



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DEL PRIMING NATURAL SOBRE LA
GERMINACIÓN Y EL ESTABLECIMIENTO DE
PLÁNTULAS DE MAÍZ (*Zea mays*), Y SOBRE LA
EXPRESIÓN DE GENES DUF 642**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

SERGIO NICASIO ARZETA



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Alicia Gamboa de Buen
Abril de 2010**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

<p>1. Datos del alumno. Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s): Teléfono: Universidad: Facultad o escuela: Carrera: No. de Cuenta:</p>	<p>1. Datos del alumno. Nicasio Arzeta Sergio 55 37 60 47 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 302004560</p>
<p>2. Datos del asesor. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>2. Datos del asesor. Dra. Gamboa De Buen Alicia</p>
<p>3. Datos del sinodal 1. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>3. Datos del sinodal 1. Dra. Collazo Ortega Margarita</p>
<p>4. Datos del sinodal 2. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>4. Datos del sinodal 2. Dra. Orozco Segovia Alma Delfina Lucia</p>
<p>5. Datos del sinodal 3. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>5. Datos del sinodal 3. Dra. Sánchez Nieto Sobeida</p>
<p>6. Datos del sinodal 4. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>6. Datos del sinodal 4. Dra. Cervantes Gutiérrez María Virginia</p>
<p>7. Datos de la tesis. Título: Subtítulo: No. de páginas: Año:</p>	<p>7. Datos de la tesis. Efecto del priming natural sobre la germinación y el establecimiento de plántulas de maíz (<i>Zea mays</i>), y sobre la expresión de genes DUF 642. 66 p 2010</p>

Agradecimientos

No solamente este trabajo, sino todo mi desarrollo académico y personal serían inconcebibles de no ser por mi madre, cuyo amor, apoyo y entusiasmo nunca se han agotado durante la breve vida que he tenido. Gracias por tu paciencia, tolerancia, consejos, severidad y la formación que tan desinteresadamente me has ofrecido, con el fin de hacer de un niño que llegó por circunstancias estocásticas, una persona con aspiraciones de independencia, ambición por el conocimiento y una voluntad estoica sin importar lo precario o lamentable que parezca el escenario. Esto y todo lo demás van para ti. Esto también va para Candelaria, mi segunda madre y a quién le agradezco su apoyo y ejemplo de trabajo, orden y disciplina que siempre ha profesado. A mi hermana, quien me ha enseñado el significado de las palabras paciencia, tolerancia e impasibilidad. A pesar de que juntos somos tan estables como el agua y el ácido, no dejas de ser parte de mi y en quien he encontrado apoyo y sinceridad en momentos realmente duros. Papá, nuestra relación ha sido tan irónica como las circunstancias en que se crearon. Por ti adquirí el gusto por la lectura, el perpetuo placer que ofrece la curiosidad, el esbozo de la conciencia social y el aprecio por la vida y quienes la constituyen...o sea, gracias por encaminarme a estudiar biología; respecto al resto descuida, tu apoyo ha sido bien invertido y siempre procuraré que veas los resultados de ello.

A la Dra. Alicia, quién prácticamente me salvó cuando todo estaba perdido y cuya guía, profesionalismo, paciencia (mucho), consejos, pláticas, regaños, aliento y trabajo constante contribuyeron en la culminación de este trabajo y de forma indirecta a mi crecimiento como estudiante y como persona. En el trato personal aprecio su franqueza y esa visión de la vida tan serena y pragmática que hacían de las situaciones difíciles algo más llevadero. A mi jurado, las doctoras Alma, Margarita, Virginia y Sobeida por sus correcciones y observaciones, las cuáles mejoraron sustancialmente este trabajo e hicieron que mi redacción pasara de un vórtice de entropía a un manuscrito bien estructurado.

A la Mtra. María Esther, quién a pesar de su cargada agenda siempre tuvo una respuesta breve pero concisa a todas mis dudas estadísticas y metodológicas. A mis compañeros del laboratorio de Ecología Fisiológica: Alexis, Esther, Diana, Luz Elena, Sandra y Sarai, ustedes fueron mis segundos maestros en todo momento, desde aprender a partir de cero las técnicas moleculares y saber que significaba una banda, hasta corregirme en aquellas gráficas y estadísticas incoherentes a la razón, todo esto sin soslayar los consejos, las risas, las pláticas, los jalones de oreja y la amistad que siempre me ofrecieron durante las maratónicas jornadas en el laboratorio. Esto va también para Alejandra y Luis, quienes a pesar del poco tiempo que tenemos de conocernos, hemos pasado buenos momentos tanto dentro del labo o como fuera de él.

A Sandra y Jeanette, mis amigas desde que iniciamos el taller y compañeras de tantas penas, jornadas interminables y víctimas de la falta de planeación y de una cactácea ahora innombrable. Este trabajo va también por ustedes, no se dejen estancar ni llevar por la depresión post-carrera que ha sacudido a toda la generación. Se que lograremos terminar con aquel tropiezo del y seguir el plan de vida que nos pretendemos trazar.

Al Dr. Pedro Arturo Martínez de la Universidad Autónoma Chapingo por las facilidades para la obtención del suelo en las parcelas experimentales del Colegio de Postgraduados. A Lucía Améndola Saavedra, Hugo Fernando Díaz Cruz y Netzi Rivera Sánchez por ayudarme en todo momento durante la realización de este trabajo, desde llevarme a contar semillas a las dos de la madrugada, contactarme con el Dr. Pedro, hasta llevarme a Texcoco a recoger el suelo. Sin ustedes toda la logística hubiera sido inconcebible.

A los amigos que me conocen desde hace más de un decenio y que me han apoyado en todo momento: Luz, Uriel, Ponch, Mac, Saúl y Juan. A mis grandes amigos de la prepa: Alfa, Lucía, Mónica, Viridiana, Timón, Depras, Fernanda, Isaura y Leticia. Todos mis amigos y ahora colegas de Ciencias con quienes he entablado una gran amistad desde aquel agosto de 2004, desde los barboleros (¡salud!) hasta los Chajuleros (las promesas de la conservación en México), sin olvidarme de Talibán, Adán, Adam, Adriana, Alfredo, Chelo, Erandi, Gaby, Lalo, Mafer, Karina, Paula, Úrsula, Tzitzí, Felipe, Luis, Rubén y Lucía. Seguramente hay bastantes omisiones y me disculpo por ello.

Otras personas a quienes no veo o no veré tan seguido, pero no por eso dejan de ser fundamentales en mi vida, de causarme un vuelco en el miocardio y cuya amistad, apoyo y consejo han evitado que caiga en la irracionalidad más de una vez: Celeste, Gabriela, Rocío, Yolanda e Yvonne.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me ha formado tanto en lo académico como en lo moral. Sus aulas, catedráticos y doctrina deben orientar a toda una generación a responder por los intereses y necesidades de sus contemporáneos en tiempos donde el oscurantismo cultural y científico ahoga a un pueblo sordo, ciego, mudo y tullido.

A Netzi nuevamente, por todos estos años que juntos hemos pasado entre la felicidad y la desgracia, aceptarme con todos los peros que implica mi persona y permitirme compartir tu vida conmigo. Tu amor, apoyo y ánimos me impulsaron no solamente en la culminación de este trabajo, sino en todos los proyectos que he llevado a cabo todo este tiempo...lo siento si en algún momento no he sido la pareja ideal. Te amo, gracias por llegar a mi vida.

Esta tesis fue apoyada por los proyectos "PAPIIT IN228109" de la Dra. Alicia Gamboa de Buen y "SEP-CONACyT 47859-Q" de la Dra. Alma Orozco Segovia en el Instituto de Ecología de la UNAM. De esta última se me proporcionó una beca durante mi estancia en el laboratorio.

“En la soledad, donde uno se remite a su propia compañía, se muestra cada cual tiene en su interior. En ella solloza el zopenco vestido de púrpura bajo el lastre de su mísera individualidad, mientras el hombre inteligente puebla el más árido desierto con sus pensamientos...”

A. Schopenhauer.

Índice.

AGRADECIMIENTOS.....	2
ÍNDICE.....	5
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
SEMILLA.....	7
GERMINACIÓN.....	8
PRIMING.....	14
PRIMING NATURAL.....	15
ANTECEDENTES.....	18
MAIZ.....	18
ESTUDIOS DE PRIMING EN MAIZ.....	19
EL PRIMING PROMUEVE LA EXPRESIÓN DE GENES EN SEMILLAS DE MAIZ.....	21
PROTEINAS DUF642.....	21
EXPRESIÓN DE DUF642 DURANTE EL ENTERRAMIENTO Y LA GERMINACIÓN.....	24
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVO.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
OBTENCIÓN DEL SUELO SALINO Y MEDICIÓN DE SALINIDAD.....	26
TRATAMIENTOS PREGERMINATIVOS.....	26
CURVA DE IMBIBICIÓN DURANTE EL PRIMING.....	27
GERMINACIÓN.....	27
CURVA DE IMBIBICIÓN DURANTE LA GERMINACIÓN.....	28
EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA.....	28
DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y RT-PCR.....	28
CRECIMIENTO.....	29
ANÁLISIS DE DATOS.....	29
RESULTADOS.....	32
SALINIDAD DEL SUELO.....	32
IMBIBICIÓN.....	32
GERMINACIÓN.....	34
CRECIMIENTO.....	37
EXPRESIÓN DE LOS GENES DUF642.....	40
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	46
PERSPECTIVAS.....	47
LITERATURA CONSULTADA.....	48
ANEXOS.....	54
MÉTODO PARA MEDIR SALINIDAD DEL SUELO CON LA TÉCNICA DE LA PASTA SATURADA.....	54
EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE SEMILLAS CON ALTAS CONCENTRACIONES DE CARBOHIDRATOS.....	54
SÍNTESIS DE cDNA.....	55
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	55

Resumen

Las estrategias de vida de las plantas se encuentran en función de las señales ambientales y la disposición de recursos. Las semillas perciben estas señales durante la imbibición, respondiendo de acuerdo a las condiciones en que germinarán a través de la expresión diferencial de sus genes. Los eventos de imbibición parcial y desecación durante el enterramiento de las semillas, o “priming natural”, incrementan las tasas y los porcentajes de germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas. En este trabajo se observó el efecto del priming natural durante 24 horas en semillas de maíz (*Zea mays*) en dos suelos con salinidad contrastante (suelo no salino y suelo salino). Se comparó con el efecto de un tratamiento de hidropriming y con semillas sin tratamiento (control). Durante los tratamientos, se analizaron la tasa y el porcentaje final de imbibición de las semillas. Posteriormente se comparó la tasa de imbibición durante las primeras 24 horas de la germinación, así como el tiempo de inicio, la tasa, el tiempo medio y el porcentaje final de germinación de las semillas de los tres tratamientos y del control. Las semillas germinadas se transplantaron a macetas con suelos no salino y salino. Once días después de su trasplante, se cosecharon doce plántulas por cada tratamiento de cada tipo de suelo y se midió su altura, área foliar, número de hojas y se secaron para conocer la biomasa de las hojas, los tallos y las raíces; se hicieron cuatro cosechas cada tres días durante once días y los datos obtenidos se utilizaron para evaluar el crecimiento y la asignación de recursos de las plántulas. Se analizó la expresión de los genes DUF 642 (Domain of Unknown Function) en ejes embrionarios y embriones de semillas recién germinadas de las semillas control y las tratadas con hidropriming y priming natural. Los resultados mostraron que la tasa de imbibición y el porcentaje final de agua de las semillas enterradas en el suelo salino fue mayor respecto al resto de los tratamientos, así como la tasa de imbibición durante las primeras 24 horas de la germinación de las semillas. Las semillas enterradas en suelo salino fueron las primeras en germinar y las semillas bajo priming natural tanto en suelo no salino como salino, tuvieron las tasas y porcentajes finales de germinación más altos que las semillas bajo hidropriming o las semillas control. En el suelo no salino, el crecimiento de las plántulas de las semillas bajo priming natural en ambos tipos de suelo fue mayor a las tratadas con hidropriming y al control. En el suelo salino, la tasa máxima de crecimiento y su ocurrencia no cambiaron en los tratamientos de priming natural, mientras que las plántulas de las semillas bajo hidropriming y el control fueron afectadas negativamente por el suelo salino. Las diferencias en la biomasa final de las plántulas de los dos tratamientos de priming natural en ambos tipos de suelo se pudo deber a una adaptación de éstas desde el momento en que fueron enterradas las semillas, confirmando lo observado en otros estudios de priming natural.

Introducción.

Las plantas ajustan sus estrategias de vida en función de las señales ambientales y la disposición de los recursos nutrimentales. A lo largo de las diferentes etapas del ciclo de vida de la planta la recepción de estas señales resulta en la expresión de diferentes genes que intervendrán en una respuesta específica (Olvera-Carrillo, 2001; Gurevitch *et al.*, 2002; Srivastava, 2002; Bonhert, 2007). Esta capacidad de supervivencia depende de la variabilidad genética inter e intrapoblacional, y la variación en la respuesta fisiológica, permitiendo que el crecimiento de las plantas se ajuste a las fluctuaciones ambientales (González-Zertuche *et al.*, 2000; Bonhert, 2007).

Semilla.

La semilla es el producto de la reproducción sexual de las espermatofitas y se desarrolla desde el óvulo después de la fertilización. Está constituida por el embrión y varias capas protectoras (Taiz y Zeiger, 2006). La semilla es una de las unidades móviles de las plantas, se dispersa en distintos sitios y en microambientes nuevos, renovando y manteniendo sus poblaciones (Casasola, 1996; Vázquez-Yanes *et al.*, 2000).

Por lo general, las semillas se encuentran en un estado de quiescencia*, que en condiciones ambientales favorables de humedad, oxígeno y temperatura inician la germinación (Bewley y Black, 1994). Sin embargo pueden presentar diferentes tipos de latencia. La latencia física es debida a la impermeabilidad de la testa (evita la entrada de agua), la latencia fisiológica se debe a un mecanismo inhibitor que impide la germinación como la adición o falta de hormonas y la falta de la relajación de las paredes celulares del endospermo (que evita la protusión de la radícula a

* Estado de metabolismo reducido en el embrión de la semilla, cuyo único impedimento para germinar es la falta de agua (Vázquez-Yanes *et al.*, 2000).

través del micrópilo) y la latencia morfológica, que es consecuencia de la inmadurez del embrión (Casasola, 1996; Bewley, 1997; Baskin y Baskin, 1998; Vázquez-Yanes *et al.*, 2000; Nonogaki *et al.*, 2007). El vigor de la plántula y el consecuente éxito de la germinación y el establecimiento son determinados por las características fisiológicas, morfológicas y bioquímicas de la semilla.

Germinación.

La germinación involucra todos los eventos que inician con la toma de agua y terminan con la elongación y protrusión del eje embrionario (generalmente la radícula). La semilla al embeber agua reactiva la actividad de sus procesos metabólicos que han permanecido a tasas bajas, comenzando en los primeros minutos de contacto con el agua (Bewley y Black, 1994). Durante este proceso, se genera un patrón trifásico en función de la toma de agua (Figura 1). Dependiendo de las condiciones ambientales (humedad y temperatura del suelo y aire) y de las características de la semilla (contenido de agua, composición de reservas y permeabilidad), pueden existir variaciones en la velocidad y la cantidad de agua que ésta absorba (Vázquez-Yanes *et al.*, 2000).

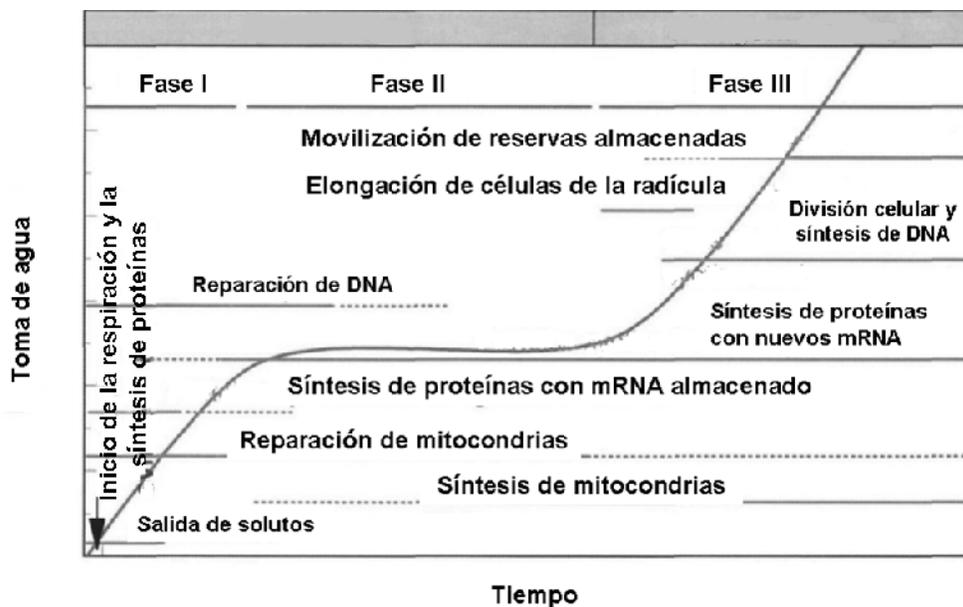


Figura 1. Fases de la germinación e inicio de los diferentes procesos metabólicos de cada uno (modificado de Bewley, 1997).

Fase I. El bajo potencial hídrico de la semilla, suma de sus potenciales mátrico (ψ_m) y osmótico (ψ_o), genera una absorción inmediata de agua, independientemente de que las semillas sean viables o presenten latencia fisiológica o morfológica. En la latencia física, la cubierta impermeable impide la toma de agua (Bewley y Black, 1994; Bewley, 1997). Esta toma de agua está inicialmente regulada por la permeabilidad de la testa, generalmente se inicia en la zona del micropilo, de manera que los eventos físicos tempranos, tales como la transición de la fase gel a líquido-cristalina de las membranas celulares y la salida de solutos de bajo peso molecular hacia el medio para captar más agua, tiene lugar en el endospermo micropilar (Bradford *et al.*, 2000; Nonogaki *et al.*, 2007). El resto de las células se rehidratan hasta que la entrada de agua es constante (Bewley y Black, 1994).

