorfología volcánica y acontecimientos glaciares durante el pleistoceno superior y comparación con las series glaciares mexicanas y las de las Montañas Rocallosas*. Instituto Nacional de Antropología e Historia. México, D. F.