



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
ECOLOGÍA

**Efecto del potencial hídrico en la actividad del sistema antioxidante durante la germinación de *Alvaradoa amorphoides* especie de la Selva Baja Caducifolia**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M. en C. VERÓNICA HERNÁNDEZ PÉREZ**

Directora de tesis: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

Comité tutorial: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2014.



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
ECOLOGÍA

**Efecto del potencial hídrico en la actividad del sistema antioxidante durante la germinación de *Alvaradoa amorphoides* especie de la Selva Baja Caducifolia**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. en C. VERÓNICA HERNÁNDEZ PÉREZ**

Directora de tesis: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

Comité tutorial: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2014.

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática, en su sesión ordinaria del día 09 de diciembre de 2013, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS la alumna HERNANDEZ PEREZ VERONICA con número de cuenta 93635242 con la tesis titulada: "EFECTO DEL POTENCIAL HÍDRICO EN LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE DURANTE LA GERMINACIÓN DE *Alvaradoa amorphoides* ESPECIE DE LA SELVA BAJA CADUCIFOLIA", bajo la dirección de la DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA:

Presidente:	DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN
Vocal:	DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
Secretario:	DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ
Suplente:	DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
Suplente	DRA. ELIANE CECCON

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 11 de agosto de 2014

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## Agradecimientos Institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México que me permitió realizar mis estudios de doctorado.

Gracias al apoyo y financiamiento de beca CONACYT (No. 42862).

En especial agradezco a tres grandes mujeres: la Dra. María del Rocío Cruz Ortega, tutora principal, a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y Dra. Judith Márquez Guzmán que formaron parte de mi comité tutorial, gracias por su contribución en mi formación personal, académica y profesional, gracias por su comprensión y paciencia, pero sobre todo por ser unas profesionales y grandes seres humanos, gracias por compartir parte de sus conocimientos y su amor a la ciencia; porque comprenden la importante huella que dejan en la formación de sus estudiantes.

## Agradecimientos personales

A las autoridades del museo de Sitio de Xochicalco por las facilidades otorgadas para la obtención de material biológico y la realización de los experimentos de campo.

A todos los integrantes del laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde se realizó el presente trabajo: María Teresa Romero Romero, Blanca Estela Hernández, por su apoyo técnico y por todo ese conocimiento que han acumulado a lo largo del tiempo y que comparten con todos los estudiantes sin reserva; sin duda una ayuda invaluable. A Teresa Caudillo Estrada, por todo el apoyo en la preparación y cuidado del material de laboratorio. A los estudiantes: Aurora, Ernesto, Merle, Iris, Ivan, Alma, por esas horas de discusión y retroalimentaciones que nos ayudaron a ser más críticos. A Claudio, Leti, Rosita, Polette, Barbara, Luis, Mariana, con los que compartí mis momentos de estudiante, porque cada momento compartido fue un hermoso aprendizaje.

A la M. en C. Beatriz King-Díaz por su apoyo en las técnicas de respiración, por los momentos de trabajo compartido, por su buen carácter, su espíritu incansable, y a los estudiantes del laboratorio por su agradable compañía.

A la Bióloga Irma Acosta Calixto por su apoyo técnico, por sus acertadas observaciones y consejos, por ser una gran persona, por todo lo que aprendimos a lo largo de este recorrido.

Al M. en I. Alejandro René González Ponce y al Ing. Erick Daniel Valle Vidal por su apoyo técnico en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. David Díaz Pontones, por su asesoría, en mi estancia en su laboratorio, gracias por sus acertadas observaciones en la realización de esta investigación

A mis amigos: Memo, Manuel, Martín, Isabelle, Xavier, Luci, Alma, Ivan...

A Leti, por su apoyo en el montaje de algunos experimentos por darme aliento para continuar en los momentos de desaliento y cansancio.

A Vicente por sus observaciones al artículo y las traducciones, porque siempre tiene tiempo para los amigos.

Especialmente al equipo de investigaciones múltiples: Laura, Carlitos y Elsa por su amistad y apoyo en la realización del trabajo en campo y muchas cosas más.



## Dedicatoria

*A mi familia...*

*En especial a mis padres, porque son la estrella que ilumina mi camino*

*A mis hermanos*

*A mis sobrinos: Alex, Jessy, Alejandra, David, María Fernanda, Ángel e Israel*

*A Salvador; mi compañero y amigo en esta nueva etapa de mi vida*

*Gracias por los momentos compartidos*

“Si he llegado a ver más lejos que muchos hombres, es porque me he apoyado sobre hombros de gigantes”

***Newton***

## CONTENIDO

Resumen	13
Abstrac	14
<b>I. Introducción</b>	15
<b>II. Antecedentes</b>	17
2.1. Selva baja caducifolia (SBC)	17
2.2. Germinación	17
2.2.1. Estrés hídrico y germinación	21
2.2.2. Potencial hídrico y germinación	22
2.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS)	25
2.3.1. Producción de ros en plantas	26
2.3.2. Sistema antioxidante	26
2.3.2.1. Sistema antioxidante no enzimático	27
2.3.2.2. Sistema antioxidante enzimático	29
2.3.2.3. Sistema antioxidante y ROS durante la germinación	29
2.4. Reservas en semillas y su relación con la producción de ROS	32
2.5. Germinación en semillas de la SBC	34
Planteamiento del problema	35
Justificación	35
<b>III. Hipótesis</b>	36
<b>IV. Objetivos generales</b>	37
4.1. Objetivos particulares	37
<b>V. Materiales y métodos</b>	38
5.1. Unidad de estudio, biología de <i>A. amorphoides</i>	38
5.2. Material biológico y zona de estudio	40
5.2.1. Condiciones ambientales	41
5.2.2. Evaluación del porcentaje de germinación en campo	42
5.2.3. Contenido del porcentaje de humedad en el suelo	43
5.3. Determinación del contenido y porcentaje de compuestos de reserva (Carbohidratos, lípidos y proteínas)	43
5.4. Selección de potenciales hídricos para la germinación in vitro	44

5.4.1. Porcentaje de germinación en diferentes condiciones de potencial hídrico in vitro.	44
5.5. Curva de imbibición	44
5.6. Consumo de oxígeno durante la germinación	45
5.7. Niveles de ROS y actividad de enzimas antioxidantes durante la germinación de <i>A. amorphoides</i> en diferentes potenciales hídricos.	
5.7.1. Medición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	46
5.7.2. Extracción de proteínas y actividad de enzimas antioxidantes:	46
5.7.2.1. CAT (E.C. 1.11.1.6)	47
5.7.2.2. APX (E.C. 1.11.1.11)	47
5.7.2.3. GR (E. C. 1.6.4.2)	47
5.7.2.4. SOD EC. 1.15.1.1).	48
5.27.2.5. Medición de O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	48
5.6.3. Análisis estadístico de datos	48
<b>VI. Resultados</b>	49
<b>VII. Discusión</b>	58
<b>VIII. Conclusiones</b>	67
<b>IX. Literatura citada</b>	68
<b>X. Apéndice</b>	83
I. Tablas de pruebas estadísticas (ANOVAS y pruebas de Tukey de enzimas antioxidantes)	84
II. Artículo	89

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa esquemático de la distribución geográfica del bosque tropical caducifolio en México	17
<b>Figura 2.</b> Selva Baja Caducifolia de Xochicalco, Morelos, México	18
<b>Figura 3.</b> Fases de la germinación	20
<b>Figura 4.</b> Semilla de <i>Glycine max</i> y <i>Alvaradoa amorphoides</i>	22
<b>Figura 5.</b> Reducción del oxígeno molecular mediante la adición sucesiva de electrones	25
<b>Figura 6.</b> Ciclo del ASC-GSH	28
<b>Figura 7.</b> <i>Alvaradoa amorphoides</i>	40
<b>Figura 8.</b> Ubicación de la zona de estudio de <i>A. amorphoides</i> , Xochicalco, Morelos	41
<b>Figura 9.</b> Datos meteorológicos de precipitación, durante los años 1952-2005	42
<b>Figura 10.</b> Tipo de geoformas	49
<b>Figura 11.</b> Corte longitudinal de cotiledones de <b><i>A. amorphoides</i></b> donde se observa la presencia de cuerpos lipídicos	51
<b>Figura 12.</b> Fases de la germinación, consumo de oxígeno y toma de agua en semillas de <i>A. amorphoides</i> germinadas a 27°C	53
<b>Figura 13.</b> Efecto del potencial hídrico en el porcentaje de germinación de <i>Alvaradoa amorphoides</i>	56
<b>Figura 14.</b> Efecto del potencial hídrico, durante la germinación de semillas de <i>A. amorphoides</i> en los niveles de superóxido y peróxido de hidrógeno, y en la actividad de las enzimas antioxidantes	58
<b>Tabla 1.</b> Porcentaje de germinación y de contenido de humedad relativa, profundidad (cm), pendiente y geoforma en los ocho sitios muestreados durante un año en la zona de Xochicalco, Morelos.	50
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de reservas contenidas en semillas de <b><i>A. amorphoides</i></b>	52

## RESUMEN

Las Selvas Bajas Caducifolias (SBC) son ecosistemas que se caracterizan por una gran diversidad de especies arbóreas y una disponibilidad hídrica estacional. *Alvaradoa amorphoides* es un árbol representativo de SBC de la zona de Xochicalco en el Estado de Morelos, México. Este trabajo evaluó los requerimientos hídricos para la germinación de ésta especie, tanto en campo como en laboratorio.

En campo se evaluó la germinación en sitios con diferente geomorfología y características de humedad. En laboratorio, se cuantificaron las reservas (carbohidratos, lípidos y proteínas), en las semillas de *A. amorphoides*, observándose como principal reserva a los lípidos, en menor proporción proteínas y por último carbohidratos. Se evaluó el porcentaje de germinación, imbibición, respiración y actividad de enzimas antioxidantes en semillas de *A. amorphoides*, colocadas en soluciones de diferente potencial hídrico, en condiciones de laboratorio.

El porcentaje de germinación total de *A. amorphoides* en el campo fue de 42 %, pero fue diferente entre sitios independientemente de la humedad relativa y de la geomorfología del suelo. Las semillas expuestas a -0.5 MPa retrasaron su germinación, extendiendo la fase II de la germinación. Los potenciales de -1.0 y -1.5 MPa inhibieron la germinación 80 y 100% respectivamente, sin embargo, las semillas permanecieron viables. El consumo de oxígeno no varió en las semillas expuestas a los diferentes potenciales hídricos. Los niveles de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  y la actividad de CAT, SOD y GR no fueron significativamente diferentes entre los potenciales hídricos, solo la actividad de APX fue inhibida con los potenciales de -0.5 y -1.0 MPa. Los resultados muestran que las semillas de *A. amorphoides* permanecen en fase II de la germinación en potenciales hídricos negativos, sin mostrar diferencia en su tasa de respiración y en los niveles de ROS, lo que podría explicar porque el porcentaje de germinación, no se vio afectado por la geoforma y humedad en condiciones de campo.

## ABSTRAC

Tropical dry forests are ecosystems characterized by a high diversity of tree communities and a very heterogeneous availability of water. A representative tree *Alvaradoa amorphoides* (Simaroubaceae), is a pioneer species of tropical dry forest found in Xochicalco, Morelos, Mexico. To determine water requirements for this species, we evaluated seedgermination in both, field and laboratory conditions.

In the field, the seeds showed an overall mean germination of 42%, but at different sites, the germination was variable, independently of the relative humidity of the soil and the geomorphology. *A. amorphoides* seeds exposed to -0.5 MPa delayed germination extending Phase II. At -1.0 and -1.5 MPa, germination was inhibited at 80 and 100% but the seeds were still viable. Oxygen consumption did not differ according to treatments.  $H_2O_2$  and  $O_2^-$  levels and CAT, SOD and GR activity were not significantly different in seeds at low-water potential. Only APX activity was inhibited at -0.5 and -1.0 MPa.

Our results showed that seeds of *A. amorphoides* remained in phase II during low water potentials, without high levels of ROS and continue viable. Not so many studies have investigated the role of germination in species of natural systems in relation to water deficits or low water potential, the present study contributes to this area of research.

## I INTRODUCCIÓN

Las selvas bajas caducifolias (SBC) pueden definirse como aquellas comunidades vegetales que se encuentran en regiones tropicales y se caracterizan por presentar una precipitación marcadamente estacional, lo que genera condiciones abióticas severas y erráticas, que influyen en los patrones de germinación de las semillas (Miller, 1999).

La disponibilidad de agua del suelo es considerada una de las principales causas en la disminución de la germinación de las semillas. El déficit hídrico puede ocasionar un retraso y reducción de la germinación, o bien, inhibirla completamente (Hegarty, 1977; Gummerson, 1986; Daws, *et al*; 2002; Rodríguez-Rivera, *et al*, 2007).

La germinación de las semillas comienza con la absorción de agua (imbibición) y culmina con la elongación del eje embrionario (Bewley y Black, 1985). A partir del inicio del proceso de imbibición se presenta una intensa actividad metabólica, uno de estos cambios es la reactivación de la actividad respiratoria, la cual genera un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), el superóxido ( $O_2^{\cdot}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), entre otros (Bailly, 2004). Las ROS son moléculas altamente reactivas que al interactuar con los componentes lipídicos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, pueden ocasionar un estrés oxidativo y derivar en daño celular (Moller *et al*, 2007).

Para prevenir el daño por las ROS las células están provistas de un sistema antioxidante enzimático y no enzimático que mantiene el equilibrio redox. El sistema antioxidante enzimático está formado por enzimas como: la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la dismutación del  $O_2^{\cdot}$  a  $H_2O_2$ , la catalasa (CAT) que neutraliza al  $H_2O_2$  y lo convierte en  $H_2O$  y  $O_2$ , la glutatión reductasa (GR), y la ascorbato peroxidasa (APX) que regulan el estado redox del par ascorbato (ASC)-glutatión (GSH) en la célula (Halliwell, 2006). Dentro del sistema antioxidante no enzimático está el ASC, que puede remover directamente las ROS, o bien actuar indirectamente, junto con enzimas antioxidantes y con el GSH. Ambos antioxidantes (ASC y GSH) forman parte del ciclo del ASC-GSH, conocido como el ciclo de Halliwell-Asada, en donde con la participación la APX y la GR mantienen los niveles óptimos de estos dos antioxidantes (Halliwell, 2006).



Se sabe que bajo condiciones de estrés, aumenta el contenido de ROS, ya sea por el aumento en su producción, la disminución en la capacidad antioxidante de la célula, o bien, por una combinación de ambos (Agarwal y Pandey, 2004).

En las SBC, las fluctuaciones en la disponibilidad de humedad condicionan los patrones de germinación (Khurana, 2001; Ceccon, 2006;). Se tiene documentado que las semillas de la SBC pueden germinar en un rango de 0 a 1.6 MPA (Khurana, 2001). Por otro lado, se sabe que algunas enzimas antioxidantes encargadas de remover las ROS, como son la CAT, APX, GR y SOD, aumentan su actividad durante un estrés hídrico y probablemente sean muy importantes en la tolerancia a dicho estrés (Mittler y Zilinskas, 1994; Agarwal y Pandey, 2004). *Alvaradoa amorphoides* es una especie predominante que forma parte de la estructura de la vegetación de la SBC de Xochicalco Morelos; que se distribuye desde Florida hasta el sur de América. Sus semillas son ortodoxas (con un contenido de humedad del 4%), presentan una cubierta seminal permeable al agua y contienen un 63% de lípidos como reserva, los cuales son susceptibles a sufrir peroxidación, lo que podría contribuir a un aumento en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y del O<sub>2</sub><sup>·</sup> durante la germinación, ya que una vez que las semillas caen al suelo están expuestas a los cambios de humedad dada la naturaleza de su cubierta seminal, por lo que las especies de la SBC deben presentar una estrategia que permita su permanencia en ambientes estacionales como son las SBC.

Dada la importancia que las SBC tienen desde el punto de vista ecológico (bienes y servicios ambientales) y económico (especies medicinales, ornamentales, combustible y de construcción), es primordial conocer los procesos de regeneración de dichos ecosistemas, tales como el proceso de germinación de especies vegetales como *Alvaradoa amorphoides*. Dadas las condiciones variables en la disponibilidad de agua, las condiciones edáficas y la heterogeneidad de las geoformas que se presentan en la Selva Baja Caducifolia, que podrían llevar a un estrés hídrico durante la germinación. En el presente trabajo se evaluó la actividad del sistema antioxidante en la germinación en semillas de *A. amorphoides*, sometidas a diferentes potenciales hídricos en condiciones de laboratorio, así como su porcentaje de germinación en condiciones naturales.

## II ANTECEDENTES

### 2.1. SELVA BAJA CADUCIFOLIA

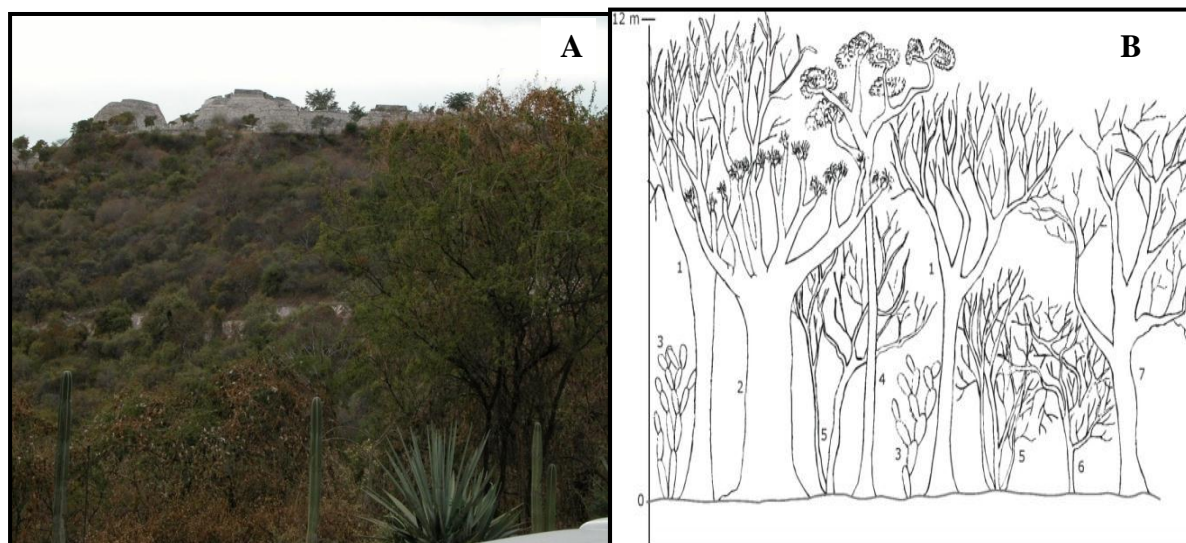
La selva baja caducifolia (Miranda y Hernández, 1963) también conocida como bosque tropical deciduo (Leopold, 1950), bosque tropical seco (Gentry, 1982), bosque tropical caducifolio (Rzedowski, 1978; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2013) y bosque tropical seco estacional (Bullock *et al*, 1995) es considerada como uno de los ecosistemas tropicales más alterados y amenazados por el cambio de uso del suelo con fines agropecuarios y asentamientos humanos (Jaramillo y Sandford, 1995; Trejo y Dirzo, 2000). En México la SBC se distribuye desde el estado de Sonora hasta el de Chiapas, en un rango altitudinal que va desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm (Trejo, 1999). Éste ecosistema ocupaba un área aproximada de 6 millones de hectáreas en la década de los 50s (Quadri de la Torre, 2000), para 1990 solamente el 27% de la cubierta original de la SBC permanecía como bosque intacto (Trejo y Dirzo, 2000; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2013).



**Figura 1.** Mapa esquemático de la distribución geográfica del bosque tropical caducifolio en México. Tomado de Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2013.

Las selvas bajas caducifolias son asociaciones vegetales de zonas cálido-húmedas (Aw), que se caracterizan por presentar una temperatura promedio anual superior a los 20°C (Rzedowski, 1978), una precipitación anual de 1200 mm como máximo y se distribuyen entre los 0 y 1700 m.s.n.m. Estos ecosistemas experimentan una estación seca que puede durar de 7 a 8 meses, lo cual provoca un déficit hídrico y de los nutrimentos minerales disponibles para la vegetación (Bullock *et al.* 1995). La temporalidad de las precipitaciones es uno de los factores dominantes en los patrones de la actividad biológica, tales como el crecimiento y la reproducción, los cuales se sincronizan con la disponibilidad de agua (Murphy y Lugo 1986).

La característica más sobresaliente de la Selva Baja Caducifolia es su carácter caducifolio, ya que la mayoría de las especies pierden sus hojas durante un periodo de 5 a 7 meses, lo cual origina un contraste fisionómico muy marcado entre la temporada de secas y la de lluvias (Pennington y Sarukhán 1998). La altura promedio de los árboles varía generalmente entre los 5 y 15 m (Rzedowski, 1978). El estrato arbustivo es muy denso y el número de lianas se incrementa en las áreas más húmedas y en las cercanías a la costa (Trejo, 1998). Las formas de vida suculentas son frecuentes y las epífitas se reducen a pequeñas bromelias y a algunas orquídeas (Lott, 1993). En general, la composición de especies de este tipo de selvas es altamente diversa (Fig. 2).



**Figura 2.** A) Selva Baja Caducifolia de Xochicalco, Morelos, México; B) Estructura de la vegetación de la Selva Baja Caducifolia de Xochicalco Morelos, México.

El relieve puede ser muy variado (ladera, pie de monta, superficie cumbral) e influyen en aspectos del suelo como profundidad, textura, estructura. y por ende en la estructura de la vegetación; por lo general, en los suelos de la superficie cumbral existe poca velocidad de flujo y un transporte reducido de material, ya que la escasa pendiente permite la acumulación de material mientras que en los dorsos de las laderas se presenta una menor estabilidad, debido a que los suelos están expuestos a los procesos erosivos, (Galicia *et al.*1995) ,por el contrario en el pie de monte el suelo tiene como material parental el aluvión proveniente de ladera arriba, y aunque puede ser más profundo y retener más humedad, también es inestable. Por lo anterior, es importante considerar el tipo de geoforma y las condiciones de humedad del suelo en donde se desarrolla la vegetación.