Dentro de los eventos metabólicos que se reinician en las semillas embebidas están la glicólisis en el citoplasma y la ruta de las pentosas (glicolítica y oxidativa) y el ciclo de Krebs en las mitocondrias (Bewley y Black, 1994). Dependiendo del tipo de reserva que predominen, las mitocondrias son reparadas (en semillas con carbohidratos) o sintetizadas nuevamente (en semillas con lípidos; Bewley, 1997).

Otros eventos importantes son la reorganización de las enzimas involucradas en la síntesis de proteínas, la formación de polisomas y el uso de rRNA, tRNA y mRNA preexistente. El mRNA que se encuentra maduro es traducido (Bewley y Black, 1994). Las proteínas recién sintetizadas intervienen en funciones tales como la respiración, síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y membranas celulares, y en la movilización de reservas (Bewley, 1997).

Fase II. Una vez hidratada la semilla, el incremento en la turgencia de las células del embrión, la resistencia de los tejidos periféricos y la disminución de su ψ_m , reducen la entrada de agua a un punto de equilibrio constante. La entrada de agua ahora depende de la capacidad de sus membranas recién organizadas y del del medio (Bewley, 1997; Nonogaki *et al.*, 2007).

La transcripción de nuevo mRNA comienza en esta etapa tanto en células del endospermo como en células del embrión (Bewley y Black, 1994). La germinación, que se considera ha ocurrido con la protrusión de la radícula, es independiente de la expresión de nuevos genes, ya que los inhibidores de la RNA polimerasa II la retardan. En semillas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con un inhibidor de la

transcripción, las semillas germinaron después de aplicarse una concentración 15 veces mayor de ácido giberélico (GA_3) a la que normalmente responden, no se presentó movilización de reservas, ni reinicio de las actividades metabólicas, ni desarrollo de la plántula (Rajjou *et al.*, 2004). Estos experimentos muestran que la transcripción de los genes necesarios para la continuación de la germinación y establecimiento de la planta ocurre antes de la elongación de la radícula. La mayor parte están relacionadas con eventos de crecimiento celular, modificación de la pared, intermediarios del ciclo celular, respiración aerobia, control de radicales libres de oxígeno, transporte intercelular, conversión y movilización de reservas (Tabla 1).

Fase III. En esta fase comienza la protrusión y elongación de la radícula, la cuál se expande al incrementarse la entrada de agua por una nueva disminución del ψ_0 del embrión en función de todas las sustancias producidas por la hidrólisis post-germinativa de sus reservas (Bewley, 1997). El ablandamiento de las paredes celulares de los tejidos que rodean la punta de la radícula se lleva a cabo de forma independiente o combinada con la elongación de la radícula (Bradford *et al.*, 2000; Nonogaki *et al.*, 2007).

El aumento en la respiración en los tejidos del embrión detectados durante esta etapa se atribuye tanto al incremento de mitocondrias durante la fase II como a una mejor disposición de oxígeno y al inicio de la movilización de reservas (Bewley y Black, 1994).

Tabla 1. Genes y proteínas expresados en diversos tejidos durante la fase II o germinación *de novo* en semillas de diferentes plantas. E.M.: Embrión micropilar, E.L.: Embrión lateral, Em: Embrión, R: Radícula, Meg: Megagametofito, (*): Expresión de genes homólogos a *Arabidopsis thaliana* (Nonogaki *et al.*, 2007; Soeda *et al.*, 2005; Gallardo *et al.*, 2002; Gallardo *et al.*, 2001; Marraccini *et al.*, 2001; Nonogaki *et al.*, 2000; Ren y Kermode, 2000; Leubner-Metzger *et al.*, 1995).

Enzima/Proteína	Gen	Tejido	Planta	Función
Aconitasa	—	—	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cataliza la isomerización de citrato a isocitrato en el ciclo de Krebs.
S-Adenosilmetionina sintetasa	AT3G17390	—	<i>A. thaliana</i> <i>Brassica oleracea</i> *	Cataliza la síntesis de S-adenosilmetionina (precurso del etileno) a partir de metionina y ATP.
–L– Arabinofuranosidasas	LeARA1	E.L.	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Catalizan la hidrólisis de arabinosa.
L-Ascorbato peroxidada	AT4G35000	—	<i>B. oleracea</i> *	Cataliza la transferencia de electrones de ascorbato a peróxido, produciendo dehidroascorbato y agua.
Catalasa	AT1G20620	—	<i>A. thaliana</i>	Cataliza la separación del peróxido en oxígeno y agua.
Dioxigenasa	AT2G25450	—	<i>B. oleracea</i> *	Oxida sustrato mediante la transferencia de oxígeno.
Endo- –manasas	LeMAN1	E.L.	<i>L. esculentum</i>	Hidroliza aleatoriamente las uniones –1,4–D–manopiranosil de los polímeros de manano (polisacáridos presentes en el endospermo de varias semillas).
	LeMAN2	E.M.	<i>L. esculentum</i>	
	Camana	—	<i>Coffea arabica</i>	
	CamanaB	—	<i>C. arabica</i>	
	LsMan1	E.L. / E.M.	<i>Lattuca sativa</i>	
	DfMan	Em /E.M.	<i>Datura ferox</i>	
Endotransglicosilasas/hidrolasas de xiloglucano (XHTs)	LeXET4	E.M.	<i>L. esculentum</i>	Debilita la estructura celulosa–xiloglucano de la pared primaria al catalizar la separación de sus enlaces no covalentes. Participa en la unión de enlaces reductores y no reductores entre xiloglucano u otro

polisacárido.

Enzima/Proteína	Gen	Tejido	Planta	Función
Expansinas	<i>LeEXPA4</i>	E.M.	<i>L. esculentum</i>	Ocasiona la expansión de la pared celular al romper los enlaces covalentes de la interfase celulosa–hemicelulosa.
	<i>LeEXPA8</i>	Em	<i>L. esculentum</i>	
	<i>LeEXPA10</i>	Em	<i>L. esculentum</i>	
Fosfoenolpiruvato carboxicinasa	<i>DfExpa1</i>	Em / E.M.	<i>D. ferox</i>	Convierte oxaloacetato en fosfoenolpiruvato y CO ₂ en la ruta de la gluconeogénesis.
	—	—	<i>A. thaliana</i>	Cataliza la formación de galactinol (donador de galactosa para la síntesis de rafinosa a partir de sacarosa) a partir de UDP–galactosa y myo–inositol.
Galactinol sintasa	<i>Gals</i>	—	<i>L. esculentum</i>	Remueve las cadenas laterales de galactosa asociadas a la cadena de mananos de los galactomananos.
–Galactosidasa	<i>LeaGal1</i>	E.M. / E.L. / Em	<i>L. esculentum</i>	Proteína relacionada con la defensa contra infecciones fúngicas.
–1,3–Glucanasa	<i>NtGluB</i>	E.M.	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hidroliza enlaces de glucano en la pared celular de hongos.
	<i>LeGluB</i> <i>AT4G29360</i>	E.M.	<i>L. esculentum</i> <i>B. oleracea*</i>	
–1,4–Glucanasa (celulasa)	<i>LeCel55</i>	E.M. / R.	<i>L. esculentum</i>	Degrada celulosa.
Malato sintasa	—	—	<i>A. thaliana</i>	Aciltransferasa intermediaria en la ruta del glioxilato que cataliza la reacción de Acetil CoA, glioxilato y agua en S–malato y CoA.
–Manosidasa	<i>LeMside1</i>	E.M. / E.L. / Em	<i>L. esculentum</i>	Hidroliza las terminales no reductoras de la –D–manosa (residuos liberados por efecto de las –endomanasas y –galactosidasas).

Metionina sintasa	_____	_____	<i>A. thaliana</i>	Cataliza el último paso de la síntesis de metionina en plantas.
Enzima/Proteína	Gen	Tejido	Planta	Función
-2,4 tubulina, -3,5 tubulina, -tubulina	_____	_____	<i>A. thaliana</i>	Componentes del citoesqueleto.
Pectinmetilesterasas	_____	Meg.	<i>Chamaecyparis nootkatensis</i>	Cuando actúan de forma aleatoria sobre las homogalacturonanos, catalizan su desmetilesterificación, liberando pectina, metanol y protones que promueven la función de endopoligalacturonasas, promoviendo el ablandamiento de la pared celular. Cuando actúan de forma lineal sobre los homogalacturonanos, desbloquean grupos carboxilo libres que se asocian a átomos de calcio, limitando la acción de las endopoligalacturonasas y promoviendo la rigidez de la pared celular.
Poligalacturonasas	<i>LeXPG1</i>	E.M. / R.	<i>L. esculentum</i>	Catalizan la hidrólisis de pectina en la matriz de la pared celular primaria.
Quitinasas	<i>LeChi9</i> <i>AT1G05850</i>	E.M. / R.	<i>L. esculentum</i> <i>B. oleracea*</i>	Relacionada con la defensa de infecciones fúngicas. Hidroliza enlaces de quitina en la pared celular de hongos.
Superóxido dismutasa	<i>AT4G25100</i>	_____	<i>B. oleracea*</i>	Cataliza la reacción dismutación del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno.
-D-Xilosidasa	<i>LeXYL2</i>	Em	<i>L. esculentum</i>	Catalizan la hidrólisis de xilosa.

Priming.

El priming es una técnica que consiste en dar tratamientos de hidratación parcial y desecación con el fin de desarrollar en las semillas una mayor tolerancia al estrés hídrico, salino y por temperatura, tanto en semillas jóvenes como viejas, así como promover el establecimiento de las plántulas en diferentes condiciones ambientales. Estos efectos se observan en la sincronía e incremento de la velocidad y tasa de germinación del lote tratado el aumento de la velocidad de crecimiento y el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas. En algunos casos hay incremento o reducción del porcentaje de germinación, así como el rompimiento de la latencia fisiológica (McDonald, 2000; Sánchez *et al.*, 2001; Butola y Badola, 2004).

Las semillas una vez que se embeben y permanecen por un tiempo en fase II, deben ser deshidratadas a su porcentaje de agua original, lo que reactiva eventos de tolerancia a la desecación que implican la conservación de las propiedades estructurales y bioquímicas de proteínas, membranas y organelos, a través de la síntesis de biomoléculas que intervienen en la desecación del embrión durante la formación de la semilla (Pammenter y Berjak, 1999). Uno de los procesos es la síntesis de oligosacáridos no reductores que llenan los espacios de las moléculas de agua, vitrifican la fase acuosa y evitan la transición de la fase líquido-cristalina a la fase gel protegiendo de deformaciones a la membrana celular, el citoplasma y estabilizando la estructura de los organelos (Koster y Leopold, 1988; Horbowicz y Obendorf, 1994; Obendorf, 1997; Pammenter y Berjak, 1999). Otro evento es la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP, Heat Shock Proteins por sus siglas en inglés), y de proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (LEA, Late Embryogenesis Abundant por sus siglas en inglés). Estas proteínas funcionan como aceptores de iones y moléculas de agua y como chaperonas de proteínas, al evitar su agregación irreversible o contribuir a su correcto re-plegamiento (Pammenter y Berjak, 1999; Wehmeyer y Vierling, 2000). Su concentración disminuye durante la imbibición de la semilla y se incrementa cuando comienza la desecación (Wehmeyer y Vierling, 2000; Gallardo *et al.*, 2001; Soeda *et al.*, 2005).

Las técnicas de priming se dividen de acuerdo a las sustancias y materiales usados para modular la entrada de agua. El hidropriming consiste en embeber parcialmente las semillas en agua, estableciendo una relación entre el volumen de

agua y el volumen de la semilla. La absorción depende de la afinidad del agua con los tejidos y reservas de la semilla. Sin embargo, con esta técnica la tasa de hidratación es difícil de controlar y puede ocasionar daños en la semilla por una imbibición rápida o insuficiente (McDonald, 2000; Sánchez *et al.*, 2001). En el osmoprimering, la entrada de agua es controlada a través de solutos de alto peso molecular (polietilenglicol, manitol, sacarosa y sales como NH_4NO_4 , NaCl , KNO_3 y KH_2PO_4), que disminuyen el potencial osmótico del medio que rodea a la semilla (Michel y Kaufmann, 1973; Michel, 1983). El problema de usar sales es el efecto tóxico y el daño a estructuras celulares que causan cuando son absorbidas por la semilla (McDonald, 2000; Sánchez *et al.*, 2001). El matipriming implica el uso de materiales sólidos con un potencial mátrico bajo, nula solubilidad, alta retención del agua y alta proporción superficie–volumen (como vermiculita y musgo de turbera ó “peat moss”) que emulan el proceso natural de imbibición de las semillas mediado por las partículas el suelo (McDonald, 2000). La eficiencia de cada tratamiento depende del tipo y tamaño de la semilla, así como de las condiciones en las que se lleve a cabo. Posterior al tratamiento de priming, las semillas se secan hasta su porcentaje de agua original, ya sea por sales saturadas, calor seco, aire ambiental o corrientes inducidas, generalmente a temperaturas bajas (5–10°C) para disminuir las actividades fisiológicas relacionadas con la germinación.

Priming natural.

Se ha sugerido que los procesos de hidratación-deseccación ocurren naturalmente cuando las semillas se encuentran dentro del banco de semillas. Es probable que en los periodos de baja precipitación, tengan lugar tanto condiciones de imbibición parcial de las semillas como fluctuaciones de temperatura y oxígeno, que activen los eventos de la germinación temprana de estas, pero sin llegar a la protrusión de la radícula (Dubrovsky, 1996; González-Zertuche *et al.*, 2001; González-Zertuche *et al.*, 2002; Santini-González, 2009). Bajo esta hipótesis, se ha comparado la germinación de semillas enterradas -acción denominada priming natural- y las procesadas por priming en laboratorio, encontrándose similitudes en sus respuestas fisiológicas, que en el caso de las semillas enterradas variaron dependiendo del microambiente del suelo en el que estuvieron (González-Zertuche *et al.*, 2001; Olvera-Carrillo, 2001).

Esta técnica se ha utilizado principalmente en semillas de plantas silvestres, donde se ha observado un incremento en la germinación de sus semillas y en el establecimiento de sus plántulas. Estos resultados son de utilidad para las actividades de restauración ecológica. Este tratamiento incrementa las tasas de germinación, y aclimatiza a las plántulas al lugar donde las semillas fueron enterradas, aumentando el porcentaje de sobrevivencia (González-Zertuche *et al.*, 2000; González-Zertuche *et al.*, 2001; Olvera-Carrillo, 2001; Orozco-Segovia *et al.*, 2007).

Efecto del priming natural y artificial en la actividad de proteínas y expresión de genes.

Durante la imbibición parcial promovida por el priming se inicia la expresión de los genes relacionados con la germinación que se expresan normalmente durante la fase II de imbibición (ver Tabla 1; Soeda *et al.*, 2005). Gallardo *et al.* (2001) han observado proteínas que solamente se expresan después del tratamiento, como globulinas solubles y tubulinas de citoesqueleto. A su vez, hay un incremento en la cantidad y actividad de otras proteínas como catalasas, amilasas, peptidasas y las HSP, las cuáles están relacionadas con el incremento de la resistencia al estrés hídrico, la reparación intracelular, la hidrólisis y el transporte de las reservas del endospermo (McDonald, 2000). Otra forma en que las semillas adquieren resistencia al estrés hídrico es ajustando su potencial osmótico a partir de la síntesis de azúcares solubles; en semillas de pepino posterior a tratamientos de osmopriming con PEG (Polietilenglicol), hay un incremento de la actividad de la α -amilasa, lo que aumenta la cantidad de sacarosa y disminuye la de almidón en el cotiledón (Todaka *et al.*, 2000).

Estos cambios en la expresión de genes y en la actividad de proteínas ha permitido la búsqueda de marcadores que muestren un efecto positivo del priming sobre las semillas. En las semillas de *Beta vulgaris*, la presencia de la subunidad- de la globulina 11S -solubilizada por una peptidasa expresada solamente durante el hidropriming y el osmopriming- y la permanencia de un proteína biotinilada específica (SBP), mostraron que el mejor tratamiento pregerminativo era un hidropriming de dos días a una temperatura de 25°C (Job *et al.*, 2000).

Los cambios a nivel metabólico, como consecuencia del priming natural, son similares con los procesos antes mencionados. En semillas de *Dodonaea viscosa*, el priming natural indujo la hidrólisis de las reservas de almidón, generando una mayor concentración de glucosa y sacarosa, además de un incremento en la actividad de las invertasas ácidas, lo que aceleró el reparto de carbono en las semillas enterradas (Armenta-Jaime, 2007). En *Opuntia tomentosa*, el priming natural adelantó la movilización de almidón, fructosa y triacilgliceroles, e incrementó la actividad de las invertasas ácidas en el cotiledón y la radícula, con esto se adelantaron los procesos previos al inicio de la germinación y el temprano crecimiento de la plántula (Ramírez-Sóstenes, 2008). El enterramiento también promueve la solubilización y movilización de globulinas y vicilinas (7-S y 11-S), así como la presencia de cuerpos proteicos en semillas de *D. viscosa*, *Wigandia urens* y *Buddleia cordata* (Gamboa-de Buen *et al.*, 2006; Alvarado-López, 2009). La modificación y movilización temprana de estas reservas permite que su uso sea inmediato durante la germinación y en los primeros días del establecimiento de la plántula; se ha observado que esto favorece tasas mayores de emergencia de plántulas y disminuye su mortalidad.

También se ha observado que el priming natural promueve la tolerancia al estrés oxidativo. Las semillas tratadas de *D. viscosa* y *W. urens* presentan un incremento en la actividad de la enzima catalasa como repuesta al incremento de las concentraciones de peróxido de hidrógeno, eventos relacionados con la imbibición parcial de la semilla y la hidrólisis de sus reservas lipídicas (Gamboa-deBuen *et al.*, 2006; Reyna-Llorens, 2008). Los cambios durante el enterramiento pueden estar asociados con un aumento en el vigor del embrión y por ende, en una mayor tolerancia al estrés abiótico, lo que contribuye a incrementar las tasas de crecimiento y el porcentaje de sobrevivencia tanto en condiciones controladas como en condiciones de campo (González-Zertuche *et al.*, 2001).

Antecedentes.

Maíz.

El maíz (*Zea mays* L.) es una monocotiledónea anual de la familia Poaceae que produce infrutescencias (mazorca) compuestas por cariósides, cada una constituida por pericarpo, endospermo y embrión (Figura 2a). El pericarpo es transparente y recubre el endospermo, que representa el 85% del peso total y está constituido principalmente por cadenas de amilasa y amilopectina (Leszek y Vincent, 2002). Presenta una capa de células en su periferia llamada aleurona, la cuál puede estar o no pigmentada.

El embrión se encuentra en la parte más ancha de la cariósida y se compone de un eje central, en cuyos extremos se encuentran la raíz primaria y el ápice del tallo, mientras en su parte media se halla el escutelo, que interviene en el control de la hidrólisis, la absorción y la distribución de las reservas del endospermo (Bewley y Black, 1994; Nonogaki, 2008). Al germinar, el ápice superior se diferencia en el coleóptilo, donde posteriormente emergen las primeras hojas y raíces adventicias, y el inferior en raíces primarias y secundarias (Figura 2b).

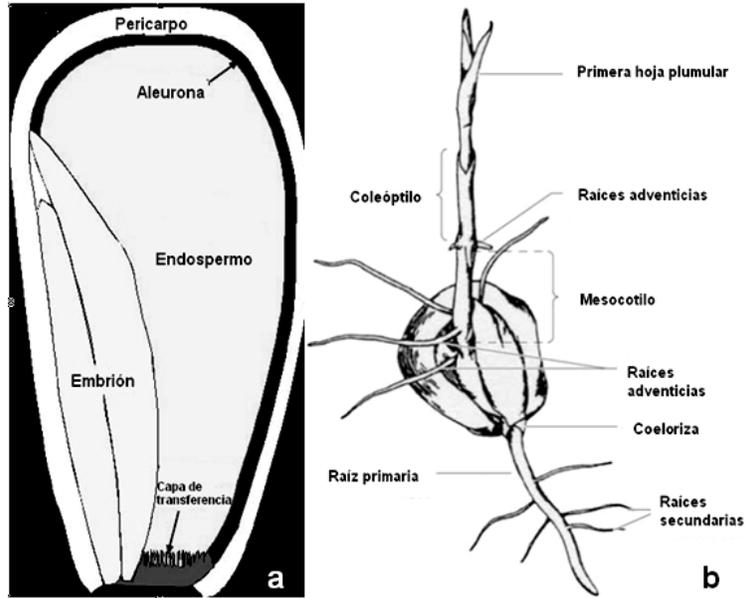


Figura 1. a) Partes de la cariósipide y b) de la plántula de maíz (modificado de Leszek y Vincent, 2002).

Los recursos necesarios para la germinación, desarrollo y crecimiento de la plántula durante sus primeros días se localizan en sus reservas, que son hidrolizadas por las enzimas α - y β -amilasas y α -glucosidasa, que son sintetizadas *de novo* en las células de la aleurona durante las primeras horas de imbibición (Dure, 1969; Styer y Cantliffe, 1984; Laurière *et al.*, 1992). La síntesis de estas enzimas está regulada por la secreción de GA_3 desde el escutelo, el cuál posteriormente absorbe la glucosa producida y la sintetiza en sacarosa, ambos azúcares se movilizan a lo largo de toda la plántula a través de transportadores de hexosa y sacarosa, que son activados por los mismos azúcares (Gómez-Calderas, 2008; Nonogaki, 2008).

Estudios de priming en maíz.

En maíz el uso de hidropriming y matripriming ha sido efectivo al incrementar la velocidad y el porcentaje final de germinación, contrario al osmopriming con PEG, que no genera efectos significativos respecto a semillas sin tratamiento (McDonald, 2000; Moradi-Dezfoli *et al.*, 2008).

Muchos de los trabajos sobre priming se enfocan en promover la germinación y el establecimiento de plántulas en diferentes condiciones de estrés (Farooq *et al.*, 2008). Los trabajos enfocados a mejorar estos eventos bajo estrés salino han mostrado la efectividad de diferentes tratamientos de priming (Ashraf y Rauf, 2001; Cayuela *et al.*, 2001; Iqbar y Ashraf, 2005). Bajo condiciones de salinidad, el tratamiento que mejores resultados ha dado es el osmopriming con NaCl, KCl, y $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. En condiciones de hasta $200 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ de NaCl las tasas y porcentajes finales de germinación se vieron mejoradas respecto al control y a un hidropriming, así como la biomasa final de plúmulas y radículas (Ashraf y Rauf, 2001). Estas ventajas no se limitan a la germinación, en las plántulas se presentan cambios que incrementan sus probabilidades de sobrevivencia y establecimiento. Zhang *et al.* (2007) observaron que en semillas de maíz, al efectuar un priming que consistió en enterrar las semillas en bolsas con arena humedecida a 4°C durante 48 horas, se incrementó la tasa y el porcentaje final de germinación sobre un sustrato de arena con una concentración al 1% de NaCl. Este tratamiento también contribuyó a mejorar el crecimiento de las plántulas y hubo ajustes a nivel fisiológico, entre ellos el incremento en la cantidad de azúcares solubles, clorofila, carotenoides, y un aumento en la actividad de peroxidasas y catalasas.

El aumento en las concentraciones de sales en los suelos es un problema para la producción de maíz. La acumulación de sales en la superficie del suelo es debido a factores orográficos y ambientales en cuencas endorréicas donde la evaporación excede a la precipitación o en sitios lacustres drenados para fines de uso agrícolas ó de urbanización (Cruickshank, 1994; Malhorta y Blake, 2005). En el antiguo Lago de Texcoco, los factores que han promovido la presencia de suelos salinos en las periferias del ex lago son la deposición de sedimentos salinos por la desecación de los cuerpos de agua que se encontraban de la parte occidental del municipio de Texcoco y la evaporación de agua, que es tres veces mayor a la cantidad que recibe los alrededores del ex-lago por precipitación, ocasionada por las altas temperaturas superficiales, y la convergencia de los vientos de las serranías cercanas (Ortiz Olguin, 1999; Gobierno del Estado de México, 2000).

El priming promueve la expresión de genes en semillas de maíz.

Durante la germinación del maíz, la síntesis de mRNA comienza a las pocas horas de imbibición generando cambios en el patrón de expresión de proteínas durante las horas previas a la protusión de la radícula, principalmente en el eje embrionario donde se producen importantes proteínas precursoras de la germinación (Dommes y Van de Walle, 1983; Martínez-Silva, 2006). Estos cambios en la expresión son controlados a través de fluctuaciones en los niveles de GA y ácido abscísico (ABA), fitohormona relacionada con la regulación de la desecación durante la embriogénesis y la formación de la semilla y variando en función de la cantidad de agua embebida por la semilla (Sánchez-Martínez *et al.*, 1986; Skrinder y Mundy, 1990).

Durante el priming, al embeber agua parcialmente la semilla se activa la síntesis de mRNA y de proteínas. Durante el osmopriming en semillas de maíz hubo un aumento en la formación de cuerpos proteicos y de ácidos nucleicos durante la germinación (Cruz-García *et al.*, 1995). En otro trabajo, Durante esta síntesis *de novo*, se ha observado un adelanto en la expresión de algunos genes relacionados con la germinación. Cruz-García *et al.* (2003) encontraron que la expresión de un gen asociado con la expansión de células de la raíz en plántulas de maíz comenzó a pocas horas en las semillas con osmopriming, infiriendo que el tratamiento contribuye a acelerar algunos eventos relacionados con la germinación.

Proteínas DUF642

Muchas de las secuencias de proteínas obtenidas a partir de la secuenciación de genomas en plantas se clasifican de acuerdo a su sitio catalítico o a su intervención en procesos bioquímicos y fisiológicos (generalmente reflejado en el fenotipo de individuos con mutaciones en cierto gen; Ostergaard y Yanofski, 2004). Aunque a la mayoría de estas proteínas aún no se les ha podido asignar una función, han sido agrupadas en familias multigénicas de acuerdo con la homología de la secuencia de algunas regiones. Estas regiones corresponden a dominios de función desconocida

(DUF, Domain of Unknown Function por sus siglas en inglés; Figura 3). En el caso de *A. thaliana*, se han descrito alrededor de 1800 familias con uno o varios dominios DUF (The Arabidopsis Information Resource, 2009).



Figura 2. Estructura de la familia DUF 642.

La familia DUF642 es exclusiva de espermatófitas y se localiza en la pared celular. Las proteínas de esta familia se agrupan en cuatro clados: A, B, C y D. El clado D es exclusivo de dicotiledóneas (Figura 4, Vázquez-Lobo et al., en preparación). *Arabidopsis thaliana* presenta 10 genes la familia DUF642 que se expresan en todos los tejidos (Zúñiga-Sánchez, 2007). Sin embargo, el análisis de los proteomas de pared celular de diferentes tipos celulares de *A. thaliana* sugiere una expresión diferencial a lo largo del desarrollo (Figura 5) ya que en células cultivadas se encontraron 2 proteínas DUF642 específicas de este tejido (At2g41800, At1g80240) mientras que en los tallos maduros se detectó de manera específica una proteína del clado A, At4g32460 mientras que la At3g08030 se encontró en todos los proteomas. Solo proteínas correspondientes a los clados A y B se encontraron en los diferentes proteomas de pared celular (Figura 4; Boudart et al., 2005; Bayer et al., 2006; Minic et al., 2007).

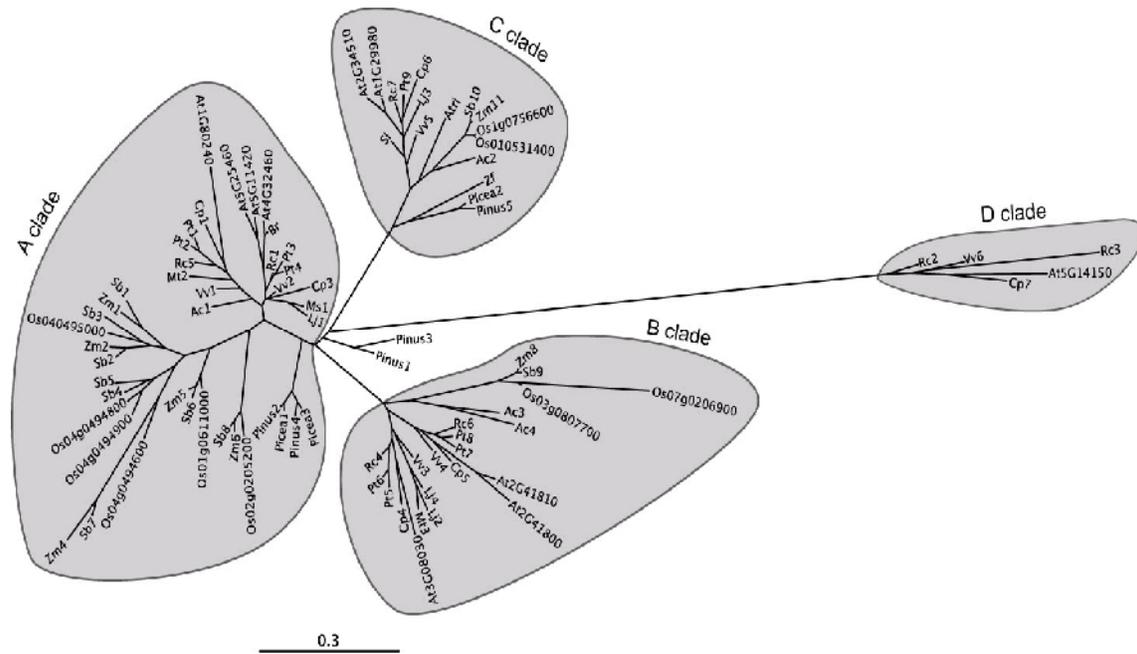
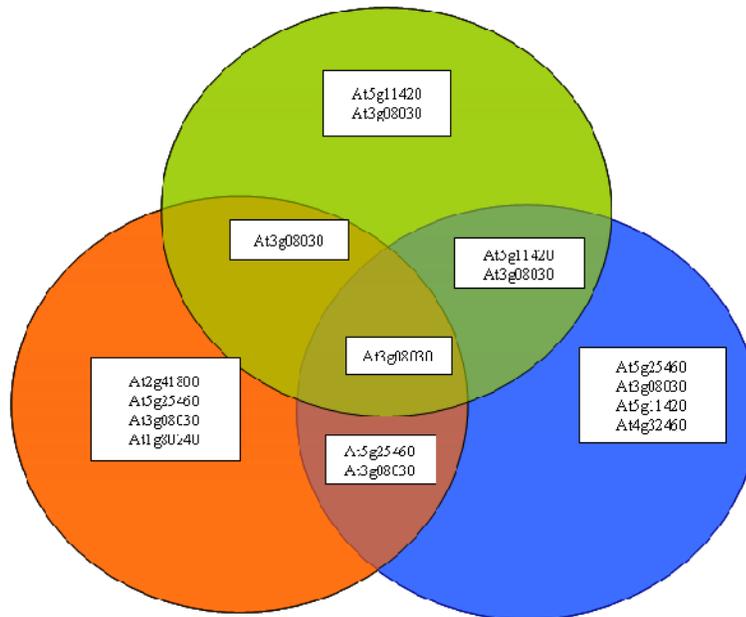


Figura 3. Cladograma de la familia de proteínas DUF 642 (Vázquez-Lobo et al., en preparación).

Fluidos apoplásticos de hojas de roseta y plántulas
(Boudart et al., 2005; Charnock et al., 2005)



Cultivos celulares
(Chivasa et al., 2002; Bayer et al., 2003; Bordenies et al., 2002; Slabas et al., 2004)

Tejido vegetativo (talles maduros e hipocótilos etiolados)
(Feiz et al., 2006; Irshad et al., 2008; Mimic et al., 2007)

Figura 4. Localización de diferentes genes DUF 642 en proteomas de fluidos apoplásticos, cultivos celulares y tejidos vegetativos (Zúñiga-Sánchez y Gamboa-de Buen, 2009).

Zúñiga-Sánchez (2007) observó la interacción de las proteínas At5g11420 y At4g32460 con una pectin metilesterasa (PME3) entre otras proteínas. Las PME3 funcionan como reguladores de la rigidez o relajamiento de la pared celular y del transporte de moléculas a través de los plasmodesmos, esta actividad se ha visto durante su interacción con proteínas de movimiento secretadas por el virus del mosaico del tabaco, lo que permite su transporte por la vía simplástica (Chen *et al.*, 2000). La interacción de DUF642 con estas proteínas las señalan como posibles intermediarios, tanto en rutas de señalización en la matriz y la pared celular como durante el desarrollo (Zúñiga-Sánchez, 2007).

Expresión de DUF642 durante el enterramiento y la germinación.

En *Brassica oleracea* la expresión de genes del clado A y B de la familia DUF642 es modificada por el priming (Soeda *et al.*, 2005). La expresión diferencial de las proteínas DUF642 durante la maduración de la semilla y la germinación también ha sido descrita en transcriptomas de *A. thaliana* (Carrera *et al.*, 2008) y *Hordeum vulgare* (Sreenivasulu *et al.*, 2008).

El enterramiento de las semillas de *A. thaliana* también genera cambios en la expresión de este grupo de proteínas. Garza-Caligaris (en preparación) observó una expresión diferencial. El gen At5g25460 solo se expresa en las semillas enterradas; en las semillas tratadas con hidropriming y en el control no se detectó este gen.

Hipótesis.

El priming natural tendrá efectos superiores a los tratamientos de priming convencionales sobre la germinación de semillas de maíz y en el establecimiento de sus plántulas, aún bajo condiciones de estrés salino.

El priming natural determinará una expresión diferencial en los genes de la familia de proteínas DUF642.

Objetivo

Objetivo general.

- Conocer el efecto del priming natural sobre la germinación, establecimiento y expresión de genes de la familia de proteínas DUF642 en semillas de maíz (*Zea mays* L.)

Objetivos particulares.

- Conocer el efecto del priming natural (en suelos normal y salino) en la germinación de semillas de maíz en condiciones normales y de salinidad (4-8 dS m⁻¹).
- Conocer el efecto del priming natural (en suelos normal y salino) sobre el crecimiento y establecimiento temprano de plántulas de maíz en suelos normal y salino.
- Observar la expresión de cuatro genes de la familia de proteínas DUF642 antes y después de la germinación de semillas de maíz bajo el efecto del priming natural y establecer si existe un patrón similar en la expresión de estos genes con respecto a lo observado en *Arabidopsis thaliana*.

Material y métodos.

Obtención del suelo salino y medición de salinidad.

El suelo se extrajo de las parcelas experimentales del Colegio de Postgraduados (ColPos) en el municipio de Texcoco, Estado de México, en agosto de 2009. El suelo de las parcelas presenta distintos niveles de salinidad que van de los cero a los 20 dS m⁻¹ (Martínez-Hernández com Pers).