## **2.2. GERMINACIÓN**

La germinación se ha definido como el proceso por medio del cual el embrión presenta un alargamiento del hipocótilo y crecimiento de la radícula hasta que emerge de la semilla, en muchos casos lo primero que emerge es la radícula. La germinación se ha dividido en tres fases de acuerdo a su capacidad de toma de agua: 1) imbibición o hidratación, 2) estacionaria y 3) crecimiento o postgerminativa (Fig. 3). En la primera fase, existe una rápida absorción de agua por parte de los tejidos que forman la semilla, evento físico que puede ocurrir tanto en semillas vivas como muertas. La rápida entrada de agua en la semilla resulta en una alteración estructural, particularmente de las membranas. Además, el proceso de imbibición, reactiva la actividad metabólica de la semilla, siendo la respiración uno de los primeros eventos metabólicos (Botha *et al.*, 1992; Bewley y Black, 1985). La glicólisis y la ruta de las pentosas fosfato también se reactivan al igual que algunas enzimas del ciclo de Krebs (Nicolas y Aldasoro, 1979; Salon *et al.* 1988) y todos los componentes para la síntesis de proteínas y reparación de DNA (Bewley, 1997).

En la segunda fase (estacionaria), la absorción de agua se reduce considerablemente y en la semilla se presenta la síntesis *de novo* de moléculas como elRNAm y de proteínas para mantener el metabolismo celular. Es en esta fase que

culmina el proceso de germinación, la cual puede o no estar acompañada de la división celular.

En la fase III (de crecimiento o post-germinativa) se da nuevamente un aumento en la absorción de agua y es cuando ocurre la extensión de la radícula y la aparición del coleoptilo o primeras hojas. La elongación radicular es un proceso que involucra cambios de turgencia y relajación de la pared celular, en ésta última se sabe que participan el  $H_2O_2$  y el  $O_2^-$  (Fang et al, 2001). Por otra parte, en esta fase también se da la movilización de reservas, que en el caso de semillas oleaginosas se produce un aumento significativo de  $H_2O_2$  durante su metabolismo o autooxidación de lípidos (Bailly, 2004).

En resumen, durante estas tres fases, las semillas experimentan cambios en su estatus hídrico (potencial hídrico) y metabólico (respiración, reparación del DNA y estructuras membranales, movilización de reservas y biosíntesis de macromoléculas como proteínas, lípidos y carbohidratos), procesos que generan un aumento en las ROS (Bailly, 2004).

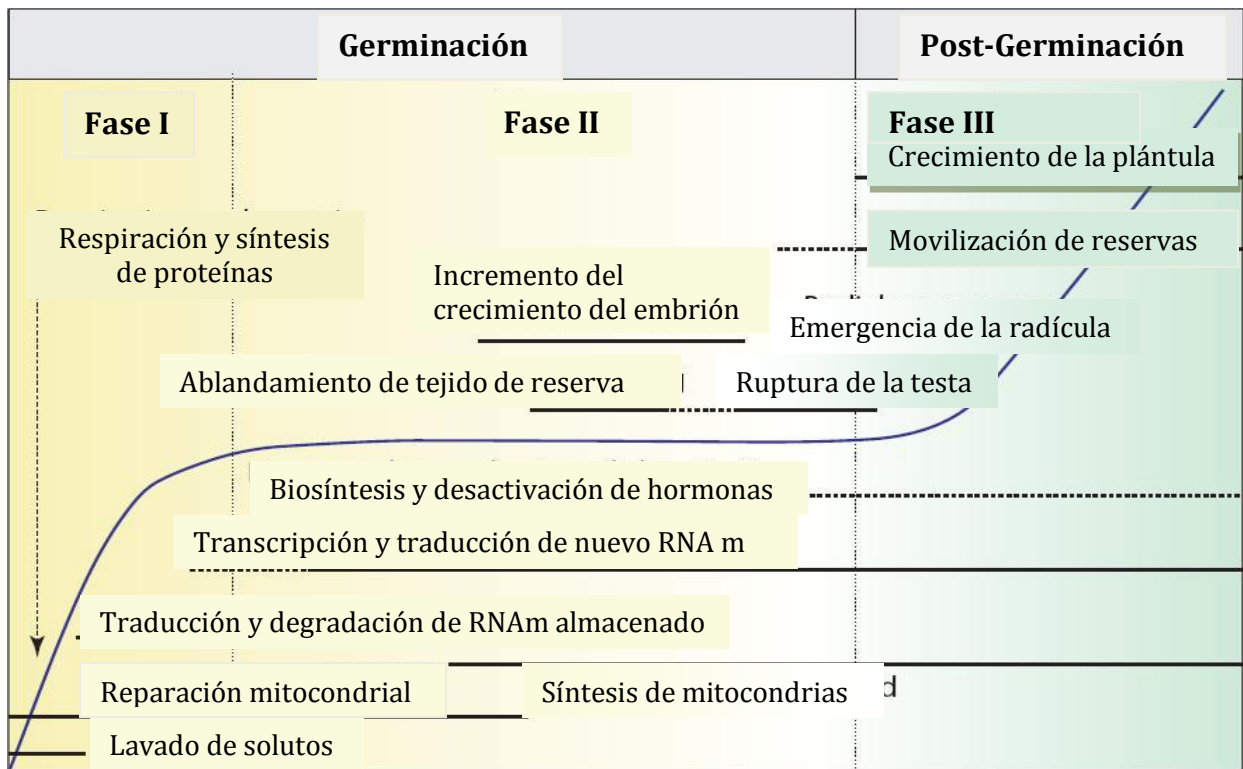


Figura 3. Fases y eventos asociados con la germinación y subsecuente crecimiento de la plántula (post-germinación). Particularmente los factores ambientales como temperatura y disponibilidad de agua son determinantes para la germinación. Modificado de Nonogaki y Bewley (2008).

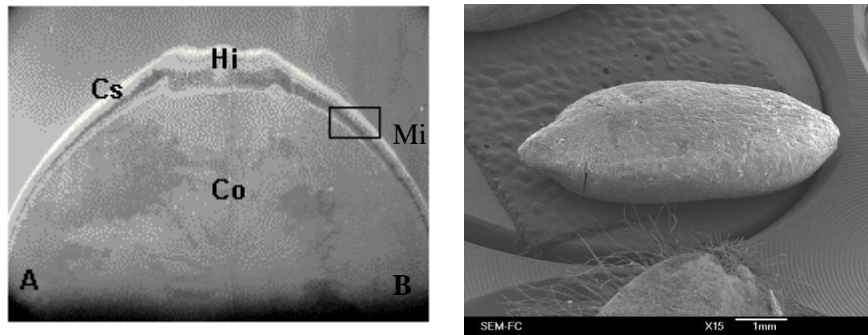
### 2.2.1. ESTRÉS HÍDRICO Y GERMINACIÓN

Un factor de estrés que limita el desarrollo y productividad de las plantas es el estrés hídrico. De manera natural la escasez de agua en el suelo y/o en la atmósfera, ocurre durante todo el ciclo de las plantas. El estrés hídrico también influye en la germinación; un proceso crucial en la vida de una planta y que ha sido poco estudiado en ecosistemas como la SBC (Basurto-Sotelo *et al*, 2008; Taiz, 2012).

El agua es un requisito básico para la germinación, la cual es esencial para la activación metabólica de la semilla. Las semillas en su estado de reposo pueden permanecer con cantidades muy bajas de humedad y estar prácticamente inactivas metabólicamente, estas semillas son denominadas quiescentes. Las semillas quiescentes pueden permanecer por un periodo relativamente largo en el suelo o almacenadas sin germinar (Baskin y Baskin, 2004).

La mayor parte de las semillas tienen un punto crítico de humedad hasta que la germinación ocurre, por ejemplo, en el maíz su punto crítico de humedad es de 30%, en trigo de 40% y en soya de un 50%. Una vez que se sobrepasa este punto crítico de humedad de la semilla, se inicia el proceso de germinación y ya no puede regresarse (Evans y Etherington, 1990).

El proceso de imbibición de la semilla depende de tres factores: la composición de las sustancias de reserva de la semilla, la permeabilidad de la cubierta seminal y la disponibilidad de agua. La composición de la semilla (gran cantidad de solutos) y extremadamente bajo contenido de agua, llevan a que la semilla presente un bajo potencial hídrico y una alta habilidad para hidratarse, independientemente de si la semilla está muerta o viva. Las proteínas son moléculas polares que al presentar tanto cargas negativas como positivas atraen a las moléculas de agua, mientras que el almidón y los lípidos no tienen esta gran afinidad por el agua. Entonces, semillas con un alto contenido de proteínas se hidratan más que las semillas que contienen más almidón y/o lípidos (Bewley y Black, 1985).



**Figura 4.** Semilla de A) *Glycine max* (Hi) Hilo, Cs) cubierta seminal y Co) cotiledones y B) *Alvaradoa amorphoides* (Mi) micrópilo.

La permeabilidad de la cubierta seminal, depende de su naturaleza química. La permeabilidad al agua es usualmente mayor en el área micropilar donde la cubierta es generalmente delgada. El hilo de muchas semillas permite fácilmente la entrada de agua (Fig. 4). Los mucílagos que componen la cubierta de la semilla incrementan la imbibición al aumentar la superficie de contacto entre la semilla y el suelo, y también por contener componentes con alta capacidad de formación de puentes de hidrógeno, como las arcillas o compuestos celulósicos o mucilaginosos que permiten la retención de agua (McDonald, 1999).

### 2.2.2. POTENCIAL HÍDRICO Y GERMINACIÓN

El agua en estado líquido es un fluido cuyas moléculas se hallan en constante movimiento. La capacidad de las moléculas de agua para moverse en un sistema particular depende de su energía libre. La magnitud más empleada para expresar y medir el estado de energía libre del agua es el potencial hídrico  $\Psi$ . El potencial hídrico puede expresarse en unidades de energía por unidades de masa o volumen, la unidad de uso es el megapascal (1 MPa = 10 bares), aunque en el pasado también se han utilizado la atmósfera y el bar (1 bar = 0.987 atm) (Taiz, 2012).

El movimiento del agua en el suelo y en las plantas ocurre de manera espontánea a lo largo de gradientes de energía libre, desde regiones donde el agua es abundante, y por lo tanto, tiene alta energía libre por unidad de volumen (mayor  $\Psi$ ), a zonas donde la energía libre del agua es baja (menor  $\Psi$ ). El agua pura tiene una energía libre muy alta debido a que todas las moléculas pueden moverse libremente. Este es el estado de

referencia del potencial hídrico; a una masa de agua pura, libre, sin interacciones con otros cuerpos, y a presión normal, le corresponde un  $\Psi$  igual a 0 (Salisbury, 1985).

Los factores que fundamentalmente determinan el potencial hídrico del agua son el efecto osmótico, asociado con la presencia de solutos, las fuerzas mátricas que adsorben o retienen agua en matrices sólidas o coloidales, el efecto de la altura y las presiones positivas o negativas o tensiones presentes en los recipientes o conductos donde se encuentra. Estos factores tienen un efecto aditivo que típicamente disminuye el potencial hídrico del suelo o de la planta con respecto al potencial del agua pura. Así, en un sistema particular, el potencial hídrico total es la suma algebraica de cuatro componentes:

$$\Psi_w = \Psi_o + \Psi_p + \Psi_g + \Psi_m$$

donde  $\Psi$  significa potencial, y los subíndices w, o, p, g y m, significan potenciales hídrico, osmótico, de presión, gravitatorio, y mátrico, respectivamente (Blum, 2010).

El  $\Psi_o$  representa el componente determinado por la presencia de solutos disueltos en el agua disminuye la energía libre del agua y puede ser cero o asumir valores negativos. A medida que la concentración de soluto (es decir, el número de partículas de soluto por unidad de volumen de la disolución) aumenta, el  $\Psi_o$  se hace más negativo. Sin la presencia de otros factores que alteren el potencial hídrico, las moléculas de agua de las disoluciones se moverán desde lugares con poca concentración de solutos a lugares con mayor concentración de soluto. El  $\Psi_o$  se considera 0 para el agua pura.

El  $\Psi_m$  representa el grado de retención del agua, debido a las interacciones con matrices sólidas o coloidales. Tales matrices constituyen el material coloidal del suelo y las paredes celulares.

El  $\Psi_p$  representa la presión hidrostática y puede asumir valores positivos o negativos según el agua esté sometida a presión o tensión. Así por ejemplo, el potencial de presión  $\Psi_p$  en las células es positivo y representa la presión ejercida por el protoplasto contra la pared celular, mientras que en el xilema es negativo debido a la tensión desarrollada por diferencias en el potencial hídrico originadas en la transpiración.



Por último el  $\Psi_g$  representa la influencia del campo gravitatorio y normalmente es positivo, si bien esto depende de la posición elegida para el estado de referencia.

Cuando las semillas llegan a un lugar con condiciones adecuadas de humedad y temperatura germinan y producen una plántula. Para que éstas semillas puedan germinar han de absorber antes una cantidad suficiente de agua para que el embrión salga de su estado de latencia y entre en actividad.

La disponibilidad de agua en el suelo se mide mediante su potencial hídrico ( $\Psi$ ), cuyos valores varían entre 0 y -1MPa. Cuanto más negativo el potencial hídrico del suelo, hay menos agua libre disponible para las semillas que se encuentran en el suelo. El potencial hídrico del suelo depende básicamente de dos componentes:

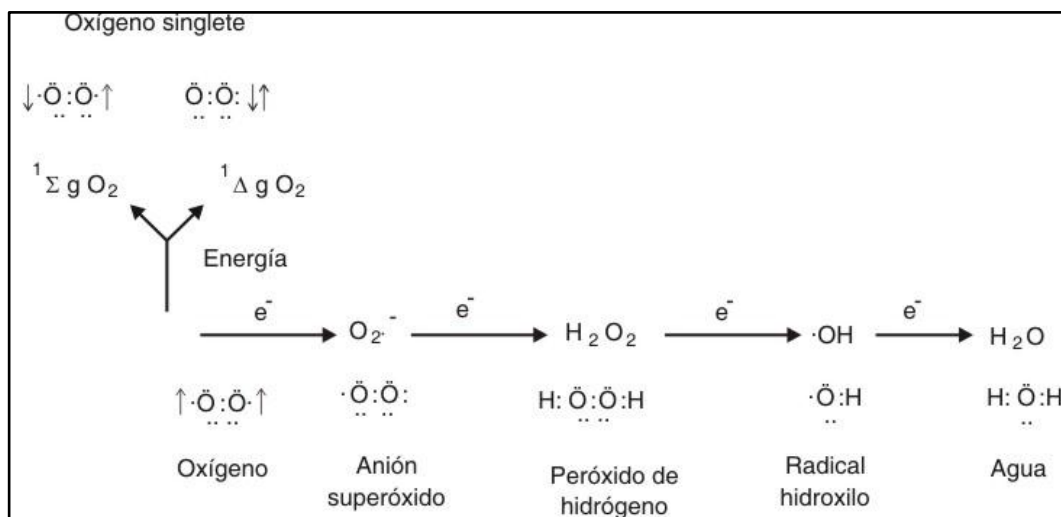
1. Del potencial mátrico del suelo ( $\Psi_m$ ), que es debido a las fuerzas de adsorción y de capilaridad de las partículas sólidas del suelo y

2. Del potencial osmótico ( $\Psi_o$ ), el cuales debido a los solutos (sales) disueltos en el agua del suelo. Al igual que el potencial mátrico, varía entre 0 y -1MPa y su unidad es el MPa. Indica la tendencia del agua a pasar de una solución menos concentrada (con potencial osmótico más alto o menos negativo) a otra más concentrada (potencial más bajo o más negativo) para igualar los potenciales. Si la disolución del suelo tiene una concentración de solutos más alta que la semilla, entonces  $\Psi_o \text{ semilla} > \Psi_o \text{ suelo}$ , y la semilla no solo no podrá absorber agua sino que podrá perderla. Por tanto, la presencia de solutos osmóticamente activos (por ejemplo sales) en elevada concentración en el suelo dificultará la germinación. Sin embargo, la capacidad de las semillas de absorber agua del suelo varía entre especies y el contenido de agua del suelo (Evans y Etherington, 1990).

Para la simulación de la tensión hídrica, durante la germinación en semillas se pueden utilizar diferentes sustancias que funcionan como agentes osmóticos; dentro de éstas se puede utilizar: Polietilenglicol (PEG), NaCl, glucosa, sacarosa o manitol, aunque se recomienda utilizar PEG debido a que es químicamente inerte y no tóxico, parece no penetrar la cubierta seminal y es estable osmóticamente (Parmar y Moore 1966, Thill *et al.* 1979).

### 2.3. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS)

Dentro de las moléculas consideradas como ROS se incluyen a los radicales libres de  $O_2$  (Fig. 5), como el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), y a otros compuestos del  $O_2$  como el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que si bien no puede clasificarse químicamente como radical libre, sí es altamente prooxidante y capaz de generar radicales libres durante su descomposición. Un radical libre se define como una especie química que posee uno o más electrones desapareados. Como consecuencia de poseer electrones desapareados, estas especies químicas son extremadamente reactivas (Armstrong *et al.*, 1984; Pryor, 1986; Cadenas, 1889), por lo que al interactuar con lípidos, proteínas, carbohidratos y DNA, pueden causar severos daños moleculares, derivando en un estrés oxidativo que finalmente puede llevar a la muerte celular. Lo anterior ha sido documentado para un alto contenido de ROS, pero a concentraciones bajas se reconocen como moléculas que regulan la expresión de genes en varios procesos fisiológicos y la respuesta celular a factores de estrés de tipo ambiental (Bhattacharjee, 2012).



**Figura 5.** Reducción del oxígeno molecular mediante la adición sucesiva de electrones. Tomado de Martínez-Sánchez (2005).

### 2.3.1. PRODUCCIÓN DE ROS EN PLANTAS

Varias ROS pueden ser generadas en las plantas como resultado de su metabolismo, por ejemplo: en la polimerización de la lignina durante la formación de la pared celular; en el catabolismo de ácidos grasos dentro de los peroxisomas o glioxisomas; en la cadena de transporte de electrones fotosintético en los cloroplastos y respiratorio en las mitocondrias (Dat, *et al*, 2000). Asimismo, en condiciones de estrés ambiental (hídrico, luminoso, por temperatura y patógenos), se ha observado un aumento de ROS (Smirnoff, 1993; Foyer *et al*, 1997).

En el caso de semillas ortodoxas, las cuales inician el proceso de germinación en un estado altamente deshidratado, se ha observado que la hidratación y la reactivación de la respiración causan un aumento en la producción de ROS (Cakmax *et al*, 1993; Puntarulo *et al*, 1998, Haslekas *et al*, 2003, Tommasi, 2001, Bailly, 2004). Se tiene documentado un aumento en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el periodo temprano de imbibición de varias especies (i. e. soya (*Glycine max*), rábano (*Rapahanus sativus cv Eterna*), col (*Brassica oleraceae cv Cappucio*), tomate (*Solanum lycopersicum*), Senna y chícharo (*Pisum sativum*) (Puntarulo *et al*, 1988, 1991, Gidrol *et al*. 1994; Schopfer *et al*, 2001; Wojtyla *et al*, 2001, Bellani, 2002; Morohashi, 2002; Agarwal y Pandey, 2004). Así mismo, se ha observado la presencia de otros radicales como O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en rábano (*Rapahanus sativus cv Eterna*), trigo (*Triticum aestivum*) y soya (*Glycine max*) (Schopfer *et al*, 2001, Serrato, 2003; Gidrol *et al*, 2004) y OH<sup>•</sup>). Sin embargo, aún no se conoce el sitio exacto de la generación de ROS durante la germinación, aunque se han propuesto a la cubierta seminal y el eje embrionario, como los principales sitios de producción de estos radicales (Schopfer *et al*, 2001; Morohashi, 2002; Bailly, 2004).

### 2.3.2. SISTEMA ANTIOXIDANTE

La acumulación de ROS produce un estrés oxidativo que conduce al daño celular, por lo tanto la célula mantiene un estricto control de su concentración, siendo el sistema antioxidante el encargado de este equilibrio redox en las células.