La salinidad se midió utilizando el método de pasta saturada (ver Anexo I) de acuerdo a SEMARNAT (2002), y se midió en dS m⁻¹ con un conductímetro Hach sensION 156 Portable. Como suelo control (no salino) se utilizó suelo negro orgánico utilizado para plantas del Instituto de Ecología. Las pruebas de cada muestra de suelo se hicieron por triplicado.

Tratamientos pregerminativos.

Se utilizaron semillas de maíz variedad Chalqueño. Esta variedad se cultiva en las regiones del valle de Chalco en el Estado de México, y en las zonas montañosas del estado de Michoacán en altitudes de 2040 a 2200 msnm. Se enterraron 410 semillas en suelo no salino (ESNS) y en suelo salino (ESS) en tarjas de plástico, se regaron los suelos a capacidad de campo y se dejaron enterradas durante 24 horas. Para el tratamiento de hidropriming (HP) se colocaron 410 semillas en una probeta de plástico de dos litros y se agregó agua destilada hasta cubrir las semillas. Posteriormente, la probeta se cubrió con papel aluminio para evitar la entrada de luz y se guardó en un refrigerador, a 8°C durante 24 horas, en posición horizontal para incrementar la superficie de contacto de las semillas con el aire. Se utilizó un mismo número de semillas que no recibieron ningún tratamiento como control (CO).

Después de las 24 horas las semillas se sacaron de sus respectivos tratamientos y se dejaron secar en un cuarto oscuro durante cuatro días a temperatura ambiente (25°C). Cada lote de 410 semillas se dividió en tres partes para realizar pruebas diferentes: 200 para la prueba de germinación, 180 para la curva de imbibición durante la germinación y 30 para la extracción de RNA.

Curva de imbibición durante el priming

De manera independiente a los tratamientos antes mencionados, en 12 recipientes de plástico se colocó suelo no salino, se enterraron 15 semillas en cada recipiente (n = 180 semillas) y se regó a capacidad de campo. Se procedió de la misma forma con suelo salino. Para el tratamiento de hidropriming, se utilizaron 12 tubos Falcon de 45 mL, en cada uno se colocaron 12 semillas y se llenaron con agua destilada hasta cubrir las semillas (N= 540). Los tubos se guardaron en un refrigerador a 8°C en posición horizontal.

De cada uno de los tres tratamientos, se extrajeron 15 semillas cada dos horas durante 24 horas. Las semillas se numeraron y se registró su peso fresco en una balanza Brainweigh B300 D. Posteriormente las semillas se pusieron a secar a 70° durante 48 horas y se registró el peso seco de cada semilla. Para conocer el porcentaje inicial de agua de las semillas, se estimó el contenido de agua de 15 semillas sin tratamiento.

Germinación.

Se sembraron 50 semillas de cada tratamiento en cajas Petri con papel filtro, se regaron con agua y se colocaron en una cámara de germinación a 20°C con un fotoperiodo largo (16 horas luz y 8 horas oscuridad). Como control se sembró un mismo número de semillas que no recibieron tratamiento. Se hicieron cuatro repeticiones por cada tratamiento y se registró la germinación acumulada cada seis horas durante noventa horas.

Curva de imbibición durante la germinación.

Las 180 semillas restantes de cada tratamiento y 180 semillas sin tratamiento previo (control), se sembraron bajo las mismas condiciones que las semillas para la curva de germinación. Se colectaron 15 semillas cada dos horas durante las primeras 24 horas de la germinación. En cada uno de los tres tratamientos, se extrajeron 15 semillas cada dos horas durante 24 horas. Se enumeraron, se registró el peso fresco y posteriormente se pusieron a secar a 70° durante 48 horas, posteriormente se tomó el peso seco de cada semilla. Para conocer el porcentaje inicial de agua de las semillas, se estimó el contenido de agua de 15 semillas sin tratamiento.

Extracción de RNA síntesis de cDNA.

Se colectó una muestra de 20 ejes embrionarios y 10 ejes germinados de semillas de cada tratamiento (~0.100 mg de tejido), se guardaron en un tubo eppendorf y se congelaron con nitrógeno líquido. Posteriormente se almacenaron a -80°C. El RNA total se obtuvo con el método de extracción para semillas con altas cantidades de carbohidratos de (Li y Trick, 2005; ver Anexo II). Se obtuvo un total de 30 µL de muestra por tratamiento y todas las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se utilizaron 2 µL de RNA de cada muestra para la síntesis de cDNA de una cadena utilizando oligo dT y SuperScript II retrotranscriptasa (Invitrogen; Anexo III).

Diseño de oligonucléidos y RT-PCR.

Las secuencias de cuatro genes de la familia DUF642 de maíz (Tabla 2), fueron obtenidas en la base de datos de la página NCBI. Se diseñaron cuatro oligonucleótidos específicos con la aplicación PRIMER BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>), la cuál muestra la

localización de diferentes primers potenciales para cada secuencia. Se seleccionaron las cadenas más estables.

Tabla 1. Genes de la familia DUF642 en maíz y sus homólogos en *A. thaliana*. La abreviación A y B se refiere al clado donde se localizan.

Gen DUF 642 en maíz	Gen DUF 642 <i>A. thaliana</i>	Abreviación
Acf83808.1	At5g11420	A1
Acg40327.1	At5g80240	A2
Acl52972.1	At5g11420	A4
Acg38935.1	Atg41810	B1

Crecimiento.

Las semillas germinadas se transplantaron a macetas dentro de la casa de sombra del Instituto de Ecología de la UNAM. Las macetas se dividieron en dos grupos de acuerdo al tipo de suelo (no salino y salino), y en cada grupo se plantaron 72 semillas de cada tratamiento. Todos los tratamientos se regaron diariamente.

Once días después del transplante, se iniciaron las cosechas para medir el crecimiento de las plántulas. Se hicieron cuatro cosechas, dos por semana de 12 plántulas por tratamiento en ambos tipos de suelo. Se registró la altura, el número de hojas y el área foliar. Posteriormente se separó la planta en raíz, tallo, hojas y cotiledón. Todas las partes de la plántula se dejaron secar a 70°C durante 48 horas para registrar el peso seco.

Análisis de datos.

Los valores de conductividad de los suelos salino y no salino se compararon con una prueba “t” de Student.

Los porcentajes acumulados de germinación fueron ajustados a una curva sigmoide exponencial, los porcentajes acumulados de imbibición (priming y

germinación) se ajustaron a una curva polinomial exponencial y los datos de crecimiento se ajustaron a una curva polinomial racional (Tabla 3).

Tabla 2. Ecuaciones de las curvas de ajuste de germinación, imbibición y crecimiento. En los tres casos: “y” corresponde a un punto en el eje de las abscisas, “a” es la ordenada al origen, “b” es la pendiente de la curva y “c” es una constante.

Variable	Ecuación
Curva de germinación	$y = a / [1 + b^{(-cx)}]$
Curva de imbibición priming	$y = a + bx^2 + cx^{0.5}$
Curva de imbibición germinación (tratamiento suelo salino)	$y = a + bx^c$
Curva de crecimiento	$y = a + bx + c/x$

Posteriormente, los datos de los porcentajes de contenido de agua y de germinación se transformaron con la función arcoseno para obtener las derivadas de las curvas de germinación e imbibición. Para ajustar los datos de crecimiento a la curva se utilizó el logaritmo natural de la biomasa de cada plántula por colecta. Los porcentajes transformados de germinación e imbibición final durante el priming se promediaron y se compararon con una ANOVA.

Las tasas máximas de imbibición, germinación y crecimiento se obtuvieron promediando las primeras derivadas máximas de cada curva. Para obtener el tiempo medio de germinación se promediaron los tiempos en que presentó la derivada máxima dentro de la curva. Las tasas de imbibición durante el priming se compararon con una prueba de Kruskal-Wallis. La tasa máxima de germinación y el tiempo promedio de germinación de las semillas se compararon con una ANOVA.

Para conocer la asignación de recursos en las plántulas por efecto tanto del tratamiento pregerminativo, como del tipo de suelo donde se sembraron, se utilizaron los datos de la última cosecha (día 22) de todos los tratamientos. De estos datos se calcularon el área foliar específica (SLA), las proporciones de área foliar (LAR), la masa foliar (LMR), la masa del tallo (SMR), y el coeficiente alométrico (R/S; Tabla 4). Para saber que factor afectó más las variables analizadas, se realizó un

análisis de varianza multifactorial (MANOVA), donde las factoriales fueron el tratamiento pregerminativo y el sustrato.

Tabla 3. Variables de asignación en diferentes partes de la planta. El área se expresa en cm² y el peso seco en g. *La parte aérea es la suma del peso seco de las hojas y el peso seco del tallo.

Variable	Fórmula
SLA	Área foliar / peso seco hoja
LAR	Área foliar / peso seco planta
LMR	Peso seco hoja / peso seco planta
SMR	Peso seco tallo / peso seco planta
R/S	Peso seco raíz / peso seco parte aérea*

El incremento de la biomasa de las plántulas de las semillas de cada tratamiento en cada tipo de suelo durante el tiempo, su tasa máxima de crecimiento, su biomasa final (plántulas de la última cosecha) y la proporción raíz-tallo, se compararon con una ANOVA y como prueba *post hoc* se utilizó la prueba de Tukey HSD. En el caso de la biomasa final y la tasa máxima de crecimiento, se llevó a cabo una MANOVA para conocer el efecto que tuvieron el suelo y los tratamientos pregerminativos.

Los ajustes de las curvas se hicieron con el programa TableCurve versión 2.1, los análisis estadísticos con los programas STATISTICA 8 y STATGRAPHICS 2.0 y las gráficas con el programa Sigma Plot versión 11.

Resultados

Salinidad del suelo

La salinidad del suelo de Texcoco fue mucho mayor a la registrada en la mezcla de suelo orgánico utilizado en jardinería ($t = 35.285$; $g.l.: 2$; $p = 0.001$), el cual presentó niveles de salinidad despreciables (Tabla 5). Además de presentar un cierto grado de salinidad, este suelo presentó otras características como una textura limo-arcillosa y poca permeabilidad.

Tabla 5. Salinidad de los suelos obtenidos en las parcelas experimentales del Colegio de Postgraduados (Colpos) y de la tierra para plantas del Instituto de Ecología (I. E.).

Procedencia	Salinidad del suelo (dS m^{-1})	Nivel de salinidad (SEMARNAT, 2002)
Colpos	4.9333 ± 0.2419	Suelo salino ($4.0\text{--}8.0 \text{ dS m}^{-1}$)
Viveros	0.0013 ± 0.0003	Efectos despreciables ($<1 \text{ dS m}^{-1}$)

Imbibición

Las curvas de imbibición en los diferentes lotes de semillas durante los tratamientos pre-germinativos muestran que durante las primeras horas la pendiente de la curva es muy alta, y posteriormente se vuelve asintótica, mostrando que la entrada de agua disminuye a medida que el contenido de humedad se vuelve constante (Bewley y Black, 1996).

Las semillas de maíz iniciaron su imbibición desde que se pusieron en contacto con el agua del medio de germinación. La tasa de imbibición fue alta en todos los tratamientos, y disminuye después de las primeras dos horas (Figura 6). La tasa máxima de imbibición (primera derivada máxima de la curva de germinación) no fue diferente entre los tratamientos ($H_{(2,45)} = 4.177$; $p = 0.123$), pero si el contenido de agua en las semillas al final del experimento ($F_{(3,56)} = 2260.6$; $p = 0.001$). El contenido de agua en las semillas ESS fue mayor que en el resto de los tratamientos.

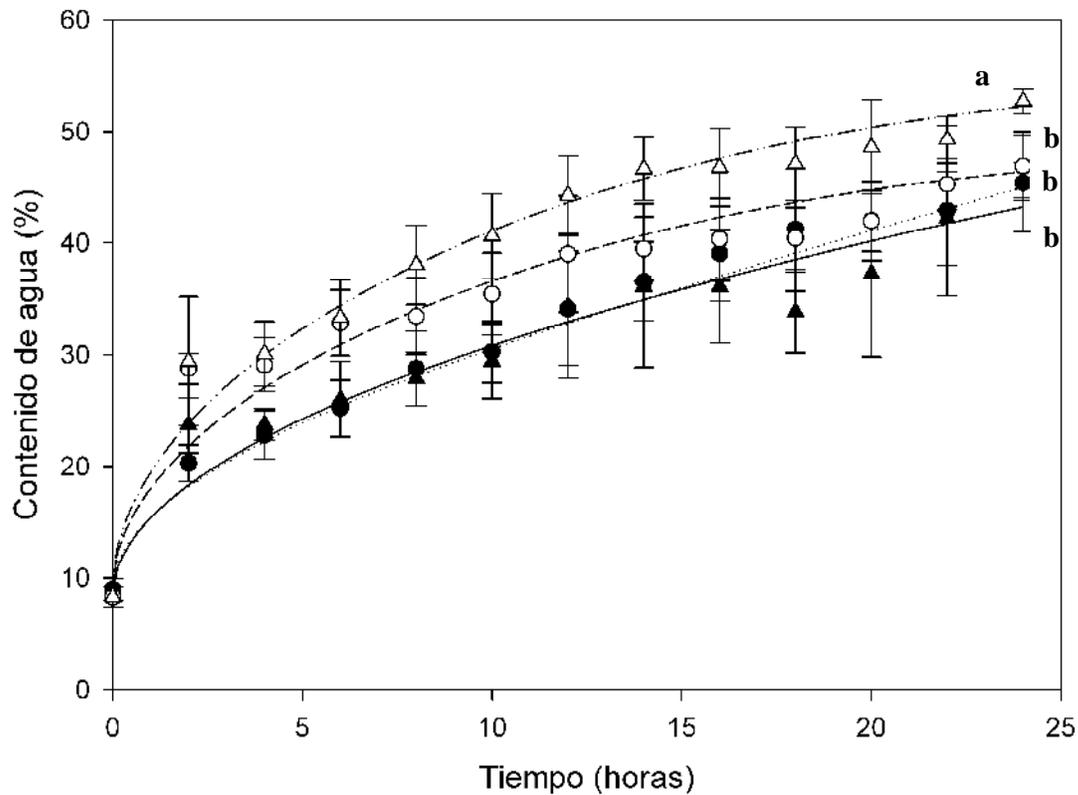


Figura 1. Curva de imbibición y porcentajes finales de agua en semillas de maíz. Los tratamientos son control (●; —), hidropriming (○; ···), semillas enterradas en suelo no salino (△; —) y en suelo salino (□; - - -). Para obtener la curva, se utilizaron 180 semillas de cada lote y se pesaron 15 semillas cada 2 horas durante las 24 horas del tratamiento. El contenido de agua se estimó por el contenido de agua (%) en base seca. El control es el porcentaje de agua de las semillas antes de los tratamientos y la curva de imbibición (○; ···) de un lote de semillas (n = 180) embebidos. Las letras indican las diferencias significativas ($p > 0.05$).

Al final del tratamiento, las semillas enterradas en suelo salino cambiaron de color blanco a amarillo, proceso no observado en las semillas de los otros tratamientos. Este color permaneció aún después del secado de las semillas, sin embargo no afectó su viabilidad ni el crecimiento de las plántulas (incisos posteriores).

Germinación

Los análisis en semillas de diferentes especies de plantas mostraron que los ciclos de hidratación-deshidratación que se presentan durante la estancia de las semillas en el suelo (priming natural) y los tratamientos de “priming” en el laboratorio promueven el incremento de la tasa, sincronía y porcentaje final de germinación (Castro-Colina, 2007; González-Zertuche *et al.*, 2002; González-Zertuche *et al.*, 2001; Olvera-Carrillo *et al.*, 2001). Se ha visto una mejor respuesta del priming natural (enterramiento) en estas variables respecto a otros tratamientos pregerminativos como el osmopriming (González-Zertuche *et al.*, 2001).

Los efectos de los tratamientos sobre las semillas de maíz se observaron desde la imbibición durante las primeras 24 horas de la germinación. La velocidad de este proceso fue mayor en las semillas ESS, seguido de las semillas ESNS (Figura 7). El porcentaje inicial de agua fue el mismo en las semillas control y en las semillas enterradas en suelo no salino, mientras que las semillas bajo hidropriming y las enterradas en suelo salino tuvieron el porcentaje significativamente mayor ($F_{(3, 56)} = 13.13$; $p = 0.000001$).

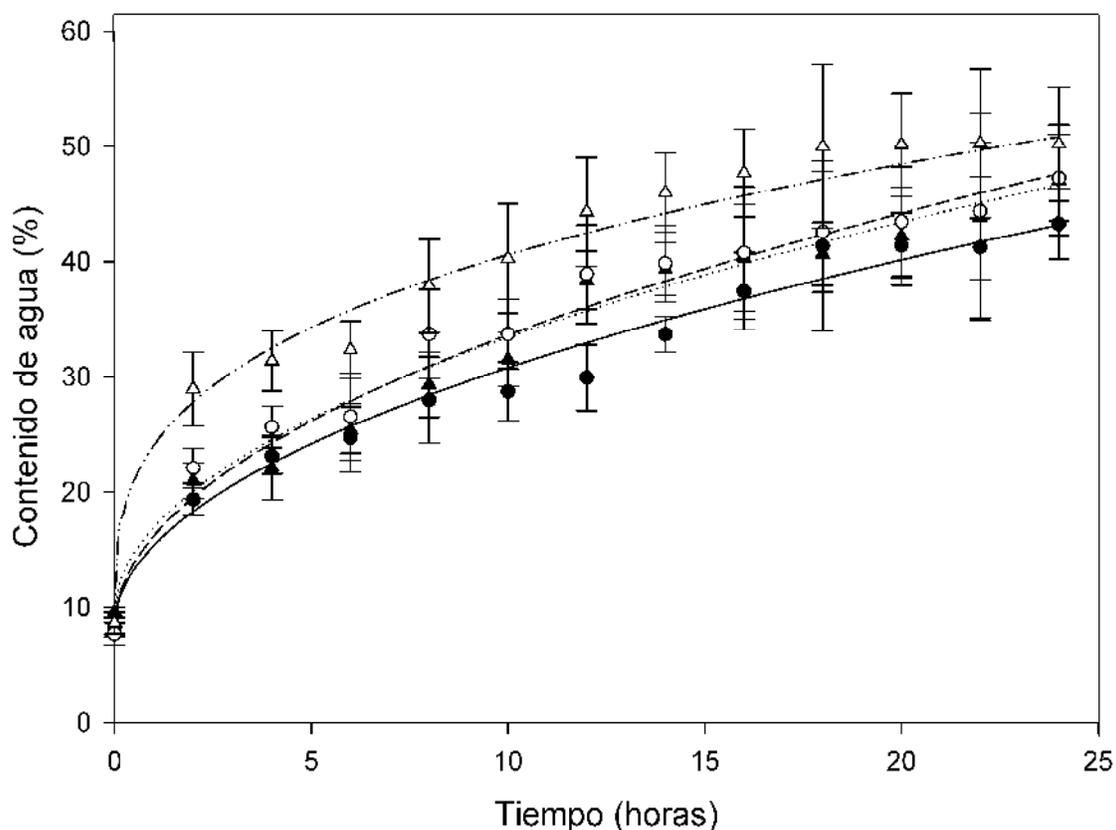


Figura 2. Curva de imbibición de agua en semillas de maíz durante las primeras 24 horas de la germinación de los tratamientos control (●; —), hidropriming (○; ···), semillas enterradas en suelo no salino (▲; —) y en suelo salino (△; - - -) en las cámaras de crecimiento. Para obtener la curva, se utilizaron 180 semillas de cada lote. Cada 2 h se sacaron del medio de incubación y se pesaron 15 semillas de cada lote cada 2 horas durante las primeras 24 horas de la germinación. El contenido de agua se estimó con base en el peso seco. Las letras indican las diferencias significativas ($p > 0.05$).

Las semillas ESS germinaron en un tiempo menor (24 horas; Figura 8a) y su tasa máxima de germinación fue significativamente mayor con respecto al resto de los tratamientos ($F_{(3, 12)} = 4.742$; $p = 0.020$). El tiempo promedio de germinación también difirió entre los tratamientos ($F_{(3,12)} = 33.475$; $p = 0.000004$), siendo menor en las semillas enterradas en el suelo salino (Figura 8b). El porcentaje final de germinación también tuvo diferencias significativas ($F_{(3,12)} = 13.03$; $p = 0.0004$), siendo mayor en las semillas de los tratamientos ESNS y

ESS.

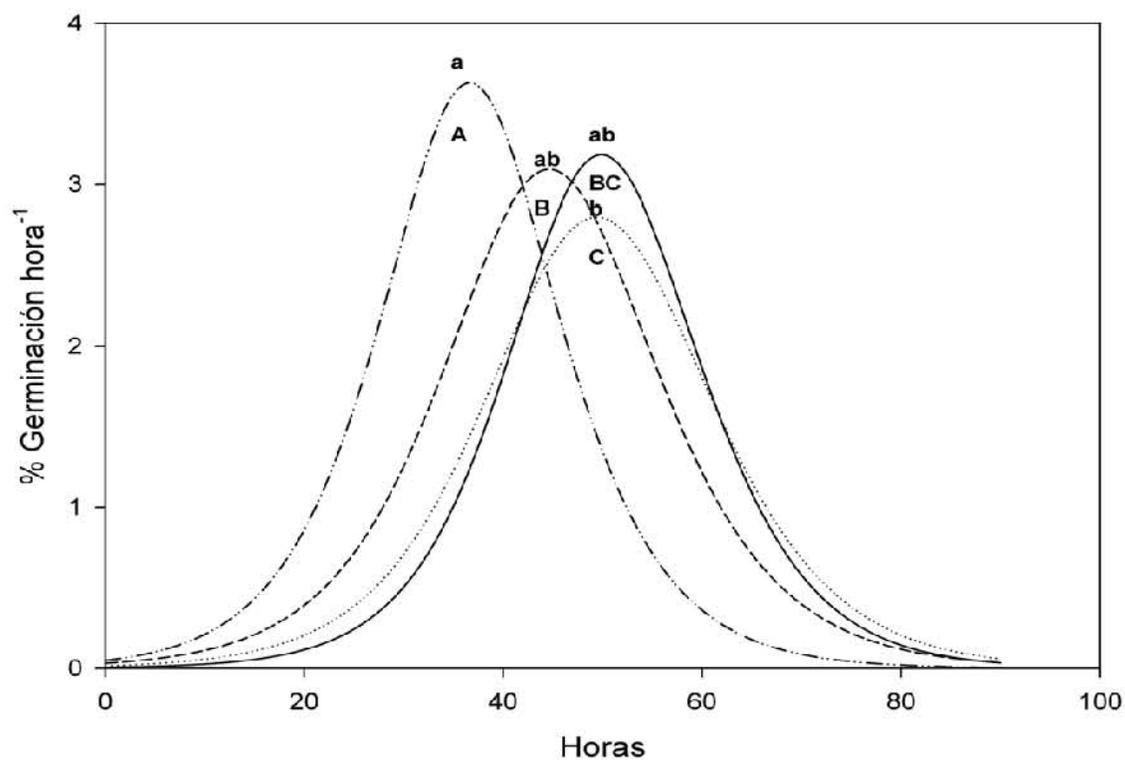
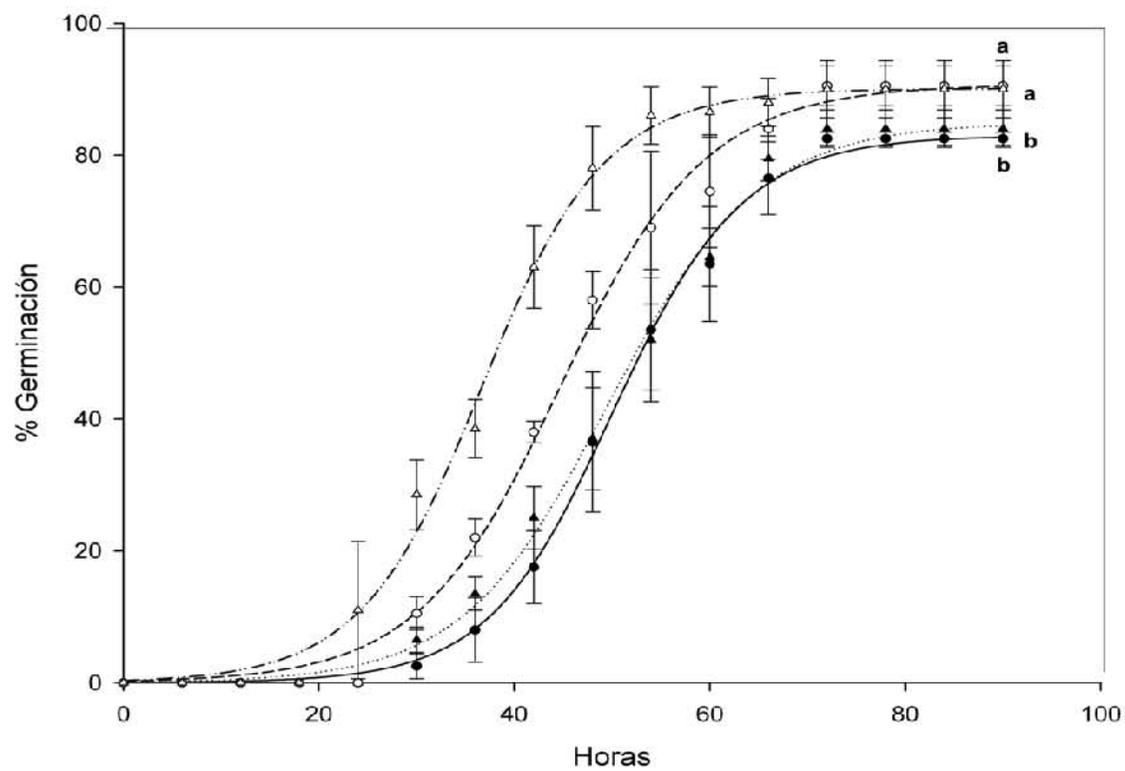


Figura 3. Curvas del porcentaje de germinación (a) y la tasa de germinación (b). El conteo semillas germinadas ($n = 50$, con cuatro repeticiones por tratamiento) se realizó cada seis horas durante 72 horas. La curva de la tasa de germinación se obtuvo con base en las pendientes de la curva de germinación, siendo el punto de inflexión la tasa de germinación máxima (derivada máxima). Los tratamientos son control (●; —), hidropriming (○; ····), semillas enterradas en suelo no salino (□; —) y en suelo salino (△; ----). Las letras en la gráfica superior muestran las diferencias significativas en el porcentaje final de germinación, mientras en la gráfica inferior las letras minúsculas muestran las diferencias significativas en la tasa máxima de germinación; las letras mayúsculas muestran las diferencias significativas en el tiempo medio de germinación.

Crecimiento

Los efectos del priming modifican también tanto los patrones de crecimiento y establecimiento de las plántulas como la asignación de recursos a sus distintas estructuras. Esta respuesta corresponde a una adaptación temprana de las plántulas al detectarse las señales de estrés ambiental desde la semilla (Zhang *et al.*, 2007 Iqbar y Ashraf, 2005; Cayuela *et al.*, 1995).

Durante los primeros 11 días de crecimiento de las plántulas de maíz, las diferencias significativas en las variables alométricas estuvieron en función del suelo donde fueron sembradas (Tabla 6).

Tabla 6. Coeficientes alométricos de plántulas de maíz a los 11 días de crecimiento en función del suelo donde fueron sembradas.

Variable	Suelo	Valores	F(p)
SLA ($\text{cm}^2_{\text{hoj}}/\text{g}_{\text{hoj}}$)	No salino	474.72 ^a	38.69(0.00001)
	Salino	270.84 ^b	
LAR ($\text{g}_{\text{planta}}/\text{cm}^2$)	No salino	0.0151 ^b	11.01(0.0013)
	Salino	0.0395 ^a	
SMR ($\text{g}_{\text{tallo}}/\text{g}_{\text{planta}}$)	No salino	0.0221 ^b	22.92 (0.00001)
	Salino	0.0349 ^a	

De acuerdo a la notación científica: SLA g^{-1} ; LAR: $g\ cm^{-2}$; SMR $g\ tallo\ g^{-1}$ total, estas diferencias continuaron en función del suelo hasta el día 22, excepto en la SMR, donde hubo diferencias significativas entre plántulas de diferentes tratamientos, encontrándose las mayores proporciones en las plántulas de los tratamientos CON y HP. Los factores suelo y tratamientos tuvieron efectos de manera independiente en esta variable, lo que se observa en las SMR de los tratamientos ESNS y ESS, que tuvieron valores significativamente menores, independientemente del tipo de suelo donde crecieron (Tabla 7).

Tabla 7. Coeficientes alométricos de plántulas de maíz de 22 días en función del suelo donde fueron sembradas y de los diferentes tratamientos pregerminativos de las semillas. N.S.= no significativo.

Variable	Suelo	Valores	F(p)	Tratamiento	Valores	F(p)
LMR (g_{hoja}/g_{planta})	No salino	0.2344 ^b	8.51(0.0045)	CON	-	N.S.
	Salino	0.2691 ^a		HP	-	
ESNS			-			
ESS	-					
LAR (g_{planta}/cm^2)	No salino	0.0092 ^a	6.22(0.0145)	CON	-	N.S.
	Salino	0.0077 ^b		HP	-	
ESNS			-			
ESS	-					
R/V	No salino	1.6451 ^a	36.26(0.00001)	CON	-	N.S.
	Salino	0.9154 ^b		HP	-	
ESNS			-			
ESS	-					
SMR (g_{tallo}/g_{planta})	No salino	0.1730 ^b	85.07(0.00001)	CON	0.2568 ^a	9.75(0.00001)
	Salino	0.2702 ^a		HP	0.2424 ^a	
ESNS			0.1940 ^b			
ESS	0.1931 ^b					

De acuerdo a la notación científica: LMR $g\ hoja\ g^{-1}\ planta$, y así en las siguientes variables, a lo largo de las cosechas, el incremento de biomasa entre las plántulas varió en función de los tratamientos, ya que mientras los tratamientos ESNS y ESS incrementaron su biomasa durante los primeros 15 días de crecimiento, los

tratamientos CON e HP lo hicieron hasta los 18 días, y en el caso del suelo salino, no volvieron a incrementar su biomasa de forma significativa (Figura 9).

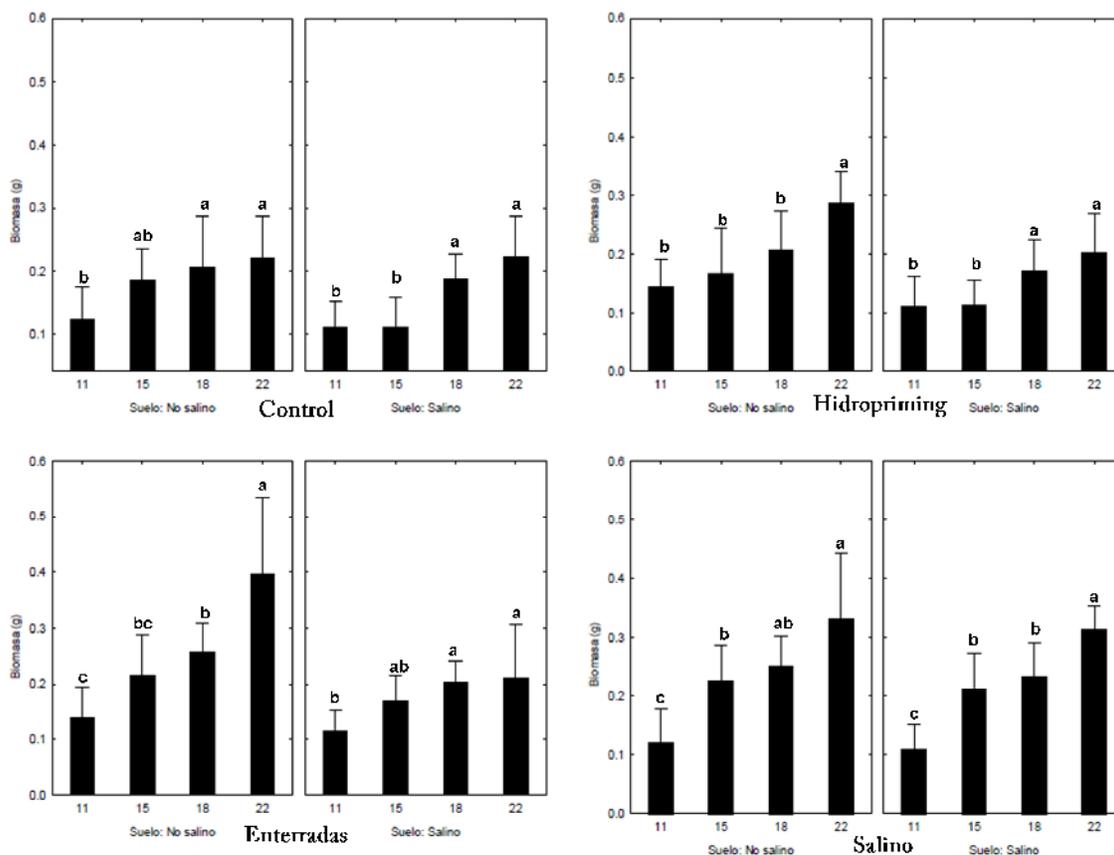


Figura 4. Incremento de la biomasa en plántulas ($n=12$) de las plántulas de maíz sometidas a diferentes tratamientos pregerminativos en suelos no salino y salino. Las abscisas son los días de colecta desde el día de la siembra. Las letras muestran las diferencias significativas entre días de colecta por cada tratamiento.

La biomasa final de las plántulas fue afectada por ambos factores, los cuáles interactuaron durante el experimento ($F_{(3,88)} = 6.06$; $p = 0.0008$). Mientras que en el suelo no salino se alcanzó una biomasa final significativamente mayor, las plántulas del tratamiento ESS tuvieron valores significativamente mayores en comparación a los tratamientos CON y HP (Tabla 8). Por otro lado, la tasa de crecimiento fue afectada significativamente tanto por los tratamientos como por el suelo y su interacción fue significativa ($F_{(3,88)} = 2.87$; $p = 0.04$). Las plántulas de semillas ESS sembradas presentaron la mayor tasa de crecimiento, independientemente del suelo donde fueron sembradas, mientras las plántulas de las semillas CON y HP en suelo salino, presentaron la tasa baja (Tabla 8; Figura 10).

Tabla 8. Valores de la biomasa hasta el día 22 y la tasa máxima de crecimiento de plántulas de maíz en función del suelo en donde se sembraron y de los diferentes tratamientos pregerminativos a los que se sometieron las semillas.