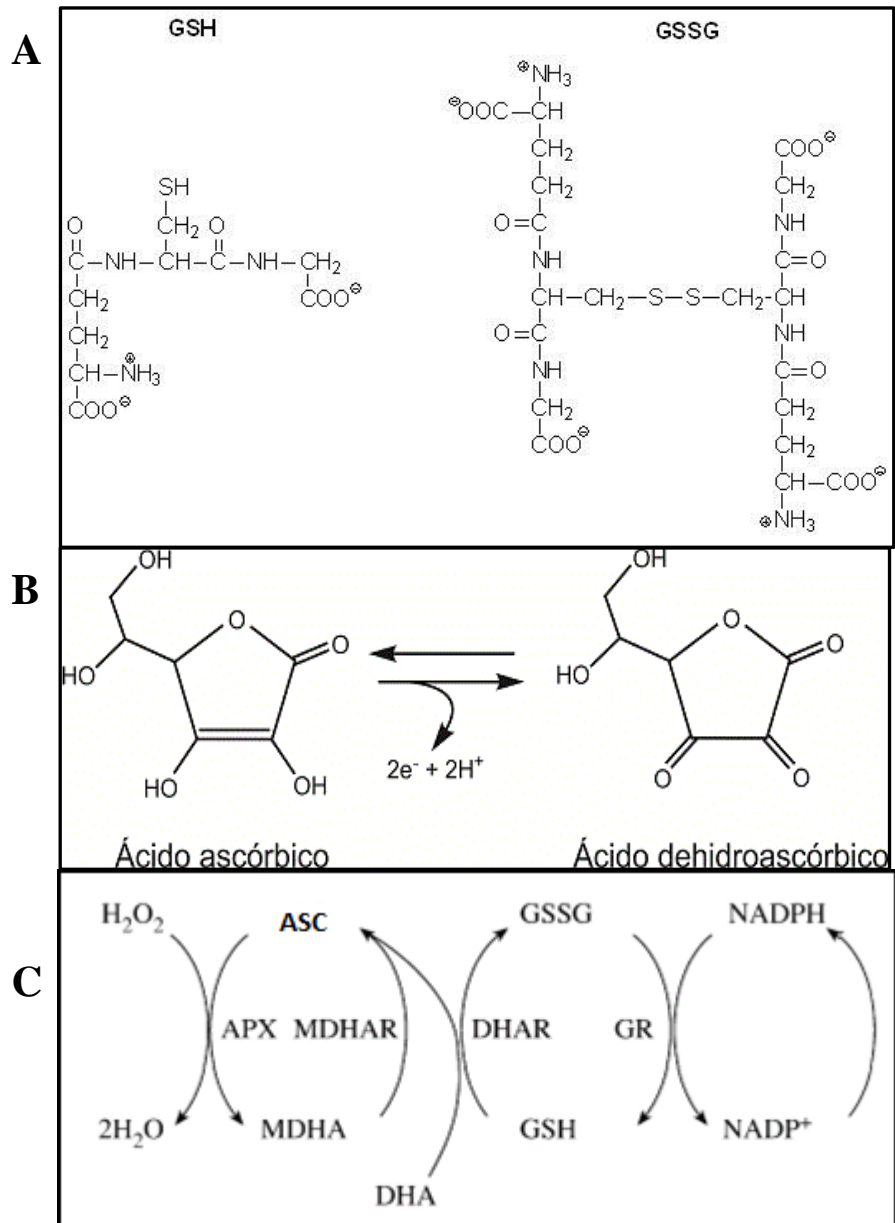
### 2.3.2.1. SISTEMA ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICO

El sistema antioxidante se encuentra constituido por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que trabajan en conjunto para mantener los niveles redox de la célula en equilibrio. Dentro de los mecanismos no enzimáticos se encuentran moléculas de bajo peso molecular, solubles en agua (ascorbato, glutatión, compuestos fenólicos y tocoferoles). Siendo el glutatión ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine; Fig. 6A) el principal antioxidante, el cual se localiza en el citosol, el retículo endoplásmico, las vacuolas, los peroxisomas, el cloroplasto y la mitocondria (Noctor y Foyer 1998). La forma reducida del glutatión (GSH) tiene varias funciones como son: almacenar grupos tiol, ser un potente detoxificador de xenobiontes, participar en la señalización para la expresión de genes, en la regulación del ciclo celular, y conjuntamente con la forma oxidada (GSSG), mantener el balance redox en los compartimentos celulares. El papel central del glutatión en la defensa antioxidante es el de regenerar otro poderoso antioxidante: el ascorbato (ASC) (Fig. 6B), vía el ciclo del ascorbato-glutatión (ASC-GSH) (Fig. 6C, Foyer y Halliwell, 1976; Noctor y Foyer, 1998; Blokhina, 2003).

El ácido ascórbico (Fig. 6B), se encuentra en el citosol, el cloroplasto, la vacuola, la mitocondria y la pared celular (Smirnoff, 1996); tiene la capacidad de donar electrones en un amplio rango de reacciones enzimáticas y no enzimáticas, lo que lo hace el principal detoxificador de ROS en la fase acuosa de la célula. El ASC puede atrapar directamente al  $^1\text{O}_2$ , al  $\text{O}_2^{\cdot -}$  y al  $\text{OH}^{\cdot}$  y reducir al  $\text{H}_2\text{O}_2$  a agua vía la enzima Ascorbato peroxidasa (APX) (Noctor y Foyer, 1998), de manera indirecta el ASC participa en la regeneración de los antioxidantes de membrana, tales como el tocoferol (Thomas, 1992). Además de su capacidad como antioxidante, el ASC está implicado en la regulación de la división celular, en la progresión del ciclo celular (Liso *et al.*, 1988, Smirnoff, 1996) y en el alargamiento celular (De Tulio *et al.*, 1999).

El sistema de regeneración del GSH y ASC se mantiene por las enzimas del ciclo del ASC-GSG; APX, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR), usando el poder reductor del NADPH (Fig. 4) (Blokhina *et al.*, 2003). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es convertido a  $\text{H}_2\text{O}$  por medio del ciclo del ascorbato-glutatión, el agente reductor en la primera reacción es catalizada por la APX a ASC, el cual es oxidado a monodehidroascorbato (MDHA), la MDHAR reduce al

MDHA a ASC con la ayuda del NAD(P)H; el dehidroascorbato (DHA) se produce espontáneamente a partir del MDHA y puede ser reducido a ascorbato por la DHAR, con la ayuda del GSH, el cual es oxidado a GSSG y posteriormente es reducido a GSH por la GR, con la ayuda del NAD(P)H (Apel y Hirt, 2004). Las enzimas APX, MDHAR, DHAR y GR, se encuentran en cloroplastos, citosol, mitocondria y peroxisomas (Dat *et al*, 2000).



**Figura 6.** Ciclo del ASC-GSH (ruta Halliwell-Asada). A. Glutati3n reducido y oxidado. B. Ascorbato y dehidroascorbato y C. Ciclo del asc3rbico-glutati3n, APX, Ascorbato peroxidasa, MDHAR, monodehidroascorbato reductasa, DHAR, dehidroascorbato reductasa, GR, glutati3n reductasa (Tomado de May *et al*, 1998).

### 2.3.2.2. SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMATICO

Las superóxido dismutasas (SODs), una familia de metaloenzimas, son las encargadas de captar el radical  $O_2^{\cdot}$  mediante una dismutación (reacción de óxido reducción) y así convertirlo en  $H_2O_2$ . Esta reacción es 10,000 veces el doble de rápida que la reacción de dismutación espontánea (Bowler *et al*, 1992). La SOD está presente en todos los organismos aerobios y en todos los compartimentos susceptibles al estrés oxidativo (Bowler *et al*, 1992). En plantas, se han descrito tres isoenzimas, las cuales se han clasificado con base en el cofactor del metal que presentan; FeSOD en cloroplastos, MnSOD en mitocondria y Cu/ZnSOD en citosol y cloroplastos. Estas isoenzimas difieren en su sensibilidad al  $H_2O_2$  y al KCN (Bannister *et al*, 1987). Las tres isoenzimas son codificadas en el núcleo y se ha demostrado que la expresión de los genes para SOD son regulados por el estrés ambiental, y que probablemente sea una consecuencia al incremento en la formación de ROS.

La catalasa (CAT) y las peroxidasas son las principales enzimas encargadas de regular los niveles de  $H_2O_2$ , convirtiendo  $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$  (Willekens *et al*, 1995, Dat *et al*, 2000). La catalasa se encuentra en peroxisomas y glioxisomas, donde se genera  $H_2O_2$  por la actividad de enzimas como la glicolato oxidasa.

Por otro lado, las peroxidasas son glucoproteínas involucradas en varios procesos fisiológicos tales como: catabolismo de auxinas, crecimiento y desarrollo, composición de la pared celular (polimerización de alcohol a lignina), relajamiento de la pared celular y respuesta a factores de estrés (Bellani *et al*, 2002).

Por lo tanto, la importancia en el balance entre el sistema enzimático antioxidante y no enzimático, para regular específicamente diferentes ROS y su ubicación celular, es crucial para suprimir el efecto tóxico de los niveles de éstos en la célula (Dat *et al*, 2000; Apel y Hirt, 2004).

### 2.3.2.3 SISTEMA ANTIOXIDANTE Y ROS Y DURANTE LA GERMINACION

La producción de ROS se inicia con la hidratación de la semilla, y se atribuye al aumento de la actividad mitocondrial, aunque también se ha postulado que el aumento de ROS se debe a la actividad de la NADH oxidasa que se localiza en la membrana

celular, ya que su inhibición lleva a la reducción o no ocurrencia de la germinación (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008), lo que ha llevado a postular que ciertas concentraciones de ROS son necesarias para inducir la tolerancia al estrés propuesta que apoya la capacidad dual de las ROS, moléculas que alteran de manera negativa los componentes celulares y su papel en la señalización (Bhattacharjee, 2012).

La producción de  $H_2O_2$  se ha demostrado durante el inicio de la imbibición de semillas de soya, rábano, maíz, girasol, trigo, chícharo y tomate. Mientras que los radicales hidroxilo y superóxido se acumulan durante la germinación de varias especies de semillas como soya rábano, maíz, girasol trigo y tomate (Bailly, 2004) y que se sugieren se deben principalmente a la actividad de las enzimas de la pared celular que lleva a la elongación de la célula y/o bien a la actividad respiratoria (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008).

Se ha sugerido que el aumento de  $H_2O_2$  juega un papel importante en la ruptura de la dormancia de la semilla, a través de la activación de factores de transcripción, por lo que a pesar de un efecto perjudicial por parte de esta molécula y sus productos, la célula no elimina del todo su concentración (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008).

Durante la germinación no solo hay aumento en el contenido de ROS, sino también de moléculas que se encargan de su detoxificación. Existen varios reportes en donde se han descrito cambios en la actividad del sistema antioxidante durante la germinación. Por ejemplo, se sabe que las semillas ortodoxas, están desprovistas de ASC en la forma reducida, en semillas de *Sorghum bicolor* (Simontacchi *et al*, 2003), en trigo (De Gara *et al*, 1997), en *Chenopodium rubrum* (Ducic *et al*, 2003) y en semillas de *Pinus pinea* (Tommasi *et al*, 2001), y gradualmente aumenta, ya que su síntesis es *de novo*, y se metaboliza en la semilla tiempo después de iniciado el proceso de germinación. Sin embargo, en semillas de *Cassia angustifolia* sometidas a estrés salino, el contenido de ASC disminuye (Agarwal y Pandey, 2004). Por otro lado, se ha observado que el contenido de GSH aumenta y el contenido de GSSH disminuye (Kranner *et al*, 1993; Tommasi *et al*, 2001; Simontacchi *et al*, 2003).

La actividad de la APX durante el proceso de germinación es semejante al contenido de ASC (Cakmak *et al*, 1993; De Gara *et al*, 1997; Tommasi *et al*, 2001), ambos aumentan conforme avanza la germinación. Sin embargo, su actividad puede ser detectada (Cakmak *et al*, 1993) o no (De Gara *et al*, 1997) desde el inicio de la

germinación. Por otro lado, se sabe que la actividad de las peroxidasas aumenta tiempo antes de emerger la radícula (Bellani, 2002). Ambas actividades son coincidentes con la aparición del metabolismo oxidativo de lípidos (final de la fase II); (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008).

En cuanto a la actividad de la CAT, ésta se detecta el inicio de la germinación y aumenta conforme avanza el proceso (Gidrol *et al*, 1994; Mullen *et al*, 1995; Wojtyla *et al*, 2001; Ducic *et al*, 2003; Agarwal y Pandey 2004). Un comportamiento similar de la CAT se ha reportado para la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) (Leprince *et al*, 1990; Gidrol *et al*, 1994; Wojtyla *et al*, 2001; 2008; Ducic *et al*, 2003; Agarwal y Pandey, 2004).

Cabe señalar que la CAT y la SOD se consideran las enzimas antioxidantes más eficientes, y junto con las peroxidasas son consideradas las principales enzimas encargadas de remover las ROS (Blokhina *et al*, 2003).

En cuanto a la actividad de la glutatión reductasa (GR) durante la germinación, se ha reportado que en semillas de maíz (Leprince *et al*, 1990), de trigo (Cakmak *et al*, 1993), de chícharo (Wojtyla *et al*, 2001) y de *Pinus pinea* (Tommasi *et al*, 2001), está presente desde el inicio de la germinación, y ésta aumenta progresivamente con respecto al tiempo.

Las ROS son un componente central en las respuestas al estrés y su contenido pueden llevar a la muerte a la célula o bien a responder defendiéndose (Bhattacharjee, 2012).

Numerosos estudios reportan un incremento en la generación de ROS causando un desequilibrio en la homeostasis de la célula durante el déficit de agua. La acumulación de ROS durante tales condiciones, originados principalmente de la declinación en la fijación de CO<sub>2</sub>, lleva a un alto lavado de electrones hacia el O<sub>2</sub>. Otros cambios dependientes de las ROS asociados al déficit de agua, es la peroxidación de lípidos, un indicador comúnmente usado para el estrés oxidativo. (Iturbe-Ormaetxe, 1998, Moran *et al*, 1994, Aziz y Larher, 1998, Cruz de Carvalho, 2008; Sharma *et al*, 2012).

Se ha documentado ampliamente el estudio de las ROS durante la germinación en semillas de importancia agrícola y de manera escasa en especies silvestres, encontrándose que el aumento de las ROS se inicia al comenzar la toma de agua por la



semilla, y el sistema antioxidante enzimático se induce conforme progresa la germinación, pero se desconoce si este patrón de actividad se altera cuando la semilla es sometida a estrés hídrico y si se asocia a la capacidad o duración de la germinación. Por lo anterior en este estudio se utilizó una especie de un ambiente natural y se expuso a condiciones de estrés hídrico para determinar si los niveles de superóxido y peróxido así como su sistema antioxidante enzimático se alteraban por efecto del estrés durante el proceso de germinación.

#### **2.4. RESERVAS EN SEMILLAS Y SU RELACION CON LA PRODUCCIÓN DE ROS**

Se tiene documentado que semillas con un alto contenido de lípidos presentan un corto periodo de vida, el cual no solo está relacionado con la estabilidad de los lípidos en almacenaje, sino a la actividad autocatalítica y lipolítica, llevando a la formación de ácidos grasos libres, contribuyendo a la generación de ROS y al daño a moléculas que se encuentran cercanas a estos productos.

El agua es el principal factor que contribuye a la peroxidación de lípidos, ya que el oxígeno puede reaccionar con éstos (Hendry, 1993; Mc Donals, 1999; citados en Bradford, 2004). Más aún, a altas temperaturas y altos contenidos de humedad relativa (HR) la lipoperoxidación se incrementa exponencialmente.

En semillas con alto contenido de carbohidratos, se tiene reportado que los organismos tolerantes a la desecación generalmente presentan altos niveles de disacáridos y otros oligosacáridos, los cuales participan en la estabilidad de las membranas y en estado deshidratado confieren propiedades estables del estado vítreo, contribuyendo a la longevidad de las semillas (Vaklich, 1985, citado en Smith y Berjak, 1995; Mayayana *et al*, 2000) manteniendo la integridad de membrana y la estabilidad de macromoléculas como las proteínas (Bernal-Lugo y Leopold, 1998).

En general la hidrólisis de lípidos, proteínas y carbohidratos toma lugar bajo condiciones desfavorables de temperatura y humedad, estas condiciones permiten el crecimiento de hongos y una alta actividad metabólica que genera ROS y por lo tanto oxidación de los componentes de la semilla; siendo más susceptibles a sufrir estos daños las semillas que presentan mayor cantidad de lípidos, que las semillas que contienen predominantemente carbohidratos.

En semillas con altos contenidos de lípidos, la autooxidación que los lípidos pueden presentar en presencia de O<sub>2</sub>, que se encuentra en el agua, durante la imbibición, podría aumentar (Chan, 1987; Baily, 2004). Así mismo, la movilización de lípidos durante la germinación puede llevarse a cabo cuando se utilizan como sustrato para la respiración (Bradford, 2004) por medio de la β-oxidación, en la que se genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o bien durante la actividad del ciclo del glioxilato, ya que una cantidad importante de ácidos grasos pueden movilizarse para la formación de esqueletos carbonados en los glioxisomas, en los cuales se han detectado una gran cantidad de enzimas oxidativas (El-Maarouf-Bouteau y Baily, 2008).

En el caso de semillas con altos contenidos de carbohidratos, se sabe que un alto contenido de sacarosa o polímeros que usan este esqueleto como rafinosa y verbascosa, está relacionado con la tolerancia al estrés. Se ha sugerido que la acumulación de estos carbohidratos remplazan al agua, ya que establecen puentes de hidrógeno con las moléculas que normalmente se encuentran hidratadas, como las porciones polares de la membrana o bien con las proteínas, el resultado es el mantenimiento de la integridad de la membrana, y la estructura terciaria de las proteínas (Leopold *et al*, 1994; Buitink, 2000 en Bradford, 2004).

## **2.5. GERMINACION EN SEMILLAS DE LA SELVA BAJA CADUCIFOLIA (SBC)**

La disponibilidad de agua del suelo es considerada una de las principales causas en la disminución de la germinación de las semillas. Pueden ocurrir periodos de sequía durante el proceso de germinación en condiciones naturales, disminuyendo el potencial hídrico del ambiente, afectando el proceso de absorción por la semilla, impidiendo que el proceso de germinación llegue a buen término (Mian y Nafziger, 1994). El déficit hídrico puede resultar en un retraso y reducción de la germinación o inhibirla completamente (Hegarty, 1977; Gummerson, 1986; Dawset *al*, 2002; Rodríguez-Rivera *et al*, 2007).

Es importante recalcar que la germinación de semillas de las SBC han recibido poca atención científica y por lo tanto, los aspectos básicos de su ecología siguen sin entenderse (Bonfil y Trejo, 2010). En lo referente al proceso de germinación y factores que influyen en la germinación de semillas en estos ambientes, se sabe que la mayoría

de las especies vegetales de la SBC dispersan sus semillas meses antes de que se establezca el periodo de lluvias y se presenten las condiciones de humedad necesarias para germinar (Baskin y Baskin, 1998; Ceccon, 2006). Sin embargo algunas de las especies vegetales de la SBC poseen la capacidad de germinar bajo condiciones de potenciales hídricos negativos como: *Acacia senegal* (-1.4 MPa), *A. tortilis* (-1.0 MPa), *Leucaena leucocephala* (-1.6 MPa), *Cassia obtusifolia* (-0.5 MPa) y *C. occidentalis* (-0.5 MPa)(Khurana y Sing, 2001).

Con base en lo anterior es importante continuar con investigaciones que provean información sobre el comportamiento que las semillas de la SBC presentan, sobre todo bajo condiciones de baja disponibilidad de agua, que son las condiciones predominantes la mayor parte del tiempo en este tipo de vegetación.

## **2.5.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Durante el proceso de germinación las semillas de *Alvaradoa amorphoides* en el ambiente natural, se enfrentan a condiciones de déficit hídrico, lo que puede llevar a una sobreproducción de ROS, los cuales serán regulados por una actividad eficiente del sistema antioxidante.

### **2.5.1.1. JUSTIFICACIÓN**

La presente investigación tiene como objetivo contribuir al conocimiento sobre la fisiología de la germinación en especies de la SBC de Xochicalco, Morelos, México, específicamente conocer la respuesta antioxidante y la generación de ROS que las semillas presentan durante la germinación bajo condiciones de estrés hídrico. Cabe mencionar que existen pocos estudios sobre el comportamiento del sistema antioxidante durante la germinación de especies de comunidades vegetales naturales, aunque hay amplia información de su ocurrencia en especies de importancia económica y bajo condiciones óptimas de germinación (Bailly, 2004). Este tipo de estudios son importantes para la comprensión de las selvas bajas caducifolias, desde perspectivas ecológicas, evolutivas y de manejo (Wyatt-Smith, 1987, Schupp *et al*, 2002).

### III HIPÓTESIS

Bajo condiciones naturales, las semillas de *A amorphoides* enfrentan condiciones variables en la disponibilidad de agua, lo cual provoca estrés hídrico, por lo tanto las semillas para tolerar dichas condiciones y poder germinar, deben hacer ajustes en la actividad del sistema antioxidante.

## IV OBJETIVOS GENERALES

Estudiar el efecto que producen condiciones variables de humedad en el porcentaje de germinación en semillas de *A. amorphoides* en condiciones naturales.

Estudiar el efecto que producen en condiciones de laboratorio potenciales hídricos negativos en la germinación y en el sistema antioxidante en semillas de *Alvaradoa amorphoides* de la selva baja caducifolia de Xochicalco, Morelos.

### 4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el porcentaje de germinación en condiciones de campo y de laboratorio en semillas de *A. amorphoides*.
2. Conocer el contenido de humedad en el suelo de la Selva Baja Caducifolia de Xochicalco Morelos a lo largo del año y conocer si existe relación entre el contenido de humedad y el porcentaje de germinación en campo.
3. Obtener las curvas de germinación, imbibición y consumo de oxígeno durante el proceso de germinación bajo diferentes condiciones de potencial hídrico en semillas de *A. amorphoides*.
4. Determinar el contenido y porcentaje de compuestos de reserva (lípidos, proteínas y carbohidratos) de semillas de *A. amorphoides*.
5. Evaluar los niveles de ROS ( $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot}$ ) durante la germinación con diferentes condiciones de potencial hídrico en semillas de *A. amorphoides*.
6. Evaluar la actividad de algunas enzimas antioxidantes como la Catalasa (CAT), la Ascorbato peroxidasa (APX), la Glutación reductasa (GR) y la Superóxido dismutasa (SOD) durante la germinación de *A. amorphoides* sometidas a diferentes condiciones de potencial hídrico.

## V MATERIALES Y MÉTODOS

### Unidad de estudio

#### Biología de *A. amorphoides*

Descripción Botánica (Niembro, 1986, Salazar y Soihet, 2001)

Reino Plantae

Orden Sapindales

Familia Simaroubacea

Género *Alvaradoa*

Especie *Alvaradoa amorphoides* Liebm

Nombres comunes: Camarón, pie de gallo, plumajillo,

Especie arbórea dioica con alturas de 4-20 m y diámetros de tallo entre 20 a 30 cm, el cual se ramifica desde un 50% de su altura, la copa es estrecha, la corteza es de color gris a anaranjado, y es lisa con numerosas lenticelas. Las hojas son compuestas alternas, imparipinadas de 5 a 32 cm de hojuelas, alternas, ovaladas u oblongas, redondeadas en el ápice y la base, membranáceas, de 1 a 3.5 cm de largo y de 4 a 12 mm de ancho. Verde oscuro y brillante en el haz, verde claro y pubescente en el envés. Inflorescencias en racimos, las masculinas de 20 cm de largo y las femeninas de 15 cm de largo, flores con cinco sépalos cortos, sin pétalos, las masculinas con 5 estambres y las femeninas con ovarios de dos a tres lóculos y dos a tres estilos. Los frutos son sámaras, ligeramente rojizas, de 17 a 20 mm de largo y 3 mm de ancho, lanceoladas a lanceolado-elípticas, acuminadas, con los márgenes provistos de numerosos pelos cortos y blancos a manera de cilios. Cada fruto contiene una sola semilla.

La madera es moderadamente pesada, con un peso específico de 0.58 g/cm<sup>3</sup>. La altura es de color gris café claro y el duramen gris pardo. Tiene grado levemente entrecruzado, textura fina y homogénea y lustre de regular a elevado. Es fácil de trabajar, preservar y secar. Tiene una alta durabilidad natural. Es utilizada en carpintería para muebles, cajas, ebanistería, chapa y contrachapado. Produce leña de elevada calidad. La infusión de la corteza se utiliza en medicina casera como tónico digestivo y como remedio para la tos. Es plantada como ornamental.

## Distribución y hábitat

Se distribuye naturalmente desde Florida en Estados Unidos, México, las Antillas hasta América del Sur. Su distribución altitudinal varía de los 0 a 1400 msnm. Especie típica de vegetación secundaria. Crece en elevaciones bajas con climas de secos a húmedos. Tolera suelos pobres y pedregosos.

## Floración y fructificación

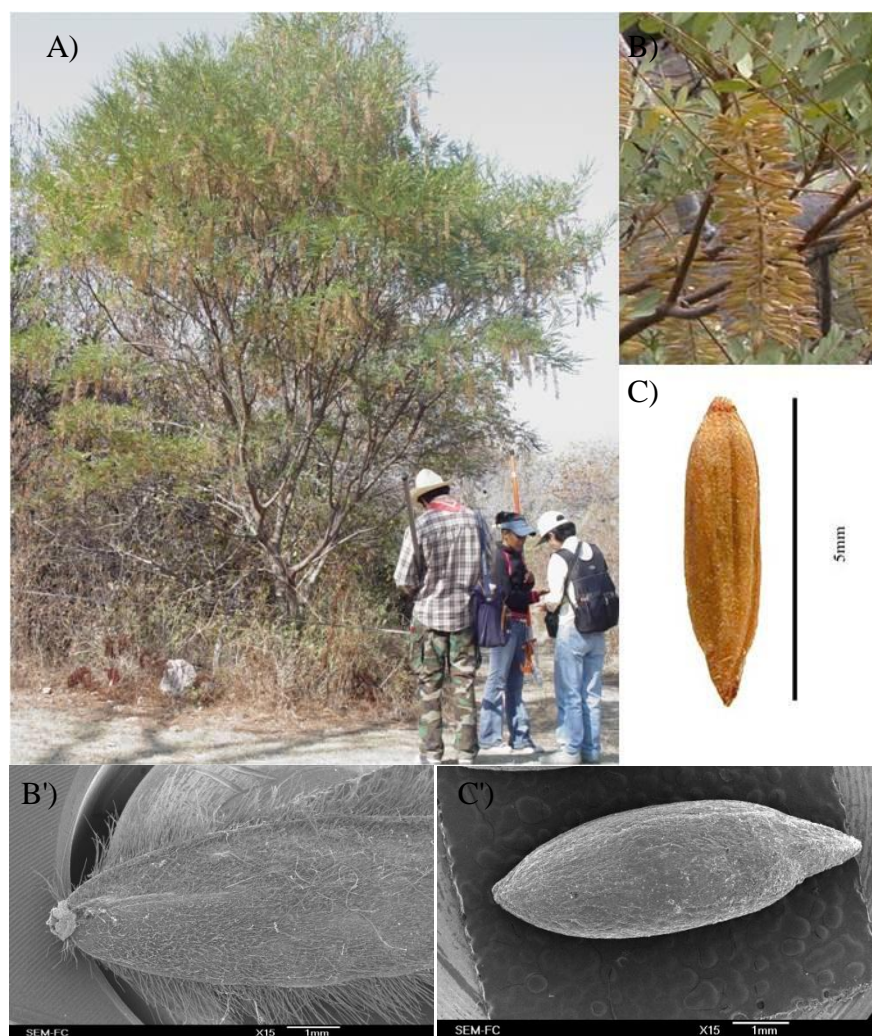
Floración. La especie florece en noviembre en El Salvador, de noviembre a enero en Costa Rica, de abril a agosto en Bolivia.

Fructificación. Los frutos se producen de diciembre a marzo en Costa Rica y en abril en México. La dispersión es anemócoria.

## Semilla

Tiene forma elíptica, comprimida de 5.5 a 6 mm de largo. La testa es de color castaño, lisa, opaca, membranosa; el embrión es recto, comprimido, color amarillo pálido y ocupa toda la cavidad de la semilla. Tiene dos cotiledones grandes, planos carnosos y oblongos. La radícula es corta. Carece de endospermo. Mantienen su viabilidad hasta 9 meses en ambientes secos y frescos, en envases cerrados.

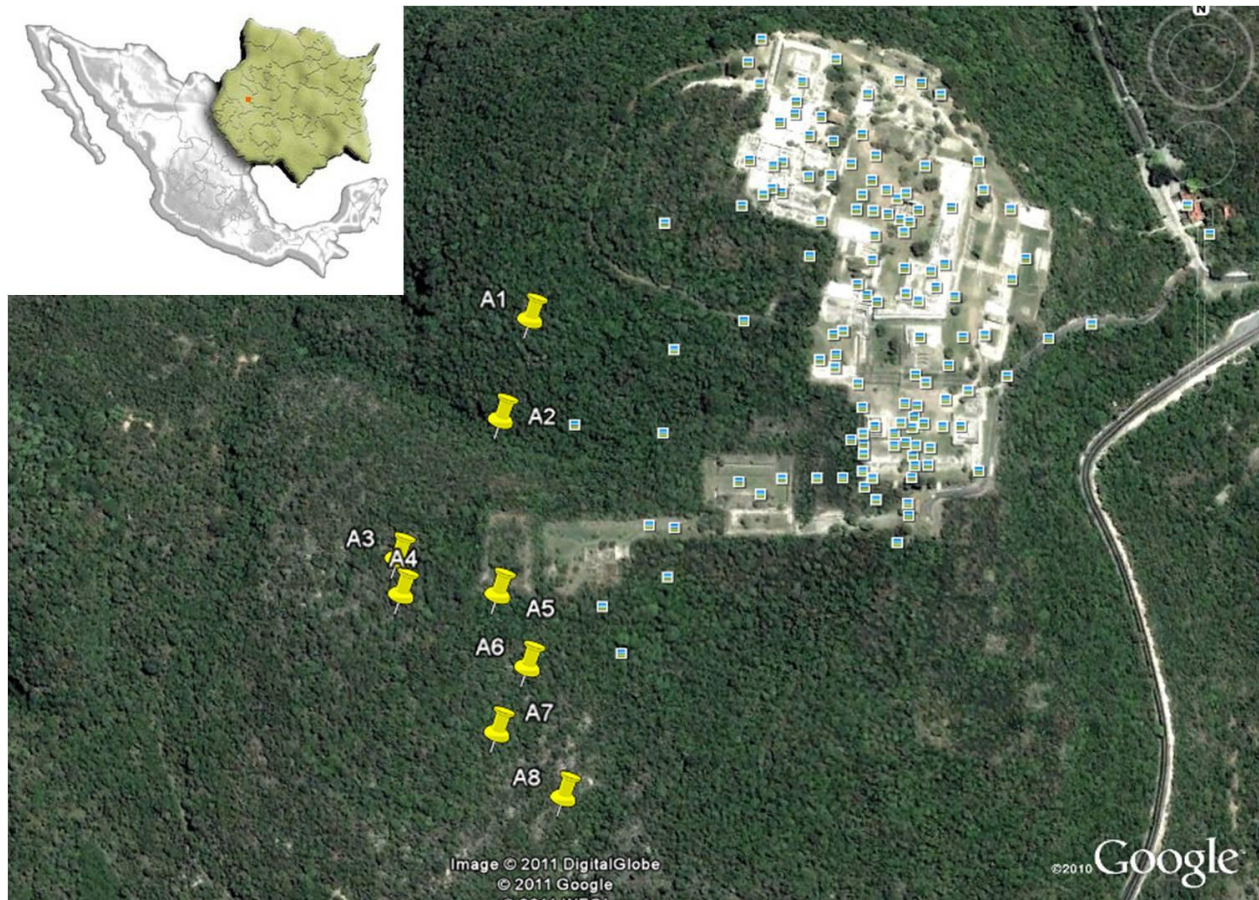




**Figura 7.** *Alvaradoa amorphoides*: A) Árbol; B y B') Fruto; C y C') Semilla.

**5.2. Material biológico:** Se colectaron semillas de *Alvaradoa amorphoides* en la SBC en el estado de Morelos, municipio de Miacatlán que se localiza a los 18°20' y 18°08' de latitud N y los meridianos 98°38 y 99°30'W, dentro de la zona arqueológica de Xochicalco (Fig. 8). Esta zona presenta un clima de tipo cálido subhúmedo, con temperatura media anual que va de los 22° a los 24°C. Su precipitación media anual oscila entre los 1,000 y los 1500 milímetros al año (Gómez-Garzón, 2002; CEZA INIFAP, 2005) con 8 meses de sequía bien definidos que van de octubre a mayo y cuatro meses de lluvia, que abarcan de junio a septiembre.

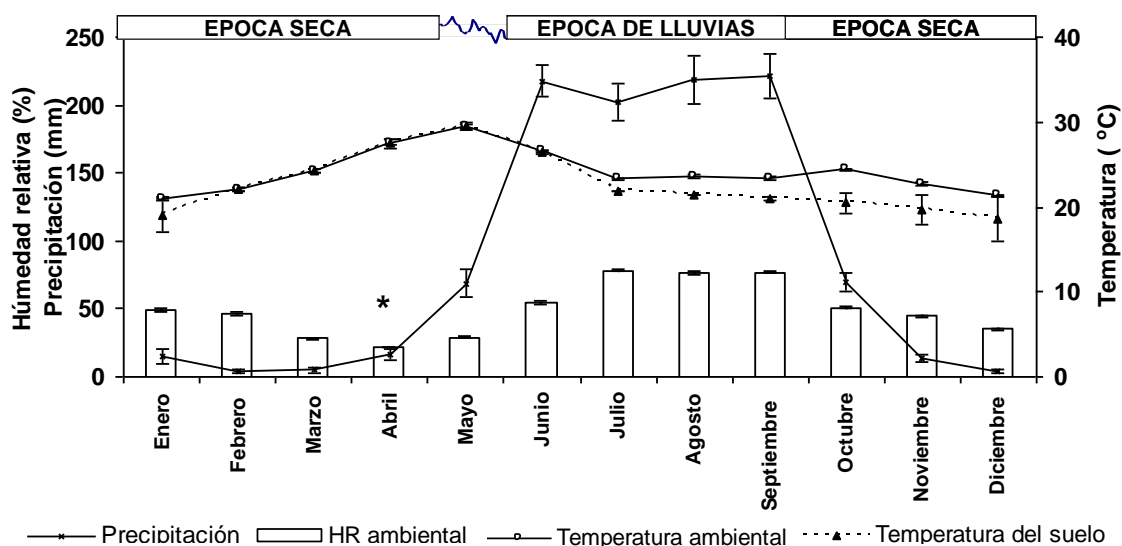
Las especies más importantes representadas en el área fueron: *Bursera copalifera* (Burseraceae), *Pseudosmodium perniciosum* (Anacardiaceae), *Bursera glabrifolia* (Burseraceae), *Ipomoea wolcottiana* (Convolvulaceae), *Alvaradoa amorphoides* (Simarubaceae) y *Dodonea viscosa* (Sapindaceae) (Gómez-Valencia 2006).



**Figura 8.** Ubicación de la zona de estudio de *A. amorphoides*, Xochicalco, Morelos México ( $18^{\circ}22'$  -  $19^{\circ}07'$  N, and  $98^{\circ}37'$  -  $99^{\circ}47'$  W). Los puntos amarillos muestran los sitios donde se localizan los ocho arboles (A) muestreados.

**5.2.1. Condiciones ambientales:** Se monitoreó el clima de la zona, colocando registradores de datos tanto de un canal de temperatura, como de dos canales, uno de temperatura y otro de humedad relativa del ambiente (Marca Onset Computer Corporation) en 4 sitios a lo largo de la zona de estudio durante todo el año de 2009. Las coordenadas por sitio fueron: Sitio 1:  $10^{\circ}48'13''$ N,  $99^{\circ}17'58''$ O, Sitio 2:  $18^{\circ}48'10''$  N,  $099^{\circ}17'59''$ O, Sitio 3:  $18^{\circ}48'06''$ N,  $099^{\circ}18'02''$ O, Sitio 4:  $18^{\circ}48'05''$  N,  $099^{\circ}17'59''$ O).

Los registros de los sensores de temperatura, humedad relativa y los datos meteorológicos de la zona se muestran en la figura 9.



**Figura 9.** Datos meteorológicos de precipitación, durante los años 1952-2005 tomados de la estación del campo experimental Zacatepec, Morelos (CEZA INIFAP) cercana a la zona. Los datos de humedad relativa y temperatura media mensual, son los registrados durante el año 2009, en la zona arqueológica de Xochicalco, Morelos, México. \* indica el mes en que fueron colectadas las semillas.

**5.2.2. Evaluación del porcentaje de germinación en campo:** el porcentaje de germinación de *A. amorphoides* fue evaluada en condiciones de campo. Se seleccionaron ocho árboles de *A. amorphoides* localizados en diferentes geformas (Fig. 10). Estas geformas representaban: pie de monte, ladera y cima. Estos sitios se escogieron con la finalidad de determinar las diferentes condiciones de humedad del suelo, dadas por las pendientes en las que estaban colocados. Bajo cada árbol, se colocaron un total de 200 semillas en lotes de 50 semillas, las cuales se guardaron en bolsas de tela de organza (de 25 X 15 cm). Cada bolsa fue colocada a una distancia de 2 m del tronco de cada árbol, y se enterraron a una profundidad relativa de 0.5 a 1 cm, y en las cuatro direcciones: N, S, E y W, con el fin de abarcar toda el área alrededor de cada individuo (4 bolsas en total), se dejaron enterradas por 45 días (Fig. 10). Se

evaluó el porcentaje de germinación promedio por sitio y el porcentaje del promedio total de germinación para la zona.

**5.2.3. Contenido del porcentaje de humedad en el suelo:** (Tabla 1) Para determinar la humedad del suelo, se colectaron 3 muestras de suelo sin perturbar con un nucleador (cilindro metálico de 100 ml), a tres distancias del tronco de cada árbol: 1, 1.5 y 2 metros y en las direcciones: N, S, E y W, teniendo en total 12 muestras por árbol. Los árboles fueron los mismos que se seleccionaron para el experimento de germinación. Las muestras de suelo se trasladaron al laboratorio para determinar su peso fresco, y posteriormente se secaron en una estufa a 100°C durante 24 h. Se obtuvo el peso seco de las muestras y se determinó el porcentaje de humedad de acuerdo con Siebe *et al*, (2006), utilizando la siguiente fórmula:

$$((W1-W2)/(W2))*100$$

Donde W1 es el peso inicial o fresco del suelo (mg) y W2 (mg) es el peso seco del suelo. Los datos se representan como el promedio de Humedad Relativa (%) por sitio y para la zona.

**5.3. Determinación del contenido y porcentaje de compuestos de reserva:** Las semillas colectadas de *A. amorphoides* se molieron en nitrógeno líquido. Para la extracción de proteínas se utilizó un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7, y la concentración de proteínas se cuantificó por el método de Bradford (1976).

Para la determinación de carbohidratos se realizó una extracción etanólica, seguida de una centrifugación a 14000 rpm. La cuantificación del almidón se determinó después de una hidrólisis ácida, que se llevó a cabo en una solución amortiguadora de acetatos 0.2 M, pH 4.5 con  $\alpha$ -aminoglucosidasa (7mg/ml) de *Aspergillus niger* para producir glucosa, la muestra se incubó por 12 h, a 37°C. Tanto la glucosa, la sacarosa y la fructuosa se determinaron mediante un ensayo enzimático acoplado, utilizando un kit (Sigma) y basándose en la metodología descrita por Sánchez-Linares *et al* (2012), que se basa en la fosforilación de la glucosa por la hexocinasa y la reducción de NADH, este se mide a 340 nm y es directamente proporcional a la concentración de glucosa.

Para la cuantificación de lípidos se empleó el método de Folch, utilizando como medio de extracción de lípidos cloroformo (Sigma) y metanol (Sigma) en una relación 2:1, las muestras se homogenizaron con el medio de extracción y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos, posteriormente se incubaron a 60°C y finalmente por diferencia de peso se obtuvo la cantidad de lípidos presentes.

Para conocer la morfología de las semillas, las semillas se montaron y se cubrieron con una capa de oro (200 nm, Desk II, Denton Vacuum Inc., Moorestown, NJ, USA) y se obtuvieron imágenes con un microscopio electrónico de barrido (JSM5310-LV, JEOL, USA). Para evidenciar la presencia de lípidos en las semillas, dada la solubilidad de éstos en los solventes, se realizaron cortes longitudinales de 15 micras en fresco por congelación, en un criostato (Cryo-cut microtome, American corporations, modelo 8840) a -22 °C, posteriormente se colocaron las muestras en un portaobjetos y se procedió a teñir con el colorante rojo "O" de aceite y se realizaron observaciones al microscopio de luz (Olympus Provis AX70, Ciovani Brothers Inc. Scotia N.Y. U.S.A) para visualizar las reservas.

**5.4. Selección de potenciales hídricos para la germinación:** Los tratamientos de estrés hídrico se establecieron con base en ensayos de germinación en laboratorio a diferentes potenciales osmóticos (0 MPa, -0.1 MPa, -0.25 MPa, -0.5 MPa, -1.0 MPa y -1.5 MPa), seleccionando aquellos en los cuales se observara un retraso o disminución en el porcentaje de germinación.

#### **5.4.1. Porcentaje de germinación en diferentes condiciones de potencial hídrico in vitro.**

Las semillas fueron previamente esterilizadas con una solución de hipoclorito al 1% por un minuto, posteriormente se enjuagaron exhaustivamente con agua destilada estéril.

Para evaluar el efecto del déficit hídrico sobre la germinación, se prepararon las soluciones de Polietilenglicol (PEG) (SIGMA) utilizando el software SPPM (Solute Potencial, using molar–molal-g solute/g water) (Michel y Ratcliffe, 1995). Con éste programa se calcularon las concentraciones de PEG requeridas para obtener los diferentes valores de potencial hídrico previamente determinados: -0.5, - 1.0 y -1.5

MPa. Se utilizaron cajas de petri (6 cm), a cada una se le adicionaron 5 ml de la solución de PEG correspondiente a cada potencial hídrico y se colocaron 20 semillas. El control es decir semillas sin estrés hídrico consistió en agua destilada (0 MPa). Las cajas petri con las semillas se colocaron en una cámara de crecimiento (Convicon, G30, Canadá) a 27 °C, con un fotoperiodo de 12 h luz. El experimento fue un diseño completamente al azar con ocho repeticiones por tratamiento. Con estos datos se determinó el tiempo y porcentaje de germinación de las semillas en cada tratamiento, contando el número de semillas que germinaron a través del tiempo. Las semillas se consideraron germinadas cuando la radícula tenía 1 mm de longitud.

**5.5. Curva de imbibición:** Las semillas se pusieron a embeber en cajas de petri con los potenciales hídricos 0, -0.5, -1 y -1.5 MPa. Se realizaron tres repeticiones con 25 semillas cada una. Las semillas se cosecharon a las 0, 6, 12, 48, 72, 96 y 170 horas después de iniciar la imbibición. En cada tiempo se registró el peso fresco de cada lote (25 semillas) e inmediatamente después las semillas se colocaron en un horno a 105 °C por 24 horas ó hasta obtener un peso constante para el registro de su peso seco. El contenido de humedad se calculó de acuerdo con Krishnan, et al (2004) con la siguiente fórmula:

$$((W1-W2)/(W2))*100$$

Donde W1 es el peso inicial o fresco de la semilla (mg) y W2 (mg) es el peso seco de la semilla.

**5.6. Consumo de oxígeno durante la germinación:** Para éstos experimentos las semillas se incubaron en una cámara de germinación (Lab. Line Instruments Inc, 844, Melrose Park, Illinois, USA) bajo condiciones controladas a una temperatura de 27 °C y en oscuridad. El consumo de oxígeno se registró en semillas con 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 170 horas de iniciado el proceso de germinación, de todos los tratamientos (control y -0.5, -1.0, -1.5 MPa). Se utilizó un oxímetro YSI (modelo 35A Hellow Spring Corporation, USA) a temperatura ambiente, se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento. Para cada medición se utilizaron lotes de 25 semillas en un volumen de 5 ml de agua destilada (control), o bien, de las soluciones de PEG correspondientes a cada potencial

hídrico y con una agitación constante. Los datos se expresan en  $\eta$ átomos de Oxígeno  $h^{-1}$  semilla<sup>-1</sup>.

## **5.7. Niveles de ROS y actividad de enzimas antioxidantes durante la germinación de *A. amorphoides* en diferentes potenciales hídricos.**

**5.7.1. Medición de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se determinó siguiendo la metodología descrita por Jana y Choudhuri (1981). Brevemente, se homogenizaron 50 mg de semillas con un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.5 (en una relación 3:1), y se centrifugó a 6,000 g por 10 minutos. EL sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se mezcló con 1 ml de 0.1% de sulfato de titanio [en 20% de ácido sulfúrico (v/v)], y nuevamente se centrifugó a 6,000 g por 10 minutos. Posteriormente la reacción se midió por espectrofotometría a 410 nm (con un espectrofotómetro Varian, Cary 50).

Se llevaron a cabo tres repeticiones por medición y se realizaron 3 experimentos independientes. La concentración de peróxido de hidrógeno se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) del peróxido  $0.28 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  y se expresó en  $\mu\text{mol}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 50 mg de tejido en peso fresco.

**5.7.2. Extracción de proteínas y actividad de enzimas antioxidantes: CAT (E.C. 1.11.1.6), APX (E.C. 1.11.1.11), GR (E. C. 1.6.4.2) y SOD (EC. 1.15.1.1).**

Los extractos de proteína total se prepararon a partir de 225 semillas maduras secas viables (0 horas o tiempo inicial) y de semillas que tenían diferentes tiempos (6, 12, 48, 72 y 96 horas) de haberse iniciado el proceso de germinación y con diferentes potenciales hídricos (0, -0.5 y -1 MPa). Una vez realizada la cosecha, las semillas se molieron en un mortero con nitrógeno líquido. Las proteínas totales se extrajeron homogenizando las muestras (50 mg de tejido) en 1.5 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH: 7.0, este homogeneizado se centrifugó a 6,000 rpm por 15 minutos, a 4°C. El sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación a la misma velocidad por 10 min. El sobrenadante final (fracción de proteínas solubles) se utilizó para las determinaciones enzimáticas. La concentración de proteína en los diferentes extractos

se midió de acuerdo al método de Bradford (1976). Como estándar se utilizó albúmina sérica bovina (SIGMA).

La medición de la actividad enzimática se realizó por espectrofotometría (espectrofotómetro Varian, Cary 50).

5.7.2.1. La actividad de la catalasa (**CAT**, E.C. 1.11.1.6) se determinó a partir del decremento en la absorbancia de 240 nm por tres minutos, de la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (coeficiente de extinción 39.4 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), la reacción se llevó a cabo en 1 ml en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (pH 7) y 15 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de acuerdo con (Aebi, 1984) utilizando 50 µg de proteína total. Los datos presentados son el resultado de tres repeticiones y de tres experimentos independientes.

La actividad se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$Actividad = \frac{m \left( \frac{abs}{min} \right) * Vol\ reacción\ (mL)}{\varepsilon \left( \frac{L}{mmol * cm} \right) * 1\ cm * proteína\ (mg)} = \mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$$

Dónde:

m= pendiente

ε= 39.4 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

5.7.2.2. La actividad de la ascorbato peroxidasa (**APX**) se midió por el decremento en la absorbancia a 290 nm durante dos minutos (coeficiente de extinción 2.8 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), utilizando como sustrato al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de acuerdo con Jiang y Zhang (2002). La reacción se llevó a cabo en 1 ml en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (pH 7), que contenía 0.5 mM de ácido ascórbico, 0.1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1 mM de EDTA y 25 µg de proteína total. Los datos presentados son el promedio de tres repeticiones y tres experimentos independientes. La actividad se expresó en µmolmin<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>.



5.7.2.3. La actividad de la glutatión reductasa **GR** se determinó a partir de la oxidación del NADPH, monitoreado la absorbancia a 340 nm (coeficiente de extinción  $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La reacción se llevó a cabo en 1 ml en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (pH 7.5), NADPH 10 mM, GSSG 10 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  100 mM y 50 o 75  $\mu\text{g}$  de proteína total (Jiang y Zhang, 2002), la medición se evaluó por 5 minutos a intervalos de 20 segundos. Los datos presentados son el promedio de tres repeticiones y tres experimentos independientes. La actividad se expresó en  $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ .

5.7.2.4. La actividad de la superóxido dismutasa **SOD** (EC. 1.15.1.1) se realizó utilizando el método propuesto por Misra y Fridovich (1972), a partir de la autooxidación de la epinefrina. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 0.5 ml. El medio de reacción contenía amortiguador de carbonatos 50 mM, pH 10.2, EDTA 0.5 mM, epinefrina 10 mg/ml y 5  $\mu\text{g}$  de proteína, la medición se realizó a 480 nm (coeficiente de extinción  $4020 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por 15 minutos a intervalos de 10 segundos. Los datos presentados son el promedio de tres repeticiones y tres experimentos independientes. La actividad se expresó en  $\mu\text{mol adenocromo min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ .

5.7.2.5. Los niveles de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  ( $\mu\text{mol mg}^{-1}$ ) se calcularon utilizando la mayor absorbancia de la curva inicial al medir la actividad de la SOD, y el coeficiente de extinción molar, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración } \text{O}_2^{\cdot -} = \frac{\text{Abs} * \text{Vol reacción (mL)}}{\varepsilon \left( \frac{L}{\text{mmol} * \text{cm}} \right) * 1 \text{ cm} * \text{proteína (mg)}} = \mu\text{mol mg}^{-1}$$

Dónde:

m = pendiente

E = coeficiente de extinción

**5.7.3. Análisis de datos:** Se aplicó un análisis de correlación de Pearson para mostrar la relación entre el contenido de humedad del suelo y el porcentaje de germinación.

Los datos obtenidos de la actividad enzimática y concentración de ROS se analizaron con la varianza de dos factores, teniendo como factor 1 el tiempo y como factor 2 el

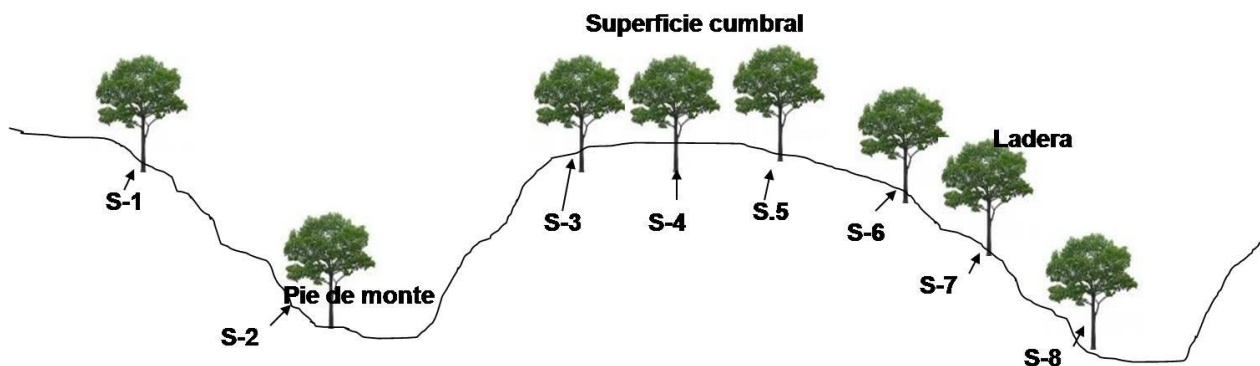
potencial hídrico, además de determinar si existe alguna interacción entre ambos factores (Daniel, 1984). Se utilizó el software Statistica 7, 2006.

## VI RESULTADOS

### Porcentaje de germinación en semillas de *A. amorphoides* bajo condiciones de campo

**No se observaron diferencias en el porcentaje de germinación de *A. amorphoides* en los sitios que presentaban diferentes humedades relativas y geofomas.**

Para evaluar el porcentaje de germinación de las semillas de *A. amorphoides* en condiciones de campo, las semillas que fueron enterradas debajo de ocho individuos distribuidos en la zona de Xochicalco Morelos (Fig. 10) muestran que durante el periodo de lluvias (junio-julio de 2010) el porcentaje promedio de germinación de las semillas colocadas en las diferentes direcciones alrededor de los árboles seleccionados fue de 42% (Tabla 1 y Fig. 10).



**Figura 10.** Tipo de geofoma en donde se muestra la ubicación de los sitios (S) de los ocho individuos de *A. amorphoides*, en donde se realizó el experimento de germinación en la Zona arqueológica de Xochicalco, Morelos, México. Cada individuo está representado por un árbol.

Este porcentaje de germinación se relacionó con el porcentaje de humedad que presentaba el suelo en cada uno de los 8 sitios o árboles (promedio de las 3 distancias monitoreadas (1 m, 1.5 m y 2 m)).

**Tabla 1.** Porcentaje de germinación y de contenido de humedad relativa, profundidad (cm), pendiente y geoforma en los ocho sitios muestreados durante un año en la zona de Xochicalco, Morelos.

# Sitio	Geoforma	Pendiente	Profundidad del suelo (cm)	Germinación (%)	% de humedad relativa del suelo*					
					Mayor	Junio	Julio** (2010)	Septiembre	Enero	Anual
1	Ladera	12°	5.04	45	16 ± 2	52±3	49±4	83±7	9±1	45
2	Pie de monte	2°	2.73	63	17±1	40±2	46±4	69±2	13±4	46
3	ladera	12°	2.17	61	16±1	46±2	50±2	69±2	11±1	50
4	cima	4°	1.41	32	12±1	36±3	46±2	63±4	10±1	46
5	cima	4°	1.41	60	16±1	25±1	23±2	42±3	4±1	23
6	Ladera	11°	1.41	35	8±1	31±3	28±4	54±4	8±1	28
7	Ladera	11°	1.41	9	5±1	50±5	59±4	86±5	14±1	59
8	Ladera	17°	0.65	21	11±1	42±2	41±1	63±2	9±4	41
	Promedio Total			42	13±1	42±6	43±1	67±2	10±1	

\* Media de 12 réplicas± error estándar

\*\* Mes en que la germinación fue evaluada en campo

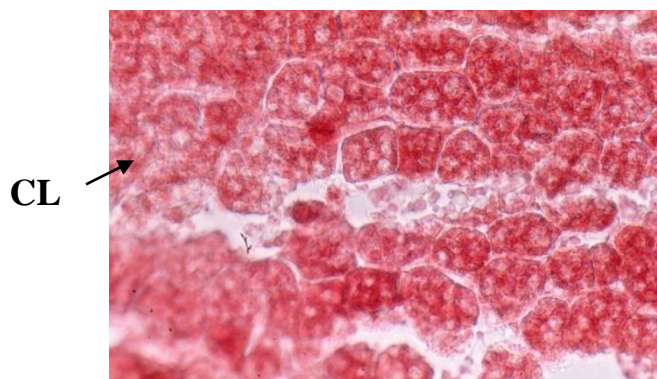
La Media de la humedad relativa anual fue calculada de 5 muestreos con cuatro repeticiones para cada sitio tomadas durante todo el año correspondiente al año 2010.

El porcentaje de humedad en el suelo se monitoreó a lo largo de un año completo (para incluir la temporada de lluvias y de sequía). Al evaluar el porcentaje de germinación promedio por sitio se encontró que el sitio dos (pie de monte), el sitio tres (ladera) y el sitio cinco (superficie cumbral), fueron los sitios en dónde las semillas de *A. amorphoides* mostraron el mayor porcentaje de germinación (63, 61 y 60 respectivamente), presentando valores de 46, 50 y 23 % de humedad relativa en el suelo y un suelo muy somero con una profundidad de 2.73, 2.17 y 1.41 cm. Las semillas enterradas en los sitios uno, cuatro y seis ubicados en ladera, superficie cumbral y ladera respectivamente, tuvieron un porcentaje de germinación de 45, 32 y 35%, estos sitios presentaron una humedad relativa de 49, 46 y 28%, y una profundidad

del suelo de 5.04, 1.41 y 1.41 respectivamente. En los sitios siete y ocho, ambos localizados en ladera, se observó el menor porcentaje de germinación, 21 y 19% y un porcentaje de humedad relativa de 59 y 41% respectivamente. El sitio ocho presentó la menor profundidad de suelo con solo 0.65 cm. No se encontró correlación estadísticamente significativa entre el contenido de humedad y el porcentaje de germinación ( $r=-0.0671$ ,  $p < 0.05$ ).

### **Las reservas predominantes en semillas de *A. amorphoides***

Se determinó cuantitativamente el porcentaje de reservas (carbohidratos, lípidos y proteínas) en semillas de *A. amorphoides*. Las reservas se localizan principalmente en los cotiledones y son predominantemente lípidos, en menor proporción proteínas y por último carbohidratos, siendo la sacarosa la de mayor proporción (Tabla 2). Por su alto contenido de lípidos las semillas de *A. amorphoides* son similares a las oleaginosas, y como se observa en la figura 11 presenta una cantidad importante de cuerpos lipídicos, (evidenciados por la tinción con el colorante rojo "O" de aceite). Cabe mencionar que no se cuantificaron otros compuestos de reserva como aminoácidos libres, proteínas insolubles, entre otros; por lo que los valores obtenidos no corresponden al 100%.



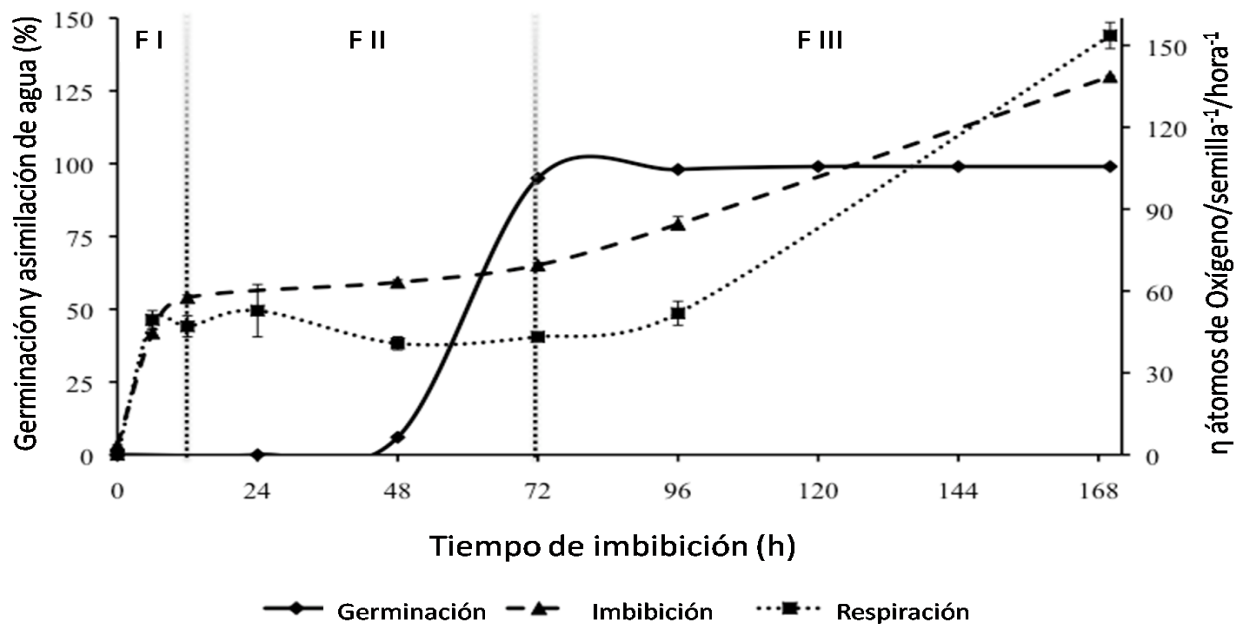
**Figura 11.** Corte longitudinal de cotiledones de *A. amorphoides* donde se observa la presencia de cuerpos lipídicos (CL). Aumento 355X, microscopía óptica.

**Tabla 2.** Porcentaje de reservas contenidas en semillas de *A. amorphoides*,

<b>Proteínas (%)</b>	<b>Lípidos (%)</b>	<b>Carbohidratos (%)</b>
1.06	63.1	Glucosa 0.051
		Fructuosa 0.0035
		Sacarosa 0.21
		Almidón 0.1
		Total = 0.365

### **Fases de la germinación en semillas de *A. amorphoides***

Se evaluaron los parámetros de imbibición, respiración y porcentaje de germinación, de las semillas de *A. amorphoides* en condiciones controladas de temperatura (27 °C) para conocer el proceso de germinación y ubicar las fases de dicho proceso. En estas condiciones las semillas de *A. amorphoides*, presentaron el característico comportamiento trifásico en la absorción de agua y en el consumo de oxígeno que se ha observado en semillas durante la germinación (Bewley y Black, 1997) (Fig. 12). La Fase I de la germinación comprendió desde el inicio de la imbibición (0 h) hasta las 6 h. En ella se observó un incremento en el peso de la semilla (30%). La Fase II de la germinación comprendió de las 6h hasta las 72h, a esta fase se le conoce como fase estacionaria y durante ella, en términos de consumo de oxígeno o incremento en peso no se observaron cambios significativos, sin embargo, se ha descrito que a nivel celular y metabólico es el más activo, ya que ocurre la preparación de las células para la elongación celular y emergencia de la radícula (Nonogaki, 2008). Por último, la fase III o fase post germinativa que inicia con la protusión de la radícula, para *A. amorphoides* inició a las 72 h, tiempo en el cual alcanzó el máximo porcentaje de germinación (98%).



**Figura 12.** Fases de la germinación, respiración y toma de agua (imbibición) en semillas de *A. amorphoides* germinadas a 27°C.

### Efecto del potencial hídrico

#### Bajos potenciales hídricos reducen el(máximo) porcentaje de la germinación en semillas de *A. amorphoides*

Para conocer la tolerancia al déficit hídrico de las semillas de *A. amorphoides* se evaluó el efecto del potencial hídrico como medida de estrés hídrico en el porcentaje de germinación en condiciones de laboratorio. Cuando las semillas de *A. amorphoides* se pusieron a germinar en condiciones de un  $\Psi_w$  de -0.5 MPa, el tiempo de germinación se retrasó 24 h respecto al tiempo en que germinaron las semillas del control, sin embargo el % máximo de germinación no se afectó. A  $\Psi_w$  de -1.0 MPa se retrasó nuevamente el tiempo de germinación ahora a 96 h comenzó la germinación y se observó una inhibición de 84 % respecto al control. Condiciones de  $\Psi_w$  de -1.5 MPa inhibieron totalmente la germinación (Fig. 13).

A pesar de lo anterior no se redujo la viabilidad de las semillas, ya que al colocar las semillas en condiciones óptimas de hidratación alcanzaron un porcentaje de germinación similar al que tuvieron las semillas control.

### **Contenido de humedad durante el proceso de germinación en semillas de *A.amorphoides* bajo diferentes potenciales hídricos.**

Respecto al contenido de humedad, o imbibición en las semillas durante el proceso de germinación, hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control. El contenido de humedad fue menor significativamente en los potenciales hídricos negativos, a partir de las 12 h en el potencial de -0.5 MPa se observó un contenido de humedad 11% menor al observado en las semillas control; en el potencial hídrico de -1.0 MPa un 25% menos, y a -1.5 MPa un 34 % menos. Esta disminución se va acentuando conforme avanza el tiempo de germinación, por ejemplo a las 96 horas las semillas expuestas a -0.5, -1 y -1.5 MPa tuvieron porcentajes de humedad de 57 %, 69 % y 73% respectivamente menores con respecto al control (Figura13B).

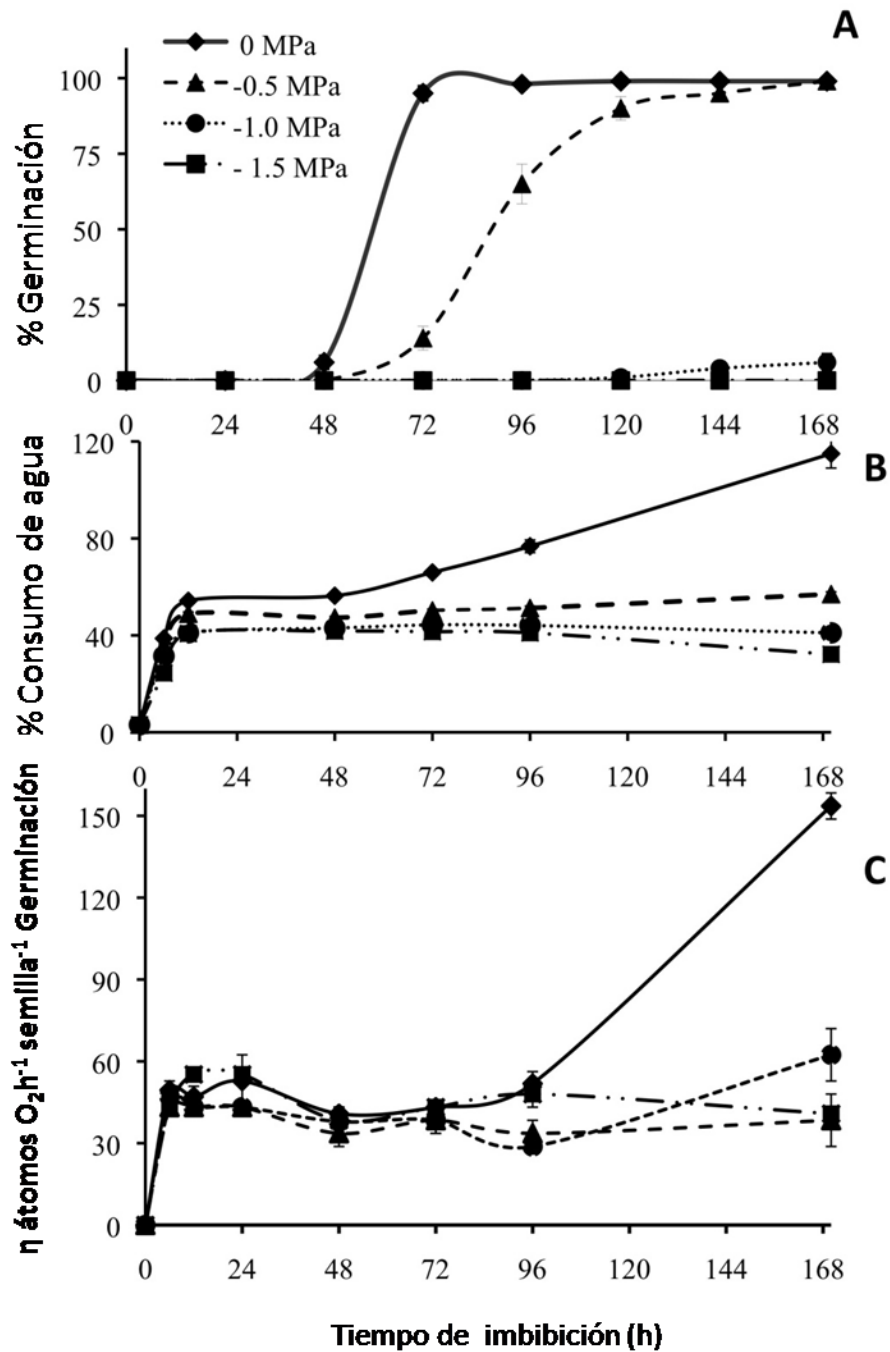
### **Consumo de oxígeno durante el proceso de germinación en semillas de *A. amorphoides* bajo diferentes potenciales hídricos**

El consumo de oxígeno se detectó en las primeras seis horas de la germinación (Fase I) en todos los tratamientos. No se observaron diferencias significativas en el consumo de oxígeno durante las fases I y II de la germinación con respecto a las semillas control y las expuestas a potenciales hídricos negativos hasta las 72 h de germinación. Sin embargo; a las 170 h (Fase III) fue estadísticamente significativa la diferencia entre el consumo de oxígeno de las semillas del control y las expuestas a los tres potenciales hídricos, siendo tres veces mayor en las semillas control (Figura 13). Este incremento en el consumo de oxígeno probablemente se debió al aumento del volumen celular, al desarrollo del embrión, a la radícula y a los cotiledones que ya eran evidentes a las 170 h.

Cabe señalar que las curvas de contenido de humedad y el consumo de oxígeno fueron similares entre sí no solo para los controles, sino también para los tratamientos. En este sentido es importante resaltar que las semillas expuestas a un potencial de -0.5 MPa aún y cuando germinan y alcanzan un 80-90% en la fase III de germinación, su consumo de oxígeno no aumentó, ni tampoco su peso húmedo. Por otro lado, las

semillas expuestas a los potenciales de -1.0 MPa y -1.5 MPa a partir de las 72 h, tuvieron un menor consumo de oxígeno comparado con el control y con las semillas expuestas a -0.5 MPa.





**Figura 13.** Efecto del potencial hídrico en el porcentaje de germinación de *Alvaradoa amorphoides*, (A), en el contenido de humedad (B) y en el consumo de oxígeno (C) en semillas germinadas a 27°C y un fotoperiodo de 12 h luz. Media ± error estándar, N= 8; p < 0.05 (prueba de Tukey).

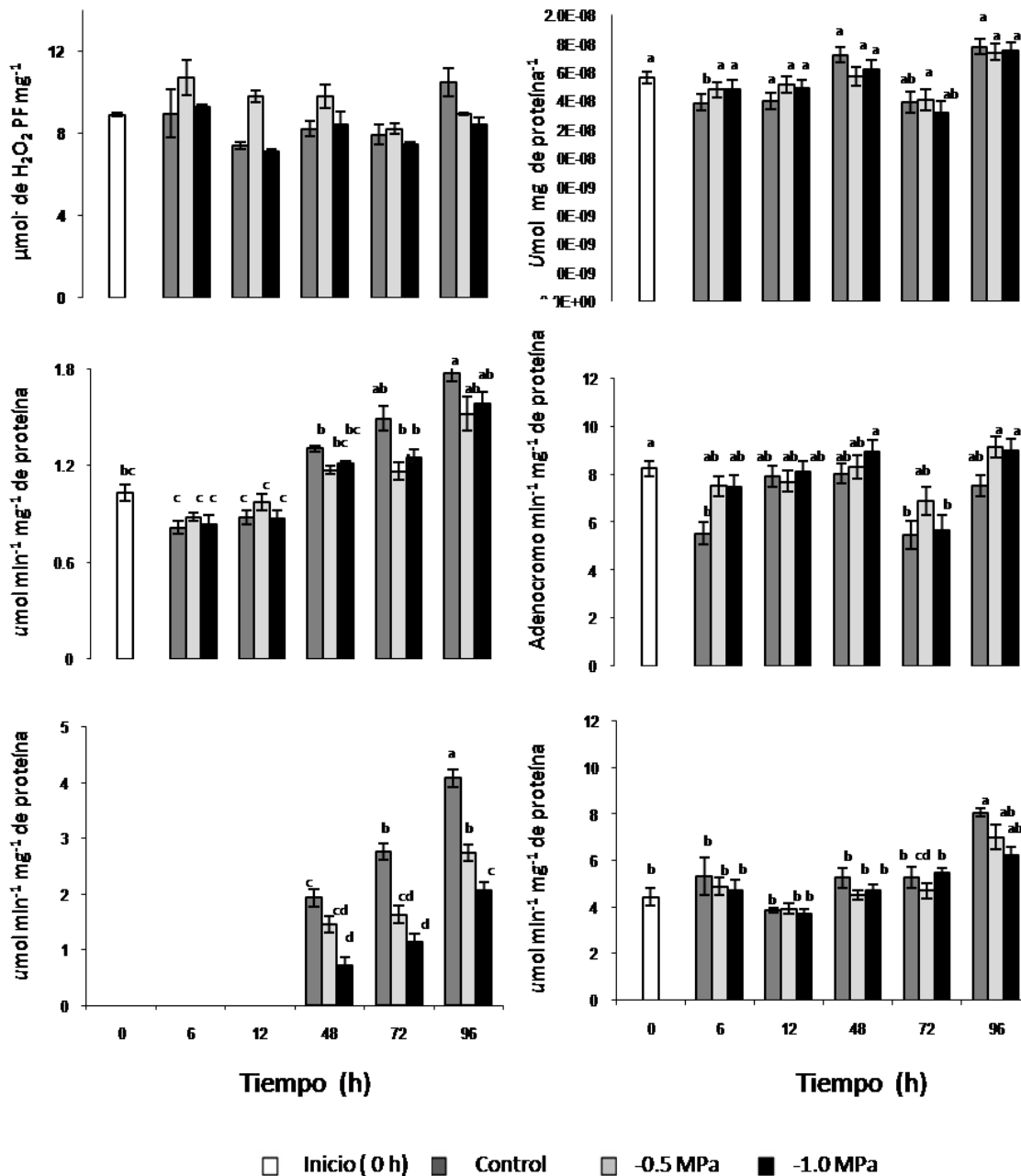
## **ROS y el sistema antioxidante durante el proceso de germinación**

**La actividad de la APX es la que se ve modificada con los potenciales hídricos negativos.**

En el estado seco de la semilla (tiempo 0) hubo una concentración basal de superóxido y de peróxido de hidrógeno, así como una actividad inicial de las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), y de glutatión reductasa (GR) (Fig.14). En relación con los niveles de ROS, no se observó un cambio significativo en las semillas expuestas a los potenciales hídricos negativos (Fig. 14B).

La actividad de las enzimas CAT, SOD y GR fue muy similar entre los tratamientos y a lo largo del tiempo (Fig. 14 C, D y F). La actividad de CAT fue similar de las 0 a las 12 h de germinación, y aumentó significativamente de las 48 a las 96 h, en todos los tratamientos (Fig. 14-C). De manera similar la actividad de la GR aumentó significativamente a partir de las 6 h 48 h en todos los tratamientos (Fig. 14 F).

La actividad de la APX presentó un comportamiento diferente, la actividad de esta enzima comenzó hasta las 48 h de iniciado el proceso de germinación, tanto en las semillas del control como en aquellas expuestas a los potenciales de -0.5 y -1 MPa. La actividad de la APX disminuyó en las semillas expuestas a los potenciales hídricos negativos; observándose diferencias estadísticamente significativas (Fig. 14E) (Apéndice I).



**Figura 14.** Efecto del potencial hídrico, durante la germinación de semillas de *A. amorphoides* en los niveles de (A) Superóxido, (B) Peróxido de hidrógeno, y en la actividad de las enzimas antioxidantes: (C) catalasa (CAT), (D) superóxido dismutasa (SOD), (E) ascorbato peróxidasa (APX) y (F) glutatión reductasa (GR). Media  $\pm$  error estándar, n= 8 p < 0.05 (prueba de Tukey) Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas; no se observaron diferencias significativas en la concentración de peróxido de hidrógeno. (Ver apéndice 1; tablas de anova y pruebas de Tukey).

## VII DISCUSIÓN

### Germinación de *A. amorphoides* en condiciones de campo

La disponibilidad de agua del suelo es considerada una de las principales causas en la disminución de la germinación de las semillas, durante este proceso se pueden presentar periodos de sequía disminuyendo el potencial hídrico del suelo, y por lo tanto, afectar el proceso de absorción de agua por la semilla e impidiendo que se lleve a cabo la germinación (Long *et al*, 2011).

En condiciones naturales el porcentaje de germinación en semillas de *A. amorphoides* fue de un 42%, menor respecto al porcentaje en condiciones de laboratorio (98%), dado que en las condiciones naturales no se pueden controlar la humedad y la temperatura, que son los principales factores que se han reportado influyen en el proceso de germinación de semillas de especies de Selva Baja Caducifolia (SBC)(Acosta y Rincón, comunicación personal).

McLaren y McDonald (2003) mencionan que semillas de *Metopium brownii*, *Hypelatetrefolia*, *Calyptanthes pallens* y *Eugenia sp*, especies de la SBC de Jamaica, registraron un 66% en su porcentaje de germinación total en condiciones de campo y observaron que las cuatro especies no son sensibles a la deficiencia de agua, ya que al tratar las semillas con cantidades diferentes de riego, su porcentaje de germinación no varió. Por el contrario, en semillas de *Ficus aurea*, una liana característica de la SBC de Bahamas, su germinación disminuyó hasta un 96% a potenciales hídricos menores de -1.0 MPa. Los autores concluyeron que las semillas de *F. aurea* son sensibles al estrés hídrico teniendo una respuesta similar a la de cultivos mesofíticos, los cuales se encuentran en un rango entre -1.2 y -1.5 MPa, abajo del cual la germinación y o el crecimiento de las plántulas se detiene (Swagel *et al*, 1997).

Nuestros resultados muestran que las semillas de *A. amorphoides* registraron en general un promedio de 42% en su porcentaje de germinación en el mes de Julio, mes en el que se registra la temporada de lluvias (Fig. 7). Este comportamiento en la germinación obtenidos en campo, concuerdan con los trabajos realizados en otras SBC (Garwood, 1983); es importante mencionar que no se observó dependencia o preferencia por el contenido de humedad relativa en el suelo, la profundidad del suelo o

la geofirma con el porcentaje de germinación en campo. Esto sugiere que las semillas de *A. amorphoides* pueden germinar bajo distintas condiciones de humedad, como se observa en la tabla 1 o que esa humedad está en el límite para disparar los eventos germinativos, por lo que algunas semillas alcanzan a germinar. Se encontró además que hay muy poco suelo, llegando a tener profundidades < de 5 cm, este hecho, aunado con la alta proporción de suelo rocoso, puede hacer que las condiciones de humedad en el suelo no sea el adecuado para permitir un mayor porcentaje de germinación de las semillas, dado que en condiciones de laboratorio se obtuvo un 98 % de germinación. Al respecto Evans y Etherinton (1990), mencionan que las semillas pueden presentar diferentes grados de tolerancia a la deshidratación dependiendo del hábitat natural en el que se encuentran, y sugieren que cada especie tiene un valor crítico de hidratación para que se lleve a cabo la germinación. Si bien el valor crítico de hidratación puede estar relacionado con el tipo de hábitat en el que se desarrolla la especie, también puede ser independiente de éste, como es el caso de especies que pertenecen a hábitats más secos y que sus semillas no necesariamente son tolerantes a potenciales hídricos negativos, presentando más bien “el síndrome de escape”. El síndrome de escape se entiende como el uso de ciclos de crecimiento muy rápidos o de madurez temprana, permitiendo al aprovechamiento rápido de la disponibilidad de agua y evitando así la pérdida o sequía (Basurto *et al*, 2008) y no de tolerancia a potenciales hídricos negativos.

***Alvaradoa amorphoides* presentó contenidos de reservas similares a las semillas oleaginosas.**

El 63% del peso de la semilla de *A. amorphoides* son lípidos, contenido similar al de semillas oleaginosas, como el algodón (71%), girasol (92.8%), linaza (66.5%) cacahuete (89.8), cártamo (75.2), olivo (17.9), ajonjolí (113.5) y soya (13.1) (McKevith, 2008). Se sabe que los ácidos grasos son más vulnerables a las reacciones con agentes oxidantes fuertes, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical aniónico superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), que son formas tóxicas que oxidan a los ácidos grasos y los convierten en hidroperóxidos (ROOH) (Pichardo González *et al*, 2010), dañando las semillas, en tres formas: peroxidación de los lípidos membranales, oxidación de lípidos de reserva y formación de aldehídos citotóxicos que pueden inactivar proteínas

(Bradford, 2004). Considerando que el contenido de reservas predominantes en semillas de *A. amorphoides* son lípidos, se esperaría que las semillas de esta especie fueran más susceptibles al desbalance oxidativo a potenciales hídricos negativos, sin embargo esto no se observó, ya que aún a potenciales hídricos negativos las semillas mantuvieron su viabilidad. Lo anterior puede indicar que el sistema antioxidante es muy efectivo y controla finamente los niveles de ROS normales aún en condiciones cambiantes del ambiente, incluyendo la restauración de los lípidos de membrana que se lleva a cabo en las primeras etapas de la germinación durante el proceso de imbibición.

### **Germinación en condiciones de laboratorio y diferentes potenciales hídricos**

Generalmente la mayoría de las semillas ortodoxas (con cubiertas seminales permeables), una vez iniciada la absorción de agua, presentan tres fases durante el proceso de germinación (Bradford, 1995). En este estudio se observó que la germinación de *A. amorphoides* disminuyó cuando la semilla fue embebida en potenciales hídricos negativos, esto mismo se ha reportado en semillas de *Ficus aurea* (Swagel *et al*, 1997), de sorgo (Lobato *et al*, 2008), de remolacha (Gummerson, 1986), en especies del género *Piper* (Daws *et al*, 2002) y en *Bulnesia retama* (Rodríguez-Rivera *et al*, 2007) en las cuales su germinación progresivamente disminuye, se retrasa o se inhibe completamente. En semillas de *A. amorphoides*, también se observó este comportamiento, en -0.5 MPa se da un retraso en el inicio de la germinación, a -1.0 MPa, también hay un retraso y además una disminución del 84% en el porcentaje de germinación con respecto al control, y a -1.5 MPa ya hubo una inhibición total de la germinación (Fig. 6A). El retraso en la germinación observado en los tratamientos de -0.5 y -1.0 MPa se presentó durante la fase II. Bradford (1995) reporta que la fase II es más sensible a factores como la disponibilidad de agua, lo que se ve reflejado en un aumento en el tiempo y la duración de esta fase.

La absorción de agua durante el proceso de imbibición en semillas de *A. amorphoides* también disminuyó en condiciones de potenciales hídricos negativos y la fase II de la germinación tuvo una duración mayor (24 h para -0.5MPa y 96h para -1.0 MPa) respecto al control. Se encontró que bajo condiciones óptimas de germinación, el patrón de la respiración en semillas de *A. amorphoides* presentó un comportamiento

trifásico, como se ha reportado en otros estudios (Dahal *et al*, 1996, Patané *et al*, 2006). Sin embargo, las semillas que germinaron a potenciales hídricos negativos mostraron solo dos fases, después de las 72 h de germinación no ocurrió un aumento de la respiración como en las semillas del control, este aumento podría corresponder al incremento celular y crecimiento de la radícula de las semillas.

El porcentaje de germinación fue afectado negativamente a -0.5 MPa, -1 MPa y -1.5 MPa, al retrasarlo, disminuirlo e inhibirlo respectivamente; las semillas que fueron expuestas a -1.0 y -1.5 MPa, germinaron a las 24 h, cuando fueron transferidas a agua, obteniéndose un  $95\pm 2$  % y un  $78\pm 3$  % en su porcentaje de germinación respectivamente, demostrando que no solo no perdieron su viabilidad sino que además rápidamente reanudan el proceso de germinación, lo que sugiere que existe algún mecanismo de protección que mantiene a las semillas en la fase II de la germinación e impide que las semillas pierdan su viabilidad.

### **ROS y sistema antioxidante de *A. amorphoides* durante su germinación**

En semillas ortodoxas, las cuales inician el proceso de germinación en un estado altamente deshidratado, se ha observado que durante la hidratación, la reactivación de la respiración y la movilización de las reservas causan un aumento en la producción de ROS (Cakmak *et al*, 1988; Tommasi 2001; Bailly 2004, Bailly *et al*, 2008; Kranner *et al*, 2010). Existen muchos estudios en especies como: *Glycine max*, *Rhapanus sativus cv. eterna*, *Solanum lycopersicum*, *Brassica oleraceae*, *Cassia angustifolia*, *Pisum sativum* y *Amaranthus lividus*, donde se ha observado un aumento en el contenido de  $H_2O_2$  en el inicio de la imbibición (Senaratna *et al*, 1985; Puntarulo *et al*, 1988; 1991, Gidrol *etal*, 1994; Schopfer *et al*, 2001; Wojtyla *et al*, 2001; Bellani, 2002; Morohashi, 2002; Bhattacharjee y Mukherjee, 2003; Agarwal y Pandey, 2004). Sin embargo, en nuestro estudio las semillas de *A. amorphoides* no presentaron diferencias significativas ni en el contenido de  $H_2O_2$  ni en el radical  $O_2^{\cdot}$  con respecto al tiempo de imbibición y los potenciales hídricos negativos probados.

Lo anterior podría sugerir que la actividad del sistema antioxidante es capaz de mantener en equilibrio los niveles de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot}$  en la semilla de *A. amorphoides* durante el proceso de germinación bajo y diferentes potenciales hídricos lo cual podría deberse

a un mecanismo para evitar que los altos contenidos de lípidos que presenta sean afectados ya que esto ocasionaría daño celular y/o bien la pérdida de carbono para los procesos energéticos que son necesarios durante el proceso de la germinación. La otra explicación es que la respuesta de las semillas de *A. amorphoides* sea una escasa producción de ROS durante la germinación y también durante situaciones de estrés por lo que la actividad de las enzimas antioxidantes no se ve afectada, para evaluarlo se midieron las actividades de algunas enzimas antioxidantes.

La actividad de la SOD en semillas de *A. amorphoides*, se registró desde el inicio de la germinación, y probablemente su actividad esté relacionada con la restauración de la actividad de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria (Logan et al., 2001), o con la actividad de la NADPH oxidasa (Liu et al, 2007), enzimas cuya actividad genera la producción de  $O_2^{\cdot}$ , sustrato de la SOD. Además, nuestros resultados son similares con otros estudios realizados con semillas ortodoxas en donde se ha reportado que la actividad de esta enzima está presente desde el inicio de la germinación y tiende a aumentar conforme avanza el proceso de germinación (Leprince et al, 1990; Gidrol et al., 1994; Ducic et al., 2003; Agarwal y Pandey 2004; Lei et al, 2005; Wojtyla et al, 2006 y Prodanovic, 2007). Aunque el aumento que se observó a las 48 h en la actividad de SOD, no presentó diferencia estadística entre los tratamientos, sin embargo éste aumento concuerda con el aumento en el radical  $O_2^{\cdot}$ , confirmando que las semillas de *A. amorphoides* aún expuestas a un potencial hídrico negativo, mantienen la respuesta de su sistema antioxidante como en las semillas control.

Por otro lado, el peróxido generado en la semilla, es utilizado por varias enzimas, como la CAT, los resultados sobre la actividad de la CAT en semillas de *A. amorphoides* mostraron que desde el tiempo 0 hay actividad, lo que sugiere que la actividad observada durante las primeras horas es la actividad basal que presentan las semillas, y por tanto, sería la enzima que se originó y funcionó durante la embriogénesis (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008). Posteriormente, conforme avanzó el proceso de germinación, se observó un aumento de la actividad de la CAT en las semillas a partir de las 48 y hasta las 96 h, lo que sugiere que hay una síntesis *de novo* de la CAT. Aumento que puede deberse al proceso de germinación y no a un estrés hídrico, ya que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control, resultado opuesto a lo que se esperaba.



El incremento en la actividad de la CAT una vez iniciado el proceso de germinación sugiere un carácter adaptativo, que posiblemente ayude a evitar el daño que el reinicio del metabolismo oxidativo en los tejidos podrían experimentar al incrementarse los niveles de  $H_2O_2$ , (Rashid y Mukerjii, 1991, Bor *et al*, 2003, Agarwal y Pandey, 2004).

Al igual que en el caso de las actividades de la CAT y SOD, no se observaron diferencias significativas en la actividad de GR entre las semillas control y las sometidas a los dos potenciales hídricos negativos (-0.5 y -1.0 MPa). Un aumento en la actividad de GR se observó a partir de las 48 h, y como en el caso de la CAT, el aumento en los tratamientos de -0.5 y -1.0 MPa es menor con respecto al control. Estos resultados sobre el aumento en la actividad de la GR ya han sido reportados por Tommasi *et al*, (2001) en semillas de *Pinus pinnea* germinadas a 22°C en agua. También se ha reportado que es hasta la fase II y/o fase III de la germinación cuando el ciclo del ASC-GSH se activa, probablemente debido a un aumento en la poza de NADPH debido a la activación de la vía de las pentosas, o por el aumento en la concentración de ascorbato (De Tullio y Arrigoni, 2003).

El hecho que el ciclo del ASC-GSH está activo hasta que el proceso de protusión de la radícula se inicia, también se confirma con la actividad de la APX. La actividad de la APX, en semillas de *A. amorphoides* se registró hasta las 48 h, que corresponde a la fase II de la germinación, tanto para el control como para las semillas germinadas a -0.5 MPa y -1 MPa. La ausencia de actividad de APX en tiempos tempranos de imbibición ya se ha reportado en semillas ortodoxas. En general, en semillas ortodoxas se ha observado que al final del proceso de maduración no hay actividad de la APX y tampoco tienen ASC (Cakmak, *et al*, 1993; Asada, 1997; De Gara *et al*, 1997, 2000, Tommasi *et al*, 2001, De Tullio y Arrigoni, 2003), por lo tanto el ciclo del ascorbato-glutación durante la fase I de germinación no es funcional aun cuando haya actividad de la GR desde el inicio del proceso de germinación. Tommasi *et al*, (2001) sugieren que la ausencia de la actividad de APX es una evidencia del carácter ortodoxo de una semilla, y que esta enzima no participa en la protección de la semilla en estado deshidratado. De Tullio y Arrigoni, (2003) sugieren que este comportamiento en la actividad de la APX, podría ser debido a que el último paso de la síntesis del ASC tiene lugar en la membrana interna de la mitocondria y usa el citocromo c de la cadena de transporte

como aceptor final, y en semillas ortodoxas las mitocondrias son estructural y funcionalmente distintas en el estado seco, al inicio de la germinación y después de la germinación donde las semillas se encuentran totalmente hidratadas (Logan *et al*, 2001). Por lo que la actividad mitocondrial a pesar de estar presente a tiempos tempranos de la germinación no es la misma que se encuentra en tiempos más avanzados del proceso de germinación (Macharel *et al*, 2007).

Con base en lo anterior, podría sugerirse que es hasta las fases II y III de la germinación cuando se sintetiza la APX y el ASC; se sabe que éste último participa en el ciclo celular y en la división de las células de la radícula (Pallanca y Smirnof, 1999). Adicionalmente, se conoce que hay varias formas de APX, citosólicas, peroxisomales, cloroplásticas y mitocondriales, y es probable que algunos de los plastidios se estén funcionalmente diferenciando y la actividad de la enzima APX comience a aparecer en las semillas de todos los tratamientos (Dabrowska *et al*, 2007).

Es importante señalar que la actividad de la APX en semillas de *A. amorphoides* es menor a potenciales hídricos negativos, observándose una respuesta estadísticamente significativa con respecto a las semillas testigo, este comportamiento puede ser resultado de una menor síntesis de la APX y de ASC, debido probablemente a que la velocidad de germinación se redujo.

El retardo en el inicio de la germinación y la reducción en el porcentaje de germinación en las semillas expuesta a potenciales hídricos negativos así como la nula influencia en la germinación del sitio de enterramiento (profundidad del suelo, geofoma y contenido de humedad) en donde se colocaron las semillas de *A. amorphoides*; sugieren que otro mecanismo diferente al sistema antioxidante es el que permite a las semillas de *A. amorphoides* hacer frente a la deficiencia de agua, alargando la fase II de la germinación, iniciar algunos procesos metabólicos; sin llegar a la germinación (manteniendo la viabilidad de la semilla), hasta que las condiciones hídricas sean adecuadas para pasar a la fase III y concluir con el proceso de germinación.

Este comportamiento pudiera ser relevante a nivel de comunidad vegetal dado que las semillas pueden mantenerse en éste estado, hasta que la disponibilidad de agua sea suficiente para que se lleve a cabo la protusión de la radícula y el posterior crecimiento de la plántula, siendo que este último estadio es más susceptible a la

deshidratación, y que en plántulas de la SBC se ha observado se presenta cuando el período de lluvia es menos variable (Bullock y Solis-Magallanes, 1990).

## VIII CONCLUSIONES

Las semillas de *A.amorphoides* expuestas a potenciales hídricos negativos durante el proceso de germinación, presentaron un retraso y/o inhibición en la germinación sugiriendo como estrategia un alargamiento en el tiempo de la fase II de la germinación, hasta que las condiciones hídricas sean favorables.

La producción de superóxido, peróxido de hidrógeno y la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GR no fueron afectadas por el potencial hídrico.

La actividad de la enzima antioxidante APX se detectó hasta la segunda fase de la germinación tanto en condiciones de hidratación normal como a potenciales hídricos negativos. Pero su actividad disminuyó significativamente a potenciales hídricos negativos (-0.5 y -1.0 MPa).

El comportamiento observado durante el proceso de germinación a potenciales hídricos negativos (en condiciones de laboratorio), podría explicar porque no se observó relación entre el tipo de geoforma y contenido de humedad con el porcentaje de germinación, registrado en campo.

## IX LITERATURA CITADA

Aebi H. (1984). Catalase. In *Methods in Enzymology* (ed. L. Packer) Vol. 105, pp. 121–126. Academic Press, Orlando, FL, USA.

Agarwal S. y Pandey V. (2004). Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Plantarum* 48: 555-560.

Amstrong R., Sohal R. H., Cutler R. G. y Slater T. F. (1984). Free radicals molecular biology, ageing and disease. Raven, New York.

Apel K. y Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology* 55: 373–399.

Asada K. (1997). The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging in plants. In JG Scandalios, ed, *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 715–735.

Bailly C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seeds biology. *Seed Science Research* 14: 93-107.

Bailly C., El-Maarouf-Bouteau H. y Corbineau F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies* 331: 806–814.

Bannister J.V., Bannister W.H. y Rotilio G. (1987). Aspect of structure, function and application of superoxide dismutase. *Critical Review in Biochemistry* 22: 111-180.

Baskin J. M. y Baskin C.C. (1998). Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. School of Biological Sciences. University of Kentucky. Academic Press. San Diego, CA USA.

Bhattacharjee S. (2012). The language of reactive oxygen species signaling in plants. *Journal of Botany* 2012; 1-22.

Bhattacharjee S. y Mukherjee A.K. (2003). Implications of reactive oxygen species in heat shock induced germination and early growth impairment in *Amaranthus lividus* L. *Biologia Plantarum* 47: 517-522.

Bellani L. M., Guarnieri M. y Scialabba A. (2002). Differences in the activity and distribution of peroxidases from three different portions of germinating *Brassica oleracea* seeds. *Physiologia Plantarum* 114: 102-108.

Berjak P. (2006). Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. *Seed Science Research* 16: 1-15.

Bewley J. D. y Black M. (1985). *Seeds Physiology of Development and Germination*. 2a edition. Plenum Press, Nueva York.

Bewley J. D. y Black M. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055-1066.

Blokhina O., Virolainen E. y Fagertedt K. V. (2003). Antioxidants, Oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany* 91: 179-194.

Blum A. (2010). Plant Breeding for Water-Limited Environments, Recuperado el 1 de agosto de 2013 de [http://books.google.com.mx/books?id=YZ2ZaemX-BQC&dq=A.+Blum,+Plant+Breeding+for+Water-Limited+Environments,+11+DOI+10.1007/978-1-4419-7491-4\\_2,+%C2%A9+Springer+Science%2BBusiness+Media,+LLC+2011&lr=&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.com.mx/books?id=YZ2ZaemX-BQC&dq=A.+Blum,+Plant+Breeding+for+Water-Limited+Environments,+11+DOI+10.1007/978-1-4419-7491-4_2,+%C2%A9+Springer+Science%2BBusiness+Media,+LLC+2011&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s),

Bor M., Ozdemir F. y Turkan I.E. (2003). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science*. 164: 77-84.

Botha, F. C., Potgieter, G. P. y Botha, A.-M. (1992). Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Journal Plant Growth Regulations* 11:211-224.

Bowler C. Van Montage M. y Inzé D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. Annual. Review Plant Physioly. *Plant Molecular Biology* 43: 83-116.

Bonfil C. y Trejo I. (2010). Plant propagation and the ecological restoration of Mexican Tropical deciduos forest. *Ecological Restoration* 28; 369-376.

Bradford M. R. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. of Biochemistry* 72: 248–254.

Bradford K. J. (1995). Water relations in seed germination. En: Seed Development and Germination, J. Kigel y G. Galili, eds (New York: Marcel Dekker), pp. 351-396.

Brown S.A. y Lugo E. (1990). Tropical secondary forests. *Journal of Tropical Ecology* 6: 1-32.

Buchanan B.B. y Balmer Y. (2005). Redox regulation: a broadening horizon. *Annual Review Plant Biology* 56: 187-220.

Buitink J. y Leprince O. (2004). Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. *Cryobiology* 48: 215–228.

Bullock S. y Solis Magallanes J. (1990) Phenology of canopy trees of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* 22: 22-35.

Cadenas E. (1988). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review Biochemistry* 51: 79-110.

Cakmak I. y Marschner H. (1988). Enhanced superoxide radical production in roots of zinc-deficient plants. *Journal of Experimental Botany* 39:1449-1460.

Ceccon E., Huante P., Rincón E. (2006). Abiotic factors influencing tropical dry forests regeneration. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49: 305-312.

Ceccon E. y Hernández P. (2009). Seed rain dynamics following disturbance exclusión in a secondary tropical dry forest in Morelos, Mexico. *Revista de Biología Tropical* 57: 257-269.

Drabroska G., Kata A., Goc A., Szechynska-Hebda M. y Skrzypek E. (2007). Characteristics of the Plant Ascorbate Peroxidase Family. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 49: 7–17.

Dahal P., Kim N-S. y Bradford K. J. (1996). Respiration and germination rates of tomato seeds at suboptimal temperatures and reduced water potentials. *Journal of Experimental Botany* 47: 941-947

Daniel W.W. (1984). Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa.

Dasgupta J., Bewley J.D. y Yeung E.C. (1982). Desiccation-tolerant and desiccation-intolerant stages during the development and germination of *Phaseolus vulgaris* seeds. *Journal of Experimental Botany* 33: 1045-57.

Dat J. Vandenabeele S., Vranová E., Van-Montagu M., Inzé, D. y Van-Breusegem F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 779–795.



Daws M. I., Burslem D.F.R.P, Crabtree L.M., Kirkman P., Mullins C.E. y Dalling J.W. (2002). Differences in seed germination responses may promote coexistence of four sympatric *Piper* species. *Functional Ecology* 16: 258–267.

Daws M., Crabtree L. M., Dalling J.W., Mullins C. E. y Burslem D. F. R. P. (2008). Germination responses to water potential in neotropical pioneers suggest large-seeded species take more risks. *Annals of Botany* 102: 945–951.

De Gara L., Locato V., Dipierro S. y de Pinto M. C. (2010). Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 173: 13-19.

De Gara L., de Pinto M. C. y Arrigoni O. (1997). Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum* 100: 894-900.

De Tullio M.C. y Arrigoni O. (2003). The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. *Seed Science Research* 13:249-60.

Ducic T, Liric-Rajlic I, Mitrovic A. y Radotic K. (2003). Activities of antioxidant systems during germination of *Chenopodium rubrum* seeds. *Biologia Plantarum* 47: 527-533.

El-Maarouf-Bouteau H. y Bailly C. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiol. *Crendus. Rendus Biologies* 331: 806–814.

Engelbrecht B. M. J., Dalling E.J.W., Pearson T. R. H., Wolf E. R. L. Gálvez D. A., Koehler E. T., Tyree E. M. T. y Kursar T. A. (2006). Short dry spells in the wet season increase mortality of tropical pioneer seedlings. *Oecologia* 148: 258–269

Evans C. E. y Etherington J. R. (1990). The effect of soil water potential on seed germination of some British plants. *New Phytologist* 115: 539-548.

Falleri E., Muller C., y Laroppe E. (2004). Effect of water stress on germination of beechnuts treated before and after storage. *Canadian Journal Forest Research* 34: 1204-1209

Fang W.C, Wang, J.W., Lin, C.C y KaoC. H. (2001). Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzymes activities in rice leaves. *Plant Growth Regulation* 35: 75-80.

Foster S. A. y Janson C. H. (1985). The relationship between seed size and establishment conditions in tropical woody plants. *Ecology* 66: 773–780

Foyer C. y Halliwell B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21–25.

Foyer C. H., Lopez-Delgado H., Dat J. F. y Scott I. M. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* 100: 241–254.

Galicia L. García F. y López-Blanco J. (1995). Efecto de la estructura jerárquica del relieve en la distribución de las características físicas de los suelos en una cuenca tropical estacional mexicana. Investigaciones geográficas, Boletín núm esp. 3 Instituto de Geografía UNAM, México 53-76.

Garwood N. (1983). Seed germination in a seasonal tropical forest in Panamá: a community study. *Ecological Monographs* 53: 159-181.

Gentry A.H. (1995). Diversity and floristic composition of neotropical dry forests. In: Gillespie1, T.W., A. Grijalva y C. N. Farris. 2000. Diversity, composition, and structure of tropical dry forests in Central America. *Plant Ecology* 147: 37–47.

Gidrol X., Lin W. S., Degousee N, Yip S.F. y Kush A. (1994). Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds. *Euro Journal Biochemistry* 224: 21-28.

Gomez-Valencia R. (2006). Efecto de las perturbaciones antropogénicas en la sucesión de la selva baja caducifolia de la zona de taludes de la región de Cuernavaca, Morelos. Reporte Técnico UNAM.

González-Zertuche, L., Orozco-Segovia A. y Vázquez-Yanes C. (2000). El ambiente de la semilla en el suelo: su efecto en la germinación y en la sobrevivencia de la plántula. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 65:73-81

González-Zertuche, L., C. Vázquez-Yanes, A. Gamboa, M. E. Sánchez-Coronado, P. Aguilera y Orozco-Segovia A. (2001). Natural priming of *Wigandia urens* seeds during burial: effects on germination, growth and protein expression. *Seed Science Research* 11: 27-34.

Guan L.M., Zhao J. y Scandalios J.G. (2000). Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant Journal* 22: 87-95

Gummerson R. J. (1986). The effect of constant temperatures and osmotic potentials on the germination of sugar beet. *Journal of Experimental Botany* 37: 729-741.

Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.

Haslekas C., Viken M. K., Grini P. E., Nygaard V., Nordgard S. H., Meza T. J. y Aalen R.B. (2003). Seed 1-Cysteine Peroxiredoxin antioxidant are not involved in dormancy, but contribute to inhibition of germination during stress. *Plant physiology* 133: 1148-1157.

Hegarty T. y Ross H. (1978). Some characteristic of the water-sensitive process in the inhibition of germination by stress for water. *Annals of Botany* 42: 1223-1226.

Hoekstra F. A., Golovina E. A. y Buitink J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 431-438.

Jana S. y Choudhuri M.A. (1981). Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperm during aging. *Aquatic Botany* 12: 345–354.

Janzen D.H. (1988). Tropical dry forests: the most endangered major ecosystem. In: Wilson, E.O. (Ed.). *Biodiversity* Washington, DC, National Academic Press. 130-137.

Jaramillo V. y Sandford R. L. (1995). Nutrient cycling in tropical deciduous forest. En Bullock, S. H., Mooney H.A. y Medina F. (Eds.). *Seasonality dry tropical forest*. Pp 346-361. Cambridge University press, UK.

Jiang M. y Zhang J. (2002). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* 53: 2401-2410.

Faria J. M. R., Buitink J., Van Lammeren A. A. M. y Hilhorst H. W. M (2005). Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. *Journal of Experimental Botany* 56: 2119-2130.

Khurana E. y Singh J. S. (2001). Ecology of seed and seedling growth for conservation and restoration of tropical dry forest: a review. *Environmental Conservation* 28: 39-52.

Kigel K. y Galili G. (1995). *Seed Development and Germination* Editors, New York: Marcel Dekker

Kranner I. y Grill D. (1993). Content of low-molecular-weight thiols during the imbibition of pea seeds. *Physiologia Plantarum* 88: 557-562.

Kranner I., Minibayeva F. V., Beckett R. P. y Seal C. E. (2010). What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist* 188: 655-673.

Krishnan P., Nagarajan S. y Moharir (2004). Thermodynamic Characterization of Seed Deterioration during Storage under Accelerated Ageing Conditions. *Biosystems Engineering* 89: 425-433.

Koornneef M., Bentsink L. y Hilhorst. (2002). Seed dormancy and germination. *Current Opinion Plant Biology* 5: 33-36.

Koppen W. (1948). Climatología. Los climas del mundo. Fondo de Cultura económica. México. 478 p.

Lei Y. B., Song S-Q. y Fu J-R. (2005). Possible Involvement of Anti-Oxidant Enzymes in the Cross-Tolerance of the Germination/Growth of Wheat Seeds to Salinity and Heat Stress. *Journal Integrative Plant Biology* 47: 1211-1219.

Leprince O., Deltour R., Chris Thorpe P., Atherton N. M. y Henfry G. A. F. (1990). The role of free radicals and radicals processing System in Loss desiccation Tolerance in Germinating Maize (*Zea mays* L.). *New phytologist* 116: 573-580.

Liso R. Innocenti A.M. Bitonti M.B. Arrigoni O. (1988). Ascorbic acid induced progression of quiescent centre cell from G1 to S phase. *New phytologist* 110: 469-471.

Lobato A. K. S., Oliveira Neto C. F., Costa R. C. L., Santos Filho B. G., Silva F.K.S., Cruz F.J.R., Abboud A.C.S. y Laughinghouse H.D. (2008). Germination of sorghum under the influences of water restriction and temperature. *Agricultural Journal* 3: 220-224.

Logan D. C., Millar A. H., Sweetlove L. J., Hill S. A. y Leaver C. J. (2001). Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiology* 125: 662-672.

Long R. L., Kranner I., Panneta F. D., Birtic S., Adkins S. W. y Steadman K. J. (2011). Wet-dry cycling extends seed persistence by re-instating antioxidant capacity. *Plant Soil* 338:511–519.

Lott, E. J. (1993). An noted checklist of the vascular flora of the Chamela bay region, Jalisco Mexico. California Academy Sciences, California.

Macherel D., Benamar A., Avelange-Macherel M. y Tolleter D. (2007). Function and stress tolerance of seed mitochondria. *Physiologia Plantarum* 129: 233-241.

May M J, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M y Inze D. (1998). Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* 49: 649-667.

McLaren K. P. y McDonald M. A. (2003). The effects of moisture and shade on seed germination and seedling survival in a tropical dry forest in Jamaica. *Forest Ecology and Management* 183: 61-75.

Mian A, y Nafziger E.D. (1994). Seed size and water potential effects on germination and seedling growth of winter wheat. *Crop Science* 34: 169-171.

Michel, B.E. y Ratcliffe, D. (1995). A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. *Agronomy Journal* 87:130–162

Miller, P.M. (1999). Effects of deforestation on seed bank in a Tropical Deciduous Forest of western Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 15:179-188.

Miranda, F. y Hernández, X. E. (1963). Los tipos de vegetación de México y su clasificación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 28: 29 – 179.

Misra H.P. y Fridovich I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal Biology Chemistry* 247: 3170- 3175.

Mittler R. y B. A. Zilinskas.(1994). Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant Journal* 5: 397–405.

Money, H. A., Bullock, S. H. y Medina, E. (1995). Introduction. Pages 1-8 in Bullock, S.H., Mooney, H.A and Medina, E., editors. Seasonally dry tropical forests. Cambridge University Press, New York.

Montaño G. E., La jornada, 26 de abril 2007.  
[www.jornada.unam.mx/2007/04/26/index.php?section=cultura&article=a05n1cul](http://www.jornada.unam.mx/2007/04/26/index.php?section=cultura&article=a05n1cul)

Moller I. M. Jensen P. E. y Hansson A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review Plant Biology* 58:459–481.

Morohashi Y. (2002). Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protusion. *Journal of Experimental Botany* 53: 1643-1650.

Mullen R. T. y Gifford D .J. (1995). Effect of embryo axis on catalase in the endosperm of germinating castor bean seeds. *Plant Science* 107: 177-187

Murphy P. G. y Lugo A. E. (1986). The ecology of tropical dry forest. *Annual Review Ecology and Systematics* 17: 67-88.

Nicolás G. y Aldasoro, J. J. (1979). Activity of the pentose phosphate pathway and changes in nicotinamide nucleotide content during germination of seeds of *Cicerarietinum* L. *Journal of Experimental Botany* 30:1163-1 170.

Niembro Rocas A. (1986). Árboles y arbustos útiles de México. Limusa. P: 32

Noctor G. y Foyer C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 49:249–279.

Nonogaki, H. (2008). Seed germination and reserve mobilization. *Encyclopedia of life Science*, pp. 1-9.

Nonogaki, H. Bassel, G. W. y Bewley J.D. (2010). Germination- Still a mystery. *Plant Science* 179: 574-581.

Pallanca J. E. y Smirnoff N. (1999). Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of *D*-glucosone, *L*-sorbosone, and *L*-galactono - 1,4 - lactone as ascorbate precursors. *Plant Physiology* 20: 453-462.

Pammenter N. W. y Berjak P. (1999). A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9: 13-38.

Parmar, M. T. R. P. (1966). Effect of simulated drought by polyethylene glycol solutions on corn (*Zea mays* L.) germination and seedling development. *Agronomic Journal* 58: 391-392.

Patanè C., Cavallaro V., Avola G. y D'Agosta G. (2006). Seed respiration of *Sorghum bicolor* (L) Moench during germination as affected by temperature and osmoconditioning. *Seed Science Research* 16:251-260.

Prodanović O., Prodanović R., Bogdanović J., Mitrović A., Milosavić N. y Radotić K. (2007). Antioxidative enzymes during germination of two lines of Serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně]. *Archives of Biological Science (Belgrade)* 59: 209-216.



Puntarulo S., Galleano M., Sanchez R.A. y Boveris A. (1991). Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects* 1074: 277-283.

Puntarulo S.A., Sanchez R. y Boveris A. (1988). Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiology* 86: 626-630.

Pryor W. A. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation life-times, and reactions. *Annual Review Physiology*, 48: 657-667.

Quadri de la Torre G. (2000). Incendios forestales y deforestación en México: una perspectiva analítica. Comisión de estudios del sector privado para el desarrollo sustentable (CESPEDES), México.

<http://www.cce.org.mx/cespedes/publicaciones/otras/deforestación/contenido.htm>

Rashid P. y Mukherji S. (1991). Changes in catalase and ascorbic oxidase activities in response to lead nitrate treatments in mung bean. *Journal Plant Physiology*, 34: 143-146.

Reisdorph N.A. y Koster K. (1999). Progressive loss of desiccation tolerance in germinating pea (*Pisum sativum*) seeds. *Plant Physiology* 105:266-271.

Rodriguez Rivera M.F., Sosa L.R., Fernández E.A., Reale M.I. y Villarreal V. (2007). Efecto del estrés hídrico a distintas temperaturas sobre la germinación de semillas de *Bulnesia retama* (Gill. ex. Hook.) Griseb. -Zigofiláceas - en San Luis, Argentina. *Phyton (B. Aires)* 76: 5-17.

Rzedowski J. (1978). Vegetación de México. Limusa, México. PAGINAS

Salon, C., Raymond, P. y Pradet, A. (1988). Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos. *Journal of Biology Chemistry* 263, 12278-12287.

Salazar A. y Soihet C. (2001). Manejo de semillas de 75 especies forestales de America Latina. Et. Centro agronómico Tropical de investigaciones y enseñanza. P: 65-66.

Sánchez-Linares, L., Gavilanes-Ruíz, M., Díaz-Pontones, D., Guzmán-Chávez, F., Calzada-Alejo, V., Zurita-Villegas, V., Luna-Loaiza, V., Moreno-Sánchez, R., Bernal-Lugo, I. y Sánchez-Nieto, S. (2012). Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *Journal of Experimental Botany* 63; 4513-4526.

Schopfer, P., Plachy, C. y Frahry, G. (2001). Release of Reactive Oxygen Intermediates (Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, and Hydroxyl Radicals) and Peroxidase in Germinating Radish Seeds Controlled by Light, Gibberellin, and Abscisic Acid. *Plant Physiology* 125: 1591-1602.

Schupp E. W., Milleron T. y Russo S. E. (2002). Dissemination limitation and origin and maintenance of species-rich tropical forest. En: D. J. Levey, W. R. Silva y M. Galetti (eds) *Seed dispersal and frugivory: Ecology, evolution and conservation*. CABI Publishing, New York, pp: 19-34.

Senaratna, T.D., Mckersie, B., Stinson, H.R. (1985). Antioxidant levels in germinating soybean seed axes in relation to free radical and dehydration tolerance. *Plant Physiology* 78: 168-171.

Sharma P. Bhushan Jha A. Shanker Dubey R. y Pessarakli M. (2012). Review Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 1012: 1-26

Serrato, A.J. y Cejudo, F.J. (2003). Type-H thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta* 217: 392-399.

Siebe C. Jahn R. Y Stahr K. (2006). Manual para la descripción de suelos en el campo. Instituto de Geología, UNAM, Universidad de Halle, Alemania, Universidad de Hohenheim, Alemania.

Simontacchi M., Sadovsky L. y Puntarulo S. (2003). Profile of antioxidant content upon developing bicolor seeds. *Plant Science* 164:709-715.

Smirnoff N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New phytologist* 125(1): 27-58.

Swagel E.N., Bernhard A. Van H. y Ellmore G. (1997). Substrate water potential constraints on germination of the strangler fig *Ficus aurea* (Moraceae). *American Journal of Botany* 84: 716-722.

T hill, D. C., R. D. Schirman y Appleby P.P. (1979). Osmotic stability of mannitol and polyethylene glycol 20000 solutions used as seed germination media. *Agronomic Journal* 71: 105-10

Thompson, K., y Mason G. (1977): Seed germination in response to diurnal fluctuations of temperature. *Nature* 267: 147-149

Tommasi F., Paciolla C., De Pinto M.C. y De Gara L. (2001). A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* seeds. *Journal of Experimental Botany* 52: 1647-1654.

Trejo I. (1999). El clima de la selva baja caducifolia en México. *Investigaciones Geográficas* 39: 40-52.

Trejo I. y Dirzo R. (2000). Deforestation of seasonally dry tropical forest: a nacional and local analisis in Mexico. *Biological Conservation* 94:133-42.

Willekens H., Van Camp W., Van Montagu M., Inze´ D., Sandermann H. Jr and Langebartels C. (1994). Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Plant Physiology* 106: 1007–1014

Wojtyla L., Garnczarska M., Zalewski T., Bednarski W., Ratajczak L. y Jurga S. (2001). A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. *Journal of plant physiology* 163: 1207-1220.

Wyatt-Smith J. (1987). Problems and prospects for natural management of tropical moist forest. En F. Mergen y J. R. Vincent (eds) *Natural management of tropical moist forest*. New Haven, Connecticut, Universidad de Yale.

# X APENDICE

---

## APENDICE 1

Tablas de ANOVAS de actividad de enzimas antioxidantes y superóxido en semillas de *A. amorphoides* germinadas a diferentes potenciales hídricos. Los valores en negros, indican diferencias estadísticamente significativas.

Tabla de ANOVA de una vía con dos factores (potencial hídrico y tiempo) en la actividad de la Enzima Ascobato peroxidada en semillas de <i>Alvaradoa amorphoides</i> durante el proceso de germinación					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Potencial	35.9322	2	17.9661	85.362	<b>0.000000</b>
tiempo	36.1318	2	18.0659	85.836	<b>0.000000</b>
Potencial*tiempo	2.2924	4	0.5731	2.723	<b>0.035955</b>
Error	15.1539	72	0.2105		

Prueba de tukey para la enzima Ascobato peroxidasa

Pot/Tiem	(0.0) 48	(0.0) 72	(0.0) 96	(0.5) 48	(0.5) 72	(0.5) 96	(1.0) 48	(1.0) 72	(1.0) 96
(0.0) 48		<b>0.007903</b>	<b>0.000136</b>	0.427700	0.896349	<b>0.010881</b>	<b>0.000144</b>	<b>0.012686</b>	0.999497
(0.0) 72	<b>0.007903</b>		<b>0.000137</b>	<b>0.000138</b>	<b>0.000182</b>	1.000000	<b>0.000136</b>	<b>0.000136</b>	<b>0.047890</b>
(0.0) 96	<b>0.000136</b>	<b>0.000137</b>		<b>0.000136</b>	<b>0.000136</b>	<b>0.000137</b>	<b>0.000136</b>	<b>0.000136</b>	<b>0.000136</b>
(0.5) 48	0.427700	<b>0.000138</b>	<b>0.000136</b>		0.996921	<b>0.000139</b>	<b>0.025028</b>	0.854105	0.133656
(0.5) 72	<b>0.896349</b>	<b>0.000182</b>	<b>0.000136</b>	0.996921		<b>0.000206</b>	<b>0.002145</b>	0.365547	0.541073
(0.5) 96	<b>0.010881</b>	1.000000	<b>0.000137</b>	<b>0.000139</b>	<b>0.000206</b>		<b>0.000136</b>	<b>0.000136</b>	0.062716
(1.0) 48	<b>0.000144</b>	<b>0.000136</b>	<b>0.000136</b>	<b>0.025028</b>	<b>0.002145</b>	<b>0.000136</b>		0.579941	<b>0.000137</b>
(1.0) 72	<b>0.012686</b>	<b>0.000136</b>	<b>0.000136</b>	0.854105	0.365547	<b>0.000136</b>	0.579941		<b>0.001783</b>
(1.0) 96	0.999497	<b>0.047890</b>	<b>0.000136</b>	0.133656	0.541073	0.062716	<b>0.000137</b>	<b>0.001783</b>	

Tabla de ANOVA de una vía con dos factores (potencial hídrico y tiempo) en la actividad de la Enzima Catalasa en semillas de <i>Alvaradoa amorphoides</i> durante el proceso de germinación					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Potencial	0.3592	2	0.1796	5.121	<b>0.006819</b>
Tiempo	13.4283	5	2.6857	76.573	<b>0.000000</b>
Potencial*Tiempo	0.9052	10	0.0905	2.581	<b>0.005932</b>
Error	6.6990	191	0.0351		

Prueba de tukey para la enzima Catalasa

Pot/Tiem	(0.0) 0	(0.0) 6	(0.0) 12	(0.0) 48	(0.0) 72	(0.0) 96	(0.5) 0	(0.5) 6	(0.5) 12	(0.5) 48	(0.5) 72	(0.5) 96	(1.0) 0	(1.0) 6	(1.0) 12	(1.0) 48	(1.0) 72	(1.0) 96
(0.0) 0		0.40	0.95	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	1.00	0.93	1.00	0.97	0.96	<b>0.00</b>	1.00	0.49	0.93	0.69	0.29	<b>0.00</b>
(0.0) 6	0.40		1.00	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.40	1.00	0.91	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.40	1.00	1.00	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
(0.0) 12	0.95	1.00		<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.95	1.00	1.00	0.05	0.06	<b>0.00</b>	0.95	1.00	1.00	<b>0.01</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
(0.0) 48	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>		0.51	<b>0.00</b>	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.98	0.94	0.49	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	1.00	1.00	0.05
(0.0) 72	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.51		0.14	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>	<b>0.00</b>	1.00	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.03</b>	0.14	1.00
(0.0) 96	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.14		<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.31	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.83
(0.5) 0	1.00	0.40	0.95	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>		0.93	1.00	0.97	0.96	<b>0.00</b>	1.00	0.49	0.93	0.69	0.29	<b>0.00</b>
(0.5) 6	0.93	1.00	1.00	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.93		1.00	<b>0.03</b>	<b>0.04</b>	<b>0.00</b>	0.93	1.00	1.00	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
(0.5) 12	1.00	0.91	1.00	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	1.00	1.00		0.59	0.56	<b>0.00</b>	1.00	0.96	1.00	0.16	<b>0.03</b>	<b>0.00</b>
(0.5) 48	0.97	<b>0.00</b>	0.05	0.98	<b>0.01</b>	<b>0.00</b>	0.97	<b>0.03</b>	0.59		1.00	<b>0.00</b>	0.97	<b>0.00</b>	<b>0.04</b>	1.00	1.00	<b>0.00</b>
(0.5) 72	0.96	<b>0.00</b>	0.06	0.94	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.96	<b>0.04</b>	0.56	1.00		<b>0.00</b>	0.96	<b>0.00</b>	0.05	1.00	1.00	<b>0.00</b>
(0.5) 96	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.49	1.00	0.31	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>		<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.02</b>	0.12	1.00
(1.0) 0	1.00	0.40	0.95	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	1.00	0.93	1.00	0.97	0.96	<b>0.00</b>		0.49	0.93	0.69	0.29	<b>0.00</b>
(1.0) 6	0.49	1.00	1.00	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.49	1.00	0.96	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.49		1.00	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
(1.0) 12	0.93	1.00	1.00	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.93	1.00	1.00	<b>0.04</b>	0.05	<b>0.00</b>	0.93	1.00		<b>0.01</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
(1.0) 48	0.69	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>	1.00	<b>0.03</b>	<b>0.00</b>	0.69	<b>0.00</b>	0.16	1.00	1.00	<b>0.02</b>	0.69	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>		1.00	<b>0.00</b>
(1.0) 72	0.29	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	1.00	0.14	<b>0.00</b>	0.29	<b>0.00</b>	<b>0.03</b>	1.00	1.00	0.12	0.29	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	1.00		<b>0.00</b>
(1.0) 96	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.05	1.00	0.83	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	1.00	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	

Tabla de ANOVA de una vía con dos factores (potencial hídrico y tiempo) en la actividad de la Enzima Glutation reductasa en semillas de <i>Alvaradoa amorphoides</i> durante el proceso de germinación					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	14.84765	1	14.84765	3155.505	<b>0.000000</b>
Potencial	0.03196	2	0.01598	3.396	<b>0.036212</b>
Tiempo	0.60094	5	0.12019	25.543	<b>0.000000</b>
Potencial*Tiempo	0.05414	10	0.00541	1.151	0.329137
Error	0.67757	144	0.00471		

Prueba de tukey para la enzima Glutación reductasa

Pot/Tiem	(0.0) 0	(0.0) 6	(0.0) 12	(0.0) 48	(0.0) 72	(0.0) 96	(0.5) 0	(0.5) 6	(0.5) 12	(0.5) 48	(0.5) 72	(0.5) 96	(1.0) 0	(1.0) 6	(1.0) 12	(1.0) 48	(1.0) 72	(1.0) 96
(0.0) 0		0.98	1.00	0.99	0.99	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	0.91	0.08
(0.0) 6	0.98		0.33	1.00	1.00	<b>0.00</b>	0.98	1.00	0.48	0.99	1.00	0.15	0.98	1.00	0.19	1.00	1.00	0.98
(0.0) 12	1.00	0.33		0.41	0.41	<b>0.00</b>	1.00	0.99	1.00	1.00	0.99	<b>0.00</b>	1.00	0.99	1.00	0.99	0.16	<b>0.00</b>
(0.0) 48	0.99	1.00	0.41		1.00	<b>0.00</b>	0.99	1.00	0.57	1.00	1.00	0.11	0.99	1.00	0.25	1.00	1.00	0.97
(0.0) 72	0.99	1.00	0.41	1.00		<b>0.00</b>	0.99	1.00	0.57	1.00	1.00	0.11	0.99	1.00	0.25	1.00	1.00	0.97
(0.0) 96	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>		<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.91	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.06
(0.5) 0	1.00	0.98	1.00	0.99	0.99	<b>0.00</b>		1.00	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	0.91	0.08
(0.5) 6	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00		1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	0.93	1.00	1.00	0.26
(0.5) 12	1.00	0.48	1.00	0.57	0.57	<b>0.00</b>	1.00	1.00		1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	0.27	<b>0.00</b>
(0.5) 48	1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00		1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	0.99	1.00	0.96	0.12
(0.5) 72	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00	1.00		<b>0.00</b>	1.00	1.00	0.94	1.00	1.00	0.31
(0.5) 96	<b>0.00</b>	0.15	<b>0.00</b>	0.11	0.11	0.91	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>		<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.31	1.00
(1.0) 0	1.00	0.98	1.00	0.99	0.99	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>		1.00	1.00	1.00	0.91	0.08
(1.0) 6	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00		0.96	1.00	1.00	0.35
(1.0) 12	1.00	0.19	1.00	0.25	0.25	<b>0.00</b>	1.00	0.93	1.00	0.99	0.94	<b>0.00</b>	1.00	0.96		0.96	0.08	<b>0.00</b>
(1.0) 48	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	0.96		1.00	0.38
(1.0) 72	0.91	1.00	0.16	1.00	1.00	<b>0.00</b>	0.91	1.00	0.27	0.96	1.00	0.31	0.91	1.00	0.08	1.00		1.00
(1.0) 96	0.08	0.98	<b>0.00</b>	<b>0.97</b>	0.97	0.06	0.08	0.26	<b>0.00</b>	0.12	0.31	1.00	0.08	0.35	<b>0.00</b>	0.38	1.00	

Tabla de ANOVA de una vía con dos factores (potencial hídrico y tiempo) en la actividad de la Enzima Superóxido dismutasa en semillas de <i>Alvaradoa amorphoides</i> durante el proceso de germinación					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	12024.37	1	12024.37	5024.199	<b>0.000000</b>
Potencial	31.88	2	15.94	6.661	<b>0.001552</b>
Tiempo	143.41	5	28.68	11.984	<b>0.000000</b>
Potencial*Tiempo	39.11	10	3.91	1.634	0.098241
Error	528.92	221	2.39		



Prueba de tukey para la enzima Superóxido dismutasa

Pot/Tiem	(0.0) 0	(0.0) 6	(0.0) 12	(0.0) 48	(0.0) 72	(0.0) 96	(0.5) 0	(0.5) 6	(0.5) 12	(0.5) 48	(0.5) 72	(0.5) 96	(1.0) 0	(1.0) 6	(1.0) 12	(1.0) 48	(1.0) 72	(1.0) 96
(0.0) 0		<b>0.00</b>	1.00	1.00	<b>0.00</b>	0.16	1.00	0.50	1.00	1.00	0.37	0.98	1.00	0.78	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00
(0.0) 6	<b>0.00</b>		0.21	0.09	1.00	0.99	<b>0.00</b>	1.00	<b>0.03</b>	<b>0.00</b>	0.94	0.37	<b>0.00</b>	0.95	0.11	<b>0.00</b>	1.00	0.09
(0.0) 12	1.00	0.21		1.00	0.15	0.99	1.00	1.00	1.00	0.85	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.69	0.28	1.00
(0.0) 48	1.00	0.09	1.00		0.06	0.93	1.00	0.98	1.00	0.97	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	0.89	0.12	1.00
(0.0) 72	<b>0.00</b>	1.00	0.15	0.06		0.96	<b>0.00</b>	0.99	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>	0.82	0.29	<b>0.00</b>	0.91	0.08	<b>0.00</b>	1.00	0.07
(0.0) 96	0.16	0.99	0.99	0.93	0.96		0.16	1.00	0.78	<b>0.04</b>	1.00	1.00	0.16	1.00	0.96	<b>0.01</b>	1.00	0.94
(0.5) 0	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	<b>0.00</b>	0.16		0.50	1.00	1.00	0.37	0.98	1.00	0.78	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00
(0.5) 6	0.50	1.00	1.00	0.98	0.99	1.00	0.50		0.92	0.13	1.00	1.00	0.50	1.00	0.99	0.07	1.00	0.99
(0.5) 12	1.00	0.03	1.00	1.00	<b>0.02</b>	0.78	1.00	0.92		1.00	0.95	1.00	1.00	0.99	1.00	0.98	0.05	1.00
(0.5) 48	1.00	<b>0.00</b>	0.85	0.97	<b>0.00</b>	<b>0.04</b>	1.00	0.13	1.00		0.12	0.68	1.00	0.32	0.95	1.00	<b>0.00</b>	0.96
(0.5) 72	0.37	0.94	1.00	0.99	0.82	1.00	0.37	1.00	0.95	0.12		1.00	0.37	1.00	1.00	<b>0.02</b>	0.97	0.99
(0.5) 96	0.98	0.37	1.00	1.00	0.29	1.00	0.98	1.00	1.00	0.68	1.00		0.98	1.00	1.00	0.48	0.47	1.00
(1.0) 0	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	0.00	0.16	1.00	0.50	1.00	1.00	0.37	0.98		0.78	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00
(1.0) 6	0.78	0.95	1.00	1.00	0.91	1.00	0.78	1.00	0.99	0.32	1.00	1.00	0.78		1.00	0.19	0.97	1.00
(1.0) 12	1.00	0.11	1.00	1.00	0.08	0.96	1.00	0.99	1.00	0.95	1.00	1.00	1.00	1.00		0.84	0.16	1.00
(1.0) 48	1.00	<b>0.00</b>	0.69	0.89	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>	1.00	0.07	0.98	1.00	<b>0.02</b>	0.48	1.00	0.19	0.84		<b>0.00</b>	0.88
(1.0) 72	<b>0.00</b>	1.00	0.28	0.12	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	0.05	<b>0.00</b>	0.97	0.47	<b>0.00</b>	0.97	0.16	<b>0.00</b>		0.14
(1.0) 96	1.00	0.09	1.00	1.00	0.07	0.94	1.00	0.99	1.00	0.96	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	0.88	0.14	

Tabla de ANOVA de una vía con dos factores (potencial hídrico y tiempo) en la concentración de superóxido en semillas de <i>Alvaradoa amorphoides</i> durante el proceso de germinación					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0.000000	1	0.000000	12442.14	<b>0.000000</b>
Potencial	0.000000	2	0.000000	0.02	0.976662
Tiempo	0.000000	5	0.000000	15.56	<b>0.000000</b>
Potencial*Tiempo	0.000000	10	0.000000	0.87	0.561425
Error	0.000000	221	0.000000		

Prueba de tukey para la concentración de Superóxido

Pot/Tiem	(0.0) 0	(0.0) 6	(0.0) 12	(0.0) 48	(0.0) 72	(0.0) 96	(0.5) 0	(0.5) 6	(0.5) 12	(0.5) 48	(0.5) 72	(0.5) 96	(1.0) 0	(1.0) 6	(1.0) 12	(1.0) 48	(1.0) 72	(1.0) 96
(0.0) 0		0.98	1.00	<b>0.02</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00
(0.0) 6	0.98		1.00	<b>0.00</b>	0.99	0.40	0.98	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	0.63	0.98	0.79	1.00	<b>0.00</b>	1.00	0.74
(0.0) 12	1.00	1.00		<b>0.00</b>	1.00	0.81	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	0.95	1.00	0.98	1.00	<b>0.00</b>	1.00	0.98
(0.0) 48	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>		<b>0.01</b>	0.38	<b>0.02</b>	<b>0.03</b>	<b>0.00</b>	0.69	<b>0.00</b>	0.20	<b>0.02</b>	0.35	<b>0.00</b>	0.93	<b>0.00</b>	0.14
(0.0) 72	1.00	0.99	1.00	<b>0.01</b>		1.00	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00
(0.0) 96	1.00	0.40	0.81	0.38	1.00		1.00	1.00	0.90	<b>0.00</b>	0.95	1.00	1.00	1.00	0.79	<b>0.00</b>	0.99	1.00
(0.5) 0	1.00	0.98	1.00	<b>0.02</b>	1.00	1.00		1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00
(0.5) 6	1.00	1.00	1.00	<b>0.03</b>	1.00	1.00	1.00		1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00
(0.5) 12	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	0.90	1.00	1.00		<b>0.00</b>	1.00	0.98	1.00	0.99	1.00	<b>0.00</b>	1.00	0.99
(0.5) 48	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.69	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>		<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	1.00	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
(0.5) 72	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	0.95	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>		1.00	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00
(0.5) 96	1.00	0.63	0.95	0.20	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	<b>0.00</b>	1.00		1.00	1.00	0.94	<b>0.00</b>	1.00	1.00
(1.0) 0	1.00	0.98	1.00	<b>0.02</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00		1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00
(1.0) 6	1.00	0.79	0.98	0.35	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00		0.97	<b>0.00</b>	1.00	1.00
(1.0) 12	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	0.79	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	0.94	1.00	0.97		<b>0.00</b>	1.00	0.97
(1.0) 48	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.93	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	1.00	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>		<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
(1.0) 72	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	<b>0.00</b>		1.00
(1.0) 96	1.00	0.74	0.98	0.14	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	<b>0.00</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	0.97	<b>0.00</b>	1.00	

## Apéndice II

*Alvaradoa amorphoides* germination at low water potential and the role of the  
antioxidant system

Germinación de *Alvaradoa amorphoides* a potenciales hídricos negativos y el papel del  
sistema antioxidante

Artículo aceptado en la revista *Botanical Sciences* 2014

***Alvaradoa amorphoides* germination at low water potential and the role of the antioxidant system**

**Germinación de *Alvaradoa amorphoides* a potenciales hídricos negativos y el papel del sistema antioxidante**

Verónica Hernández-Pérez<sup>