Variable	Suelo	Valores	F(p)	Tratamiento	Valores	F(p)
Biomasa final (g)	No salino	0.3082 ^a	16.6(0.0001)	CON	0.2214 ^c	7.56(0.0001)
				HP	0.2434 ^{bc}	
	Salino	0.2371 ^b		ESNS	0.3035 ^{ab}	
				ESS	0.3222 ^a	
Tasa máxima de crecimiento (log _e g día ⁻¹)	No salino	0.8797 ^a	4.35(0.0399)	CON	0.6170 ^c	25.07(0.00001)
				HP	0.3677 ^c	
	Salino	0.7161 ^b		ESNS	0.9338 ^b	
				ESS	1.2731 ^a	

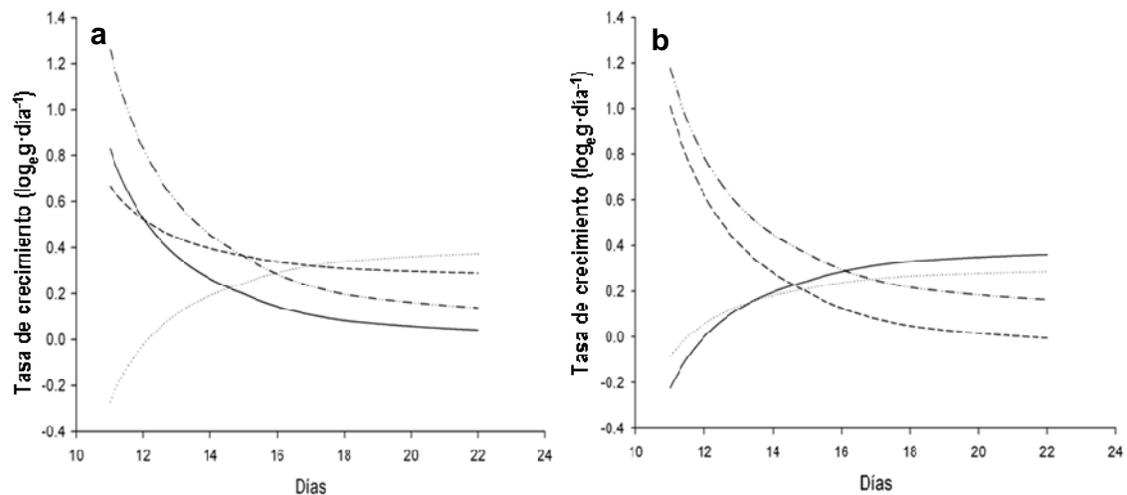


Figura 5. Curva de la tasa de crecimiento durante los cuatro muestreos realizados. Las cosechas de las plántulas fueron en suelos no salino (a) y salino (b). Los tratamientos son control (—), hidropriming (·····), semillas enterradas en suelo no salino (---) y en suelo salino (-·-·-).

Expresión de los genes DUF642

La expresión diferencial de los genes DUF642 en las semillas y durante el priming y la germinación ha sido descrita en *Brassica oleracea*, *Hordeum vulgare* y *A. thaliana* (Sreenivalusu, 2008 *et al.*, 2008; Soeda *et al.*, 2005; Garza-Caligaris, en

preparación). En semillas de maíz, los genes de la familia DUF642 A2 y A4 se expresan en el eje embrionario de las semillas control mientras que los genes A1 y B1 no se detectaron. El patrón de expresión no vario en las semillas enterradas (Figura 11).

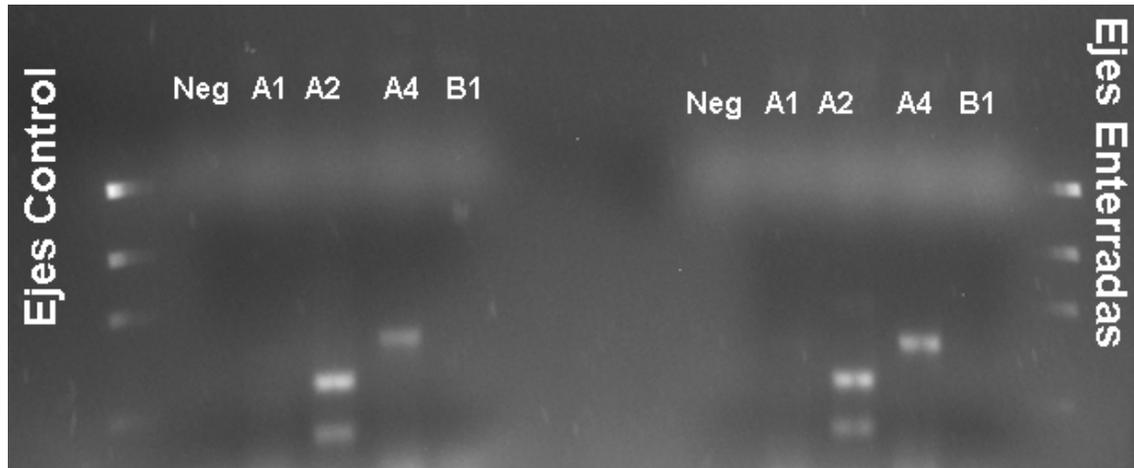


Figura 6. Expresión de los genes de la familia DUF 642 en ejes embrionarios de semillas enterradas y no enterradas.

El efecto del tratamiento solo se observó durante la germinación; la expresión de los genes A2 y A4 solo se detectó en las semillas enterradas (Figura 12).

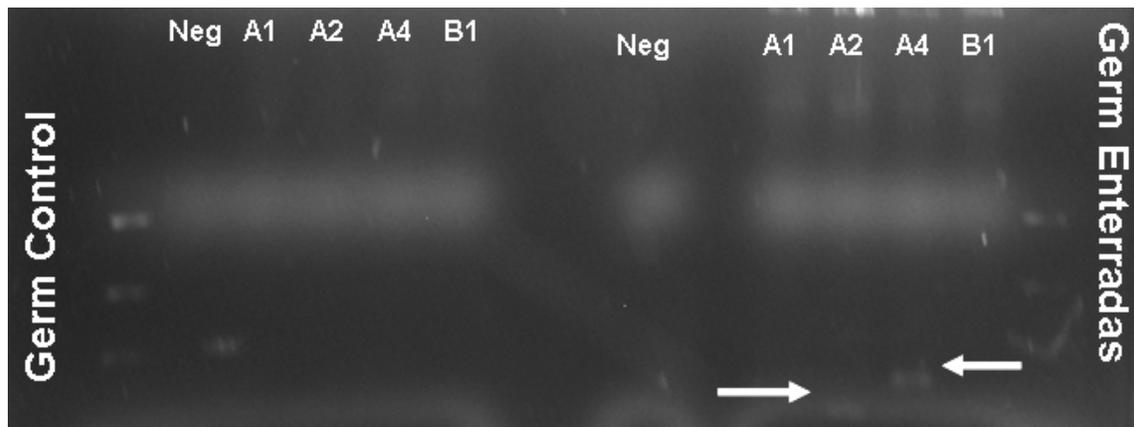


Figura 7. Expresión de los genes de la familia DUF 642 en embriones de semillas germinadas de los tratamientos control y enterradas. Las flechas indican la ubicación de las bandas.

Discusión

La tasa y el porcentaje final de imbibición en las semillas difirieron significativamente entre los diferentes tratamientos. A pesar de encontrarse completamente embebidas en agua, las semillas bajo HP presentaron una tasa de imbibición y un contenido final de agua tan bajos como CON, de manera que el agua no fue el factor que modificó la tasa de imbibición en los diferentes tratamientos. Por otro lado, las diferencias en el contenido final de agua en las semillas de los tratamientos de priming natural (ESNS y ESS) se debieron al tipo de suelo donde fueron enterradas. El suelo de jardinería no salino es permeable, tiene buen drenaje y permite el paso del aire, mientras que el suelo salino de Texcoco se observó poca permeabilidad, drenaje y sales disueltas, características que modificaron el ambiente en que las semillas fueron osmocondicionadas. Entre las diferentes respuestas de las plantas al estrés osmótico ocasionado por sales está la síntesis de compuestos orgánicos osmóticamente activos, como azúcares solubles o prolina, que disminuyen el potencial hídrico de las células y evitan la pérdida de agua, además de incrementar la cantidad de carotenoides (Zhang *et al.*, 2007; Kaya *et al.*, 2010). El cambio en el color de las semillas, la tasa de imbibición y el porcentaje final de agua de las semillas de maíz enterradas en suelo salino pudieron ser afectados por la síntesis de este tipo de compuestos osmóticos en respuesta a la entrada de Na^+ al embrión, y a una mayor concentración de carotenoides.

Al conservarse los efectos de los tratamientos de hidropriming y priming natural en las semillas después de su secado, éstas siguen respondiendo en función de las condiciones en que fueron embebidas, lo cual se observó en la curva de imbibición durante la germinación. Las semillas enterradas en suelo salino tuvieron la tasa de imbibición más alta durante las primeras 24 horas de germinación, lo que

dio como resultado una mayor imbibición en menor tiempo respecto del resto de los tratamientos. Las fases de la germinación están en función de la cantidad de agua embebida y del tiempo de imbibición, de manera que tanto en el tiempo de inicio y el tiempo medio de germinación, como en el incremento de la tasa máxima y el porcentaje final de germinación de las semillas, fueron afectados por la el patrón de imbibición bajo priming natural. Estos efectos ya se han descrito para especies de matorral xerófilo de sustratos basálticos, al tratarse las semillas con priming natural (*W. urens*, *D. viscosa* y *O. tomentosa*; Benítez-Rodríguez, 2005; González-Zertuche *et al.*, 2001; Olvera-Carrillo, 2001).

Los efectos del priming natural contribuyeron al crecimiento temprano de las plántulas de maíz mientras éstas dependieran de las reservas del cotiledón. En maíz, el priming natural promovió el crecimiento de las plántulas independientemente del tipo de suelo utilizado. Por otro lado, el tratamiento de hidropriming no mostró un efecto significativo sobre el incremento de biomasa o la tasa de crecimiento. La tasa de crecimiento de las plántulas con priming natural en el suelo salino pudo deber a una mayor tolerancia a la salinidad. Las adaptaciones a la tolerancia a la salinidad son al menos de mitigación de sus efectos y no propiamente una adaptación a la vida en medios salinos como lo reporta Zörb *et al.* (2004) a nivel molecular en tallos y raíces. Algunos de los mecanismos de tolerancia a la salinidad en maíz son la síntesis de la enzima aldehído deshidrogenasa y la acumulación de azúcares solubles en las raíces; mientras la primera contribuye a la reducción de malodialdehído (producto de la peroxidación de lípidos), los azúcares solubles incrementan la presión osmótica en la raíz, reteniendo una mayor cantidad de agua (Huang *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2002).

El suelo donde se enterraron las semillas tuvo un efecto directo en el crecimiento de las plántulas. La biomasa final de las plántulas ESS fue mayor en ambos tipos de suelo, mientras las plántulas del tratamiento ESNS se vieron afectada por el suelo donde se sembraron. Estas diferencias en las biomásas finales reflejan la aclimatización de las semillas al sustrato donde se establecerán, creciendo en función de las señales que percibieron. Resultados similares se han observado en semillas de *Lycopersicum esculentum*, donde un osmopriming con NaCl a 100 mM no sólo redujo el tiempo de germinación en condiciones de salinidad (70 y 140 mM NaCl), sino que también incrementó la concentración de ácidos

orgánicos y solutos de alta osmolaridad en las plántulas hasta 60 días después de la siembra (Cayuela *et al.*, 2001). El hidropriming y el priming con poliaminas en semillas de *Triticum aestivum* incrementaron la biomasa y la talla de las plántulas sembradas en dos sustratos de salinidad contrastantes, además de presentarse una mayor acumulación de sales en tallo y raíces, contribuyendo a aminorar la pérdida de agua durante su crecimiento en medios salinos (Iqbar y Ashraf, 2005). En estos casos, los tratamientos de priming además de conferir una mayor tolerancia a la salinidad, también otorgan beneficios a las plantas en estados avanzados de crecimiento, aclimatizándolas al medio donde crecen. La imbibición parcial de las semillas de maíz durante el enterramiento, pudo activar la síntesis y movilización de reservas, haciéndolos disponibles para el embrión en un tiempo menor que en las semillas CON y HP, esta movilización de reservas se ha observado en semillas tratadas con priming natural y se ha inferido que adelantan los procesos relacionados con la germinación (Alvarado-López, 2009). En maíz se han descrito este tipo de eventos en la etapa temprana de germinación (Bewley y Black, 1994). La disponibilidad temprana de recursos explicaría por que los tratamientos ESNS y ESS tuvieron las tasas de crecimiento más altas y por que se observaron durante los primeros días de crecimiento, lo que se tuvo como consecuencia que las plántulas tuvieran una mayor biomasa al final del experimento. De esta manera, el enterramiento no incrementa la tasa de crecimiento *per se*, sino que adelanta la disposición de recursos para la plántula, permitiendo su crecimiento y establecimiento en menor tiempo. Las adaptaciones que el priming natural otorga a las plántulas son resultado de las señales que la semilla percibe del suelo donde fueron enterradas (Alvarado-López, 2009), lo cuál tiene efectos sobre el crecimiento y la asignación de recursos en la plántula.

La única variable alométrica que fue afectada por los tratamientos de priming natural fue la SMR, la cuál fue menor que en CON y HP, lo cuál podría estar relacionado con la asignación de biomasa en la zona del vástago de la plántula como respuesta al crecimiento en condiciones salinas (Zhang *et al.*, 2007). Se ha observado que las condiciones en que se entierran las semillas pueden cambiar ciertas variables alométricas en las plántulas, lo cual puede tener implicaciones en su establecimiento. El enterramiento de semillas de *W. urens* en sitios contrastantes de luz (sitio abierto y bajo el dosel) afectó el SLA de las plántulas de semillas

enterradas bajo un dosel, siendo significativamente mayor que en las plántulas de semillas enterradas en el sitio abierto, lo cuál pudo tener consecuencias en el establecimiento de las plántulas en sitios con menor incidencia de luz (González-Zertuche *et al.*, 2001). Una SMR más baja en los tratamientos de priming natural indicaría que no toda la biomasa se asigna al vástago, sino a la raíz, lo cuál se interpreta como una mayor tolerancia de las plántulas a los sustratos salinos de acuerdo a Zhang *et al.* (2007). Sin embargo, esto requeriría de mayores estudios o repeticiones, pues la R/V no refleja de manera significativa este hecho.

Los genes de la familia DUF642 se expresan de manera diferencial durante la maduración y la germinación de semillas de diferentes especies de plantas, incluyendo monocotiledóneas (Vázquez-Lobo, en preparación). El enterramiento de las semillas de *A. thaliana* promueve la expresión de dos genes del clado A, que no se expresan bajo otra condición de priming o de estrés abiótico mientras que un gen del clado B esta presente en las semillas CON durante los primeros seis meses de almacenamiento (Garza-Caligaris, en preparación). Las semillas de maíz no presentaron diferencias en función del tratamiento; se detectó la presencia de dos genes del clado A desde las semillas CON y no se detectó al gen del clado B. Estas semillas fueron adquiridas comercialmente, por lo que no se pudo determinar ni la edad ni las condiciones de almacenamiento, circunstancias que han afectado la expresión de los genes de esta familia en *A. thaliana*. Por lo tanto es necesario hacer este tipo de determinaciones en semillas obtenidas directamente de la planta madre.

El que no se pudieran detectar los genes A1 y B1, también se puede deber a un diseño inadecuado de los oligos, por la posible diferencia entre las secuencias de las distintas variedades de maíz. La información obtenida en la base de datos para diseñar los oligos es de una variedad de maíz diferente a la utilizada en este estudio, lo que sugiere la necesidad de construir los vectores a partir de oligos “indeterminados” y secuenciar los genes para obtener oligos acordes a esta variedad. Una vez solucionado este inconveniente, se podrá saber la homología que tienen estas secuencias con *A. thaliana* y poder determinar si estos genes son ortólogos o parálogos, lo cual tendría una importancia evolutiva al inferirse si la función de las proteínas DUF642 se ha conservado a lo largo de este proceso en plantas vasculares.

Conclusiones.

- El incremento de la germinación y el crecimiento como consecuencia del enterramiento de las semillas de maíz en diferentes tipos de suelo durante 24 horas es similar al descrito para el tratamiento de priming natural en plantas silvestres.
- El crecimiento de las plántulas en los diferentes tipos de suelo se encuentra en función del tratamiento de priming, en el caso del priming natural, se encuentra en función del suelo donde las semillas fueron enterradas, tal como se ha descrito en semillas tratadas con priming natural y artificial.
- Enterrar a las semillas de maíz durante 24 horas y secarlas, es suficiente para que éstas adelanten los procesos metabólicos relacionados con la germinación, así como aclimatizarlas a las diferentes condiciones ambientales que enfrentarán durante el establecimiento de la plántula.
- Se requieren más estudios para saber si existe una expresión diferencial en los genes DUF642 en semillas de maíz.
- El priming natural en semillas de maíz mostró que dentro de las semillas hay un sistema de percepción y procesamiento de las señales ambientales que aún no ha sido identificado y descrito.

Perspectivas.

- Obtener las semillas de maíz directamente de la planta madre y no de distribuidores comerciales, esto significa tener cultivos de la variedad chalqueño.
- Construir los oligos con base en la secuencia de la variedad de maíz que se planeé estudiar, pues esta puede cambiar entre variedades.
- Iniciar estudios más detallados sobre las proteínas involucradas en la toma y comunicación de las señales ambientales en la semilla, pues éstas esclarecerían la forma en que las semillas obtienen y procesan estas señales durante el enterramiento.

Literatura consultada

- Alvarado-López, S. 2009. Movilización de las proteínas de reserva en respuesta al osmocondicionamiento natural en las semillas de plantas de la Reserva del Pedregal. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 67 pp.
- Armenta-Jaime, S. 2007. Efecto del priming natural en la movilización de carbohidratos en la germinación de semillas de *Dodonaea viscosa*: el papel de las invertasas ácidas. Tesis de Licenciatura (Químico en Alimentos). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 64 pp.
- Ashraf M. y H. Rauf. 2001. Inducing salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) through seed priming with chloride salts: Growth and ion transport at early growth stages. *Acta Physiologiae Plantarum*. 23: 407-414.
- Baskin, C.C., y I.M. Baskin. 1998. *Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press. 666 pp.
- Bayer, E.M., A.R. Bottrill, J. Walshaw, M. Vigoroux, M.J. Naldrett, C.L. Thomas y A.J. Maule. 2006. *Arabidopsis* cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *Proteomics*. 6: 301-311.
- Bewley, D. J. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. 9: 1055-1066.
- Bewley, D. J., y M. Black. 1994. *Seeds. Physiology of Development and Germination*. 2º ed. Plenum Press. 445 pp
- Bonhert, H.J. 2007. Abiotic stress. *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd. 9 pp.
- Botella, M.A., A. Rosado, R.A. Bressan y P.H. Hasegawa. 2005. Plant adaptative responses to salinity stress. En: *Plant Abiotic Stress*. M.A. Jenks y P.M. Hasegawa (Eds). Blackwell Publishing. 37-70 pp.
- Boudart, G., E. Jamet, M. Rossignol, C. Lafitte, G. Borderies, A. Jauneau, M.T. Esquerré-Tugayé y R. Pont-Lezica. 2005. Cell wall proteins in apoplastic fluid of *Arabidopsis thaliana* rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics*. 5: 212-221.
- Bove, J., M. Jullien, y P. Grappin. 2001. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology* 3: 1-5.
- Benítez-Rodríguez, J.L. 2005. Estudio ecofisiológico de germinación y crecimiento de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. con fines de restauración en zonas perturbadas del valle de México. Tesis de Maestría (Maestría en Ciencias Biológicas con orientación en Restauración Ecológica). Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. 60 pp.
- Bradford, K. J., F. Chen, M.B. Cooley, P. Dahal, B. Downie, K.K. Fukunaga, O.H. Gee, S. Gurusinghe, R.A. Mella, H. Nonogaki, C-T, Wu y K-O, Yim. 2000. Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. En: *Seed Biology. Advances and Applications*. M. Black, K.J. Bradford, y J. Vázquez-Ramos (Eds). CABI Publishing. 231-251 pp.
- Butola, J.S., y H.K. Badola. 2004. Effect of pre-sowing treatment on seed germination and seedling vigour in *Angelica glauca*, a threatened medicinal herb. *Current Science*. 87: 796-799.
- Casasola, P. 1996. *Vida y obra de granos y semillas*. Fondo de Cultura Económica. 208 pp.

- Castro-Colina, L. 2007. Endurecimiento de semillas y sus consecuencias en el establecimiento y crecimiento de plántulas de *Quercus rugosa* Née con fines de restauración en zonas perturbadas del Ajusco. Tesis de Maestría (Maestría en Ciencias Biológicas). Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. 96 pp.
- Carrera, E., Holman, T., Medhurst, A., Dietrich, D., Footitt, S., Theodoulou, F.L. y M.J. Holsworth 2008. Seed after-ripening is a discrete developmental pathway associated with specific gene networks in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 53:214-224.
- Cayuela, E., F. Pérez-Alfocea, M. Caro y M. Bolarín. 2001. Priming with NaCl induces physiological change in tomato plants under salt stress. *Physiologia Plantarum*. 96: 231-236.
- Chen, MH, J. Sheng, G. Hind, A.K Handa y V. Citovsky. 2000. Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylsterases is required for viral cell-to-cell movement. *The EMBO Journal*. 19: 913-920.
- Cruickshank, G. 1994. Proyecto Lago de Texcoco. Rescate Hidroecológico. CNA-SMISA, A.C., México.
- Cruz-García, F., A.Gómez, J.J. Zúñiga, J. Plascencia y J.M. Vázquez-Ramos. 2003. Cloning and characterization of a COBRA-like gene expressed *de novo* during maize germination. *Seed Science Research*. 13: 209-217.
- Cruz-García, F., L.F. Jiménez y J.M. Vázquez-Ramos. 1995. Biochemical and cytological studies on osmoprimed maize seeds. *Seed Science Research*. 5: 15-23.
- Dahal, P. y K. J. Bradford. 1990. Effects of priming and endosperm integrity on seed germination rates of tomato genotypes: II. Germination at reduced water potential. *Journal of Experimental Botany* 41(11): 1441-1453.
- Dommes J. y C. Van de Walle. 1983. Newly synthesized mRNA is translated during the initial imbibition phase of germinating maize embryo. *Plant Physiology*. 73: 484-487.
- Dubrovsky, J.G. 1996. Seed hydration memory in sonoran desert cacti and its ecological implication. *American Journal of Botany*. 83: 624-632.
- Dure, L.S. 1969. Gross nutritional contributions of maize endosperm and scutellum to germination growth of maize axis. *Plant Physiology*. 35: 919-925.
- Farooq, M., T. Aziz, S. M. A. Basra, M. A. Cheema, y H. Rehman. 2008. Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 194: 161-168.
- Feng, G., F. S. Zhang, X. L. Li, C. Y. Tian, C. Tang y Z. Rengel. 2002. Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza*. 12: 185 – 190.
- Gallardo, K., C. Job, S.P.C. Groot, M. Puype, H. Demol, J. Vandekerckhove, y D. Job. 2001. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiology*. 126: 835-848.
- Gallardo, K., C. Job, S.P.C. Groot, M. Puype, H. Demol, J. Vandekerckhove, y D. Job. 2002. Proteomics of *Arabidopsis* seed germination. A comparative study of wild type and gibberelin-deficient seeds. *Plant Physiology*. 129: 823-827.

- Gamboa-deBuen, A., R. Cruz Ortega, E. Martínez-Barajas, M.E. Sánchez-Coronado y A. Orozco-Segovia. 2006. Natural priming as an important metabolic event in the life history of *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae) seeds. *Physiologia Plantarum*. 128: 520-230.
- Garza-Caligaris, L. E. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas (En preparación)
- Gobierno del Estado de México 2000. Ordenamiento Territorial y Ecológico del Municipio de Texcoco. Gobierno del Estado de México.
- Gómez-Calderas, A. 2008. Regulación de la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación del maíz. Tesis de Licenciatura (Químico en Alimentos). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 89 pp.
- González-Zertuche, L. 2005. Tratamientos de endurecimiento en semillas de *Buddleja cordata* (Longaniaceae) y *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae), dos especies útiles para reforestar o restaurar áreas perturbadas. Tesis de Doctorado (Doctorado en Ciencias). Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. 138 pp.
- González-Zertuche, L., A. Orozco-Segovia, C. Baskin and J.M. Baskin. 2002. Effects of priming on germination of *Buddleja cordata* ssp. *cordata* (Longaniaceae) seeds and posible ecological significance. *Seed Science and Technology*, 30: 535-548.
- González-Zertuche, L., A. Orozco-Segovia, y C. Vázquez-Yanes. 2000. El ambiente de la semilla en el suelo: su efecto en la germinación y en la sobrevivencia de la plántula. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 65: 73-81.
- González-Zertuche, L., C. Vázquez-Yanes, A. Gamboa, M.E. Sánchez-Coronado, P. Aguilera and A. Orozco-Segovia. 2001. Natural priming of *Wigandia urens* seeds during burial: effects on germination, growth and protein expression. *Seed Science Research*. 11: 27-34.
- Gummerson, R.J. 1986. The effect of constant temperatures and osmotic potentials on the germination of sugar beet. *Journal of Experimental Botany* 37(6): 729-741.
- Gurevitch, J., Schneier, S. y Fox, G., 2002. *The Ecology of Plants*, Sinauer Associates Inc. 523 pp.
- Horbowicz, M., y R. L. Obendorf. 1994. Seed desiccation tolerance and storability: Dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyditols review and survey. *Seed Science Research*. 4: 385-405.
- Huang, W., X. Ma, Q. Wang, Y. Gao, Y. Xue, X. Niu, G. Yu y Y. Liu. 2008. Significant improvement of stress tolerance in tobacco plants by overexpressing a stress-responsive aldehyde dehydrogenase gene from maize (*Zea mays*). *Plant Molecular Biology*. 68: 451 – 463.
- Iqbal, M. y M. Ashraf. 2005. Changes in growth, photosynthetic capacity and ionic relations in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) due to pre-sowing seed treatment with polyamines. *Plant Growth Regulation*. 46: 19-30.
- Job, D., I. Capron, C. Job, F. Dacher, F. Corbineau, y D. Côme. 2000. Identification of germination-specific protein markers and their use in seed priming technology. En: *Seed Biology. Advances and Applications*. M. Black, K.J. Bradford, y J. Vázquez-Ramos (Eds.). CABI Publishing.
- Kaya, C., A. Levent-Tuna, M. Dikilitas y M.A. Cullu. 2010. Responses of some enzymes and key growth parameters of salt-stressed maize to foliar and seed applications of kinetin and indole acetic acid. *Journal of Plant Nutrition*. 33: 405-422.

- Koster, K.L., y A.C. Leopold. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology*. 88: 829-832.
- Laurière, C., C. Doyen, C. Thévenot y J. Daussant. 1992. α -amylase in cereals. A study of maize α -amylase system. *Plant Physiology*. 100: 887-893.
- Leszek, P. y D. Vincent. 2002. *Zea mays* (Corn). *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd. 7pp.
- Leubner-Metzger, G., C. Frundt, R. Vogeli-Lange, y F. Meins Jr. 1995. Class I α -1, 3-glucanases in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiology*. 109: 751-759.
- Li, Z. y H.N. Trick. 2005. Rapid method for high-quality RNA isolation from seed endosperm containing high levels of starch. *BioTechniques*. 38: 872-876.
- Malhorta, R.S. y T. Blake. 2005. Breeding for salinity tolerance. En: *Abiotic Stresses. Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches*. M. Ashraf y P.J.C. Harris (Eds). Food Products Press. 125-143 pp.
- Marraccini, P., W.J. Rogers, C.A. Andre, V. Caillet, N. Lacoste, F. Lausanne y S. Michaux. 2001. Molecular and biochemical characterization of endo- β -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta*. 213: 296-308.
- Martínez-Silva, A.V. 2006. Clonación de genes inducidos durante la germinación del maíz. Tesis de Maestría (Maestría en Ciencias Bioquímicas). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 82 pp.
- McDonald, M.B. 2000. Seed priming. En: *Seed Technology and its Biological Basis*. M. Black y D. Bewley (Eds). 287-325. Wiley Blackwell.
- Michel, B.E. 1983. Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiology*. 72(1): 66-70.
- Michel, B.E., y M.R. Kaufmann. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*. 51(5): 914-916.
- Minic, Z., E. Jamet, L. Négroni, P.A. der Garabedian, M. Zivy y L. Jouanin. 2007. A sub-proteome of *Arabidopsis* mature stems trapped on Concanavalin A is enriched in cell wall glycoside hydrolases. *Journal of Experimental Botany*. 82: 1-10.
- Moradi-Dezfoli, P., F. Sharif-Zadeh y M. Janmohammadi. 2008. Influence of priming techniques on seed germination behavior of maize inbred lines (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Biological Science*. 3(3): 22-25.
- NCBI. 2009. NCBI Blast: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Nonogaki, H. 2008. Seed germination and reserve mobilization. *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd. 9pp.
- Nonogaki, H., O.H. Gee y K. Bradford. 2000. A germination-specific endo- α -mannase is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiology*. 123: 1235-1246.
- Nonogaki, H., F. Chen, y K.J. Bradford. 2007. Mechanisms and genes involved in germination *sensu stricto*. En: *Seed Development, Dormancy and Germination*. K. J. Bradford y H. Nonogaki (Eds). Blackwell Publishing. 265-304.
- Obendorf, R. L. 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research* 7: 63-74.

- Olvera-Carrillo, Y. 2001. Estudio ecofisiológico de la germinación, sobrevivencia y crecimiento de *Opuntia tomentosa* S.D. en la Reserva del Pedregal de San Ángel. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 95 pp.
- Orozco-Segovia, A., J. Márquez-Guzmán, M.E. Sánchez-Coronado, A. Gamboa-deBuen, J.M. Baskin y C. C. Baskin. 2007. Seed anatomy and water uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). *Annals of Botany*. 99: 1-12.
- Ortiz-Olguin, M. 1999. Acumulación de iones y desarrollo de halófitas en suelos salino-sódicos del ex-lago de Texcoco, México. Tesis de Doctorado (Doctorado en Ciencias Biológicas). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 265 pp.
- Ostergaard, L y M.F. Yanofsky. 2004. Establishing gene function by mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 39: 682-696.
- Pammenter, N. W., y P. Berjak. 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9: 13-37.
- Rajjou, L., K. Gallardo, I. Debeaujon, J. Vandekerckhove, C. Job, y D. Job. 2004. The Effect of ABA on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiology*. 134 (4): 1598-1613.
- Ramírez-Sóstenes, J.L. 2008. Alteraciones en el metabolismo de carbono durante el priming natural de semillas de *Opuntia tomentosa*. Tesis de Licenciatura (Químico en Alimentos). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 83 pp.
- Ren, C. y A.R. Kermode. 2000. An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds. *Plant Physiology*. 124: 231-242.
- Reyna-Llorens, I.A. 2008. El papel del estrés oxidativo durante el endurecimiento (priming) en semillas de *Dodonaea viscosa* (L). Jacq. Sapindaceae. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 54 pp.
- Sánchez, J.A., R. Orta, y B. Muñoz. 2001. Tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de las semillas y sus efectos en plantas de interés agrícola. *Agronomía Costarricense* 25(1): 67-92.
- Sánchez-Martínez, D., P. Puigdomènech y M. Pagès. 1986. Regulation of gene expresión in developing *Zea mays* embryos. *Plant Physiology*. 82: 543-549.
- Santini-González, B.A. 2009. Efecto del preacondicionamiento (priming) y la liberación oportuna de las semillas retenidas sobre el éxito del establecimiento en la especie serótina *Mammillaria hemandenzii* (Cactaceae). Tesis de Maestría (Maestría en Ciencias Biológicas). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 44pp.
- SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las condiciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 85pp.
- Skrinder, K. y J. Mundy. 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Cell*. 2: 503-512.
- Soeda, Y., M.C.J.M. Konings, O. Vorst, A.M.M.L. van Houwelingen, G.M. Stoop, C.A. Maliepaard, J. Kodde, R.J. Bino, S.P.C. Groot, y A.H.M. van der Geest. 2005. Gene expression programs during *Brassica*

- oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiology*. 137(1): 354-368.
- Sreenivasulu, N., Usadell, B., Winter, A., Radchuk, V., Scholz, U., Stein, N., Weschke, W., Strickert, M., Close, T.J., Stitt, M., Graner, A. y U. Wobus. 2008. Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiology*. 146: 1738-1758.
- Srivastava, L.M. 2002. *Plant Growth and Development. Hormones and Environment*. Academic Press. 772 pp.
- Styer, R.C. y D.J. Cantliffe. 1984. Dependence on seed vigour during germination on carbohydrate source in endosperm mutants of maize. *Plant Physiology* 76: 196-200.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. *Plant Physiology*. 4th Edition. Sinauer Associates Inc. 764 pp.
- The Arabidopsis Information Resource. 2009. TAIR Homepage: <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>
- Todaka, D., H. Matsushima, y Y. Morohashi. 2000. Water stress enhances α -amylase activity in cucumber cotyledons. *Journal of Experimental Botany*. 51: 739-745.
- Vázquez-Lobo, A., Zúñiga-Sánchez, E., Piñero, D. y A. Gamboa-deBuen. Phylogeny of the SUUP (DUF642) multigene family: a highly conserved and specific spermatophyte family of cell wall proteins. En preparación.
- Vázquez-Yanes, C., A. Orozco-Segovia, M. Rojas-Aréchiga, M.E. Sánchez Coronado, y V. Cervantes. 2000. *La Reproducción de las Plantas: Semillas y Meristemos*. Fondo de Cultura Económica.
- Wehmeyer, N., y E. Vierling. 2000. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiology*. 122: 1099-1108.
- Zhang, C.F., J. Hu, J. Lou, Y. Zhang y W.M. Hu. 2007. Sand priming in relation to physiological changes I seed germination and seedling growth of waxy maize under high-salt stress. *Seed Science and Technology*. 35: 733-738.
- Zörb, C., S. Schmitt, A. Neeb, S. Karl, M. Linder y S. Schubert. 2004. The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. *Plant Science*. 167: 91-100.
- Zúñiga-Sánchez, E. 2007. Análisis de la expresión de una familia de proteínas de función desconocida, DUF642 en *Arabidopsis thaliana* y su posible papel en las vías de transducción de señales durante el desarrollo. Tesis de Maestría (Maestría en Ciencias Biológicas). Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Zúñiga-Sánchez, E. y A. Gamboa-deBuen. 2009. Proteins involved in cell wall dynamic during different plant reproduction processes. En: Gamboa-deBuen, A., A. Orozco-Segovia y F. Cruz-García (Eds). *Functional Diversity of Plant Reproduction*. Research Singpost. India.

Anexos

Método para medir la salinidad del suelo con la técnica de pasta saturada.

1. Agregar suelo a una probeta de 500mL.
2. Agregar agua destilada hasta saturar el suelo, de modo que quede como una pasta.
3. En una cámara de vacío, filtrar el agua de la pasta saturada. obtener al menos 30mL de agua filtrada.
4. Las mediciones se realizan con conductivímetro. Las lecturas se toman en dSm^{-1}

Extracción de RNA total de semillas con altas concentraciones de carbohidratos.

1. Moler 100 mg de tejido en nitrógeno líquido.
2. Transferir el tejido molido a tubos de centrifuga.
3. Agregar 400 μL de Buffer (Tris HCl pH 8, 100mM (5mL); LiCl 150 mM (187 μL); EDTA 50 mM (10 μL); SDS 1.5% en stock al 10% (1.5mL); Mercapto 1.5% en stock al 100% (150 μL). Se afora a 10 mL).
4. Agregar 250mL de fenol-cloroformo-alcohol. Mezclar por inversión.
5. Centrifugar las muestras a 13,000 g durante 15 minutos a 4°C.
6. Transferir ~250 μL de la fase acuosa a un tubo con 250 μL de Buffer II (Citrato de sodio 0.75M (2.2 g); Laurin sarcosin 10%; Acetato de sodio pH 4, 2 M. Se afora a 3mL y se agregan 7mL deTrizol). Mezclar por agitación o inversión.
7. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Agregar cloroformo-alcohol isoamílico (200 μL).
9. Centrifugar a 13,000g durante 15 minutos a 4°C.
10. Recuperar el sobrenadante.
11. Agregar 300 μL de isopropanol y 210 μL de CaCl_2 1.2 M. Mezclar por inversión.

12. Incubar 15 minutos en hielo.
13. Centrifugar a 13,000 g durante 15 minutos a 4°C.
14. Desechar el sobrenadante.
15. Lavar los pellets con 400 µL de etanol al 70%.
16. Secar los pellets en campana de extracción durante 15-20 minutos.
17. Resuspender en 20 µL de ddH₂O.

Síntesis de cDNA.

1. En un tubo de microcentrífuga se añaden:
 - 1 µL de Oligo(dT).
 - 2 µL de RNA.
 - 9 µL de dH₂O
2. Se calienta la mezcla a 65°C durante cuatro minutos. Después de calentarlo, se coloca el tubo en hielo. A continuación se agregan:
 - 4 µL de Buffer 5X First-Strand.
 - 2 µL de DTT 0.1M.
 - 1 µL de dNTP.
3. Se calienta la mezcla a 42°C durante dos minutos.
4. A continuación se agrega 1 µL (200 unidades) de enzima SuperScript II y se deja a 42°C durante 50 minutos.
5. Después se calienta a 70°C durante 15 minutos para inactivar la reacción.
6. El contenido final se utiliza para las pruebas de RT-PCR o se puede almacenar a -4°C.

Análisis estadísticos.

Prueba de T sobre salinidad de suelos.

T-test for Independent Samples (Spreadsheet32)											
Note: Variables were treated as independent samples											
Group 1 vs.	Mean	Mean	t-value	d	p	Valid	Valid	Std.D	Std.D	F-rati	p
Group	Group	Group				Group	Group	Group	Group	Varian	Varian
Salino vs. C	4.933	0.001	35.30	4	0.000	3	3	0.241	0.000	9242	0.000

Prueba de Kruskal-Wallis sobre la tasa de imbibición de las semillas durante el priming

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Var2 (Spreadsheet19) Independent (grouping) variable: Var1 Kruskal-Wallis test: H (2, N= 45) =4.177005 p =.1239			
Depend.: Var2	Code	Valid N	Sum of Ranks
Hidropriming	103	15	263.0000
Enterradas	104	15	405.0000
Salino	105	15	367.0000

Median Test, Overall Median = 257561E; Var2 (Spreadsheet19) Independent (grouping) variable: Var1 Chi-Square = 4.980237 df = 2 p = .0829				
Dependent: Var2	Hidropriming	Enterradas	Salino	Total
<= Median: observed	11.00000	5.00000	7.00000	23.00000
expected	7.66667	7.66667	7.66667	
obs.-exp.	3.33333	-2.66667	-0.66667	
> Median: observed	4.00000	10.00000	8.00000	22.00000
expected	7.33333	7.33333	7.33333	
obs.-exp.	-3.33333	2.66667	0.66667	
Total: observed	15.00000	15.00000	15.00000	45.00000

ANOVA sobre el porcentaje de agua al final de los tratamientos de priming

Univariate Tests of Significance for Tasa de imbibición (Spreadsheet20) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	112719.8	1	112719.8	59896.67	0.000000
Tratamiento	234.6	3	78.2	41.56	0.000000
Error	105.4	56	1.9		

Prueba de Tukey de los porcentajes de agua el final de los tratamientos de priming. Las diferencias significativas están por debajo de $p=0.05$

Tukey HSD test; variable Tasa de imbibición (Spreadsheet2) Homogenous Groups, alpha = .05000 Error: Between MS = 1.8819, df = 56.000					
Cell No.	Tratamiento	Tasa de imbibición Mean	1	2	3
1	Control	41.14355		****	
2	Hidropriming	42.48774	****		
3	Enterradas	43.22830	****		
4	Salino	46.51463			****

ANOVA de la tasa de imbibición durante la germinación.

Univariate Tests of Significance for Tasa de imbibición (Spreadsheet20) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	112719.8	1	112719.8	59896.67	0.000000
Tratamiento	234.6	3	78.2	41.56	0.000000
Error	105.4	56	1.9		

Prueba de Tukey de la tasa de imbibición durante la germinación. Las diferencias significativas están por debajo de $p = 0.05$

Tukey HSD test; variable Tasa de imbibición (Spreadsheet20) Homogenous Groups, alpha = .05000 Error: Between MS = 1.8819, df = 56.000					
Cell No.	Tratamiento	Tasa de imbibición Mean	1	2	3
1	Control	41.14355		****	
2	Hidropriming	42.48774	****		
3	Enterradas	43.22830	****		
4	Salino	46.51463			****

ANOVA de los porcentajes iniciales de agua en semillas de maíz

Univariate Tests of Significance for Var2 (Spreadsheet) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	17297.31	1	17297.31	23656.94	0.000000
"Var1"	28.81	3	9.60	13.13	0.000001
Error	40.95	56	0.73		

LSD de los porcentajes iniciales de agua en semillas de maíz. Las diferencias significativas están por debajo de $p = 0.05$.

LSD test; variable Var2 (Spreadsheet76) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .73117, df = 56.000					
Cell No.	Var1	{1}	{2}	{3}	{4}
		16.742	18.007	16.086	17.080
1	Control		0.000159	0.040150	0.283959
2	Hidropriming	0.000159		0.000000	0.004388
3	Enterradas	0.040150	0.000000		0.002381
4	Salino	0.283959	0.004388	0.002381	

ANOVA del tiempo medio de germinación en semillas de maíz.

Univariate Tests of Significance for Var2 (Spreadsheet)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	#####	1	#####	#####	#####
"Var1"	378.63	3	126.21	33.475	#####
Error	45.24	12	3.77		

Prueba de Tukey del tiempo medio de germinación en semillas de maíz. Las diferencias significativas están por debajo de $p = 0.05$.

Tukey HSD test; variable Var2 (Spreadsheet)					
Homogenous Groups, alpha = .05000					
Error: Between MS = 3.7702, df = 12.000					
Cell No.	Var1	Var2 Mean	1	2	3
4	Salino	#####			****
3	Enterradas	#####	****		
2	Hidropriming	#####	****	****	
1	Control	#####		****	

ANOVA del porcentaje final de germinación en semillas de maíz.

Univariate Tests of Significance for Porcentaje final (Spreadsheet)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	#####	1	#####	#####	#####
"Var1"	0.3719	3	0.1240	13.03	#####
Error	0.1141	12	0.0095		

Prueba de Tukey del porcentaje final de germinación en semillas de maíz. Las diferencias significativas están por debajo de $p = 0.05$.

Tukey HSD test; variable Porcentaje final (Spreadsheet)					
Homogenous Groups, alpha = .05000					
Error: Between MS = .00951, df = 12.000					
Cell No.	Var1	Porcentaje final Mean	1	2	
2	Hidropriming	5.054816	****		
1	Control	5.091715	****		
4	Salino	5.352380		****	
3	Enterradas	5.398261		****	

ANOVA de la tasa máxima de germinación en semillas de maíz.

Univariate Tests of Significance for Tasa máxima (Spreadsheet)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	#####	1	#####	#####	#####
Tratamiento	#####	3	#####	4.7425	#####
Error	#####	12	#####		

Prueba de Tukey de la tasa máxima de germinación en semillas de maíz. Las diferencias significativas están por debajo de $p = 0.05$.

Tukey HSD test; variable Tasa máxima (Spreadsheet)				
Homogenous Groups, alpha = .05000				
Error: Between MS = .00082, df = 12.000				
Cell No.	Tratamiento	Tasa máxima Mean	1	2
2	Hidropriming	0.169741	****	
1	Control	0.186122	****	****
3	Enterradas	0.199525	****	****
4	Salino	0.242510		****

MANOVA del SLA en cada durante el día 11.

Analysis of Variance for SLA1 - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Suelo	997634.0	1	997634.0	38.69	0.0000
B:Tratamient	112262.0	3	37420.7	1.45	0.2334
INTERACTIONS					
AB	43276.3	3	14425.4	0.56	0.6432
RESIDUAL	2.26893E6	88	25783.3		
TOTAL (CORRECTED)	3.42211E6	95			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Prueba de rangos múltiples del SLA durante el día 11.

Multiple Range Tests for SLA1 by Suelo

Method: 95.0 percent Tukey HSD			
Suelo	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
2	48	270.84	X
1	48	474.722	X
Contrast		Difference	+/- Limits
1 - 2		*203.883	65.124

* denotes a statistically significant difference.

MANOVA de LMR durante el día 1.

Analysis of Variance for LMR - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Suelo	0.000399877	1	0.000399877	0.08	0.7804
B:Tratamient	0.0439375	3	0.0146458	2.86	0.0412
INTERACTIONS					
AB	0.0300272	3	0.0100091	1.96	0.1263
RESIDUAL	0.450012	88	0.00511377		

TOTAL (CORRECTED)	0.524377	95			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

MANOVA de la LAR durante el día 11.

Analysis of Variance for LAR1 - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Suelo	0.0143437	1	0.0143437	11.01	0.0013
B:Tratamient	0.0000576974	3	0.0000192325	0.01	0.9975
INTERACTIONS					
AB	0.00195364	3	0.000651213	0.50	0.6835
RESIDUAL	0.114692	88	0.00130331		

TOTAL (CORRECTED)	0.131047	95			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Prueba de rangos múltiples de la LAR durante el día 11.

Multiple Range Tests for LAR1 by Suelo

Method: 95.0 percent Tukey HSD			
Suelo	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	48	0.0151417	X
2	48	0.0395886	X

Contrast		Difference	+/- Limits
1 - 2		*-0.0244469	0.0146419

* denotes a statistically significant difference.

MANOVA de la SMR durante el día 11.

Analysis of Variance for SMR1 - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
--------	----------------	----	-------------	---------	---------

```

-----
MAIN EFFECTS
A:Suelo      0.00396551  1  0.00396551  22.92  0.0000
B:Tratamient 0.000572448  3  0.000190816  1.10  0.3524

INTERACTIONS
AB           0.000148865  3  0.0000496215  0.29  0.8348

RESIDUAL      0.0152269  88  0.000173033
-----
TOTAL (CORRECTED)  0.0199137  95
-----

```

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Prueba de rangos múltiples de la SMR durante el día 11.

Multiple Range Tests for SMR1 by Suelo

```

-----
Method: 95.0 percent Tukey HSD
Suelo      Count  LS Mean      Homogeneous Groups
-----
1          48    0.022125     X
2          48    0.0349792    X
-----
Contrast          Difference      +/- Limits
-----
1 - 2              *-0.0128542  0.00533502
-----

```

* denotes a statistically significant difference.

MANOVA de la biomasa de las plántulas del día 22.

Analysis of Variance for Biomasa4 - Type III Sums of Squares

```

-----
Source          Sum of Squares  Df  Mean Square  F-Ratio  P-Value
-----
MAIN EFFECTS
A:Suelo          0.121197  1  0.121197  16.60  0.0001
B:Tratamient     0.165457  3  0.0551523  7.56  0.0001

INTERACTIONS
AB              0.132818  3  0.0442726  6.06  0.0008

RESIDUAL          0.642397  88  0.00729997
-----
TOTAL (CORRECTED)  1.06187  95
-----

```

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Prueba de rangos múltiples de la biomasa de las plántulas del día 22.

Multiple Range Tests for Biomasa4 by Suelo

```

-----
Method: 95.0 percent Tukey HSD
Suelo      Count  LS Mean      Homogeneous Groups
-----
2          48    0.237146     X
1          48    0.308208     X
-----

```

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*0.0710625	0.0346523

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for Biomasa4 by Tratamient

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tratamient	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
Control	24	0.221417	X
Hidropriming	24	0.243458	XX
Enterradas	24	0.303583	XX
Salino	24	0.32225	X

Contrast	Difference	+/- Limits
Control - Enterradas	*-0.0821667	0.0645904
Control - Hidropriming	-0.0220417	0.0645904
Control - Salino	*-0.100833	0.0645904
Enterradas - Hidropriming	0.060125	0.0645904
Enterradas - Salino	-0.0186667	0.0645904
Hidropriming - Salino	*-0.0787917	0.0645904

* denotes a statistically significant difference.

MANOVA tasa máxima de crecimiento.

Analysis of Variance for RGRMax - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Suelo	0.641672	1	0.641672	4.35	0.0399
B:Tratamient	11.0896	3	3.69654	25.07	0.0000
INTERACTIONS					
AB	1.27119	3	0.423731	2.87	0.0407
RESIDUAL	12.9762	88	0.147456		
TOTAL (CORRECTED)	25.9787	95			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Prueba de rangos multiples de la tasa maxima de crecimiento.

Multiple Range Tests for RGRMax by Suelo

Method: 95.0 percent LSD

Suelo	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
2	48	0.716193	X
1	48	0.879706	X

Contrast	Difference	+/- Limits
----------	------------	------------

1 - 2 *0.163513 0.155772

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for RGRMax by Tratamiento

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tratamiento	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
Hidropriming	24	0.36773	X
Control	24	0.617092	X
Enterradas	24	0.933838	X
Salino	24	1.27314	X

Contrast	Difference	+/- Limits
Control - Enterradas	*-0.316745	0.290295
Control - Hidropriming	0.249362	0.290295
Control - Salino	*-0.656046	0.290295
Enterradas - Hidropriming	*0.566108	0.290295
Enterradas - Salino	*-0.3393	0.290295
Hidropriming - Salino	*-0.905408	0.290295

* denotes a statistically significant difference.

MANOVA del LAR durante el día 22.

Analysis of Variance for LAR4 - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Suelo	0.0000508426	1	0.0000508426	6.22	0.0145
B:Tratamiento	0.00000593734	3	0.00000197911	0.24	0.8667
INTERACTIONS					
AB	0.000144879	3	0.0000482931	5.91	0.0010
RESIDUAL	0.00071931	88	0.00000817398		
TOTAL (CORRECTED)	0.000920969	95			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Prueba de rangos múltiples del LAR durante el día 22.

Multiple Range Tests for LAR4 by Suelo

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Suelo	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
2	48	0.00779781	X
1	48	0.0092533	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*0.00145549	0.00115955

* denotes a statistically significant difference.

MANOVA de la LMR durante el día 22.

Analysis of Variance for LMR4 - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Suelo	0.0288072	1	0.0288072	8.51	0.0045
B:Tratamient	0.0169642	3	0.00565472	1.67	0.1791
INTERACTIONS					
AB	0.0530748	3	0.0176916	5.23	0.0023
RESIDUAL	0.297826	88	0.00338439		
TOTAL (CORRECTED)	0.396673	95			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Prueba de rangos múltiples de la LMR durante el día 22.

Multiple Range Tests for LMR4 by Suelo

Method: 95.0 percent Tukey HSD			
Suelo	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	48	0.234495	X
2	48	0.269141	X
Contrast			
		Difference	+/- Limits
1 - 2		*-0.0346454	0.0235946

* denotes a statistically significant difference.

MANOVA del SLA durante el día 22.

Analysis of Variance for SLA4 - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Suelo	45.7374	1	45.7374	0.01	0.9196
B:Tratamient	22969.8	3	7656.59	1.71	0.1701
INTERACTIONS					
AB	22368.7	3	7456.24	1.67	0.1796
RESIDUAL	393229.0	88	4468.51		
TOTAL (CORRECTED)	438613.0	95			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

MANOVA de la SMR durante el día 22.

Analysis of Variance for SMR4 - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Suelo	0.226537	1	0.226537	85.07	0.0000
B:Tratamient	0.0778712	3	0.0259571	9.75	0.0000
INTERACTIONS					
AB	0.0167253	3	0.0055751	2.09	0.1068
RESIDUAL	0.234345	88	0.00266301		
TOTAL (CORRECTED)	0.555478	95			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Pruebas de rangos múltiples de la SMR durante el día 22.

Multiple Range Tests for SMR4 by Suelo

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Suelo	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	48	0.173059	X
2	48	0.270213	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*-0.0971546	0.0209295

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for SMR4 by Tratamient

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tratamient	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
Salino	24	0.193166	X
Enterradas	24	0.194066	X
Hidropriming	24	0.242454	X
Control	24	0.256858	X

Contrast	Difference	+/- Limits
Control - Enterradas	*0.0627927	0.0390116
Control - Hidropriming	0.0144045	0.0390116
Control - Salino	*0.0636918	0.0390116
Enterradas - Hidropriming	*-0.0483882	0.0390116
Enterradas - Salino	0.000899058	0.0390116
Hidropriming - Salino	*0.0492873	0.0390116

* denotes a statistically significant difference.

MANOVA proporción raíz:vástago durante el día 22.

Analysis of Variance for R_V4 - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Suelo	12.7777	1	12.7777	36.26	0.0000
B:Tratamient	4.111	3	1.37033	3.89	0.0116
INTERACTIONS					
AB	2.79328	3	0.931095	2.64	0.0543
RESIDUAL	31.0131	88	0.352421		
TOTAL (CORRECTED)	50.6951	95			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Pruebas de rangos múltiples de la proporción raíz:vástago durante el día 22.

Multiple Range Tests for R_V4 by Suelo

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Suelo	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
2	48	0.915499	X
1	48	1.64516	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*0.729661	0.24077

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for R_V4 by Tratamient

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tratamient	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
Control	24	1.00122	X
Hidropriming	24	1.17368	XX
Salino	24	1.41153	XX
Enterradas	24	1.53489	X

Contrast	Difference	+/- Limits
Control - Enterradas	*-0.53367	0.448785
Control - Hidropriming	-0.172457	0.448785
Control - Salino	-0.41031	0.448785
Enterradas - Hidropriming	0.361213	0.448785
Enterradas - Salino	0.12336	0.448785
Hidropriming - Salino	-0.237853	0.448785

* denotes a statistically significant difference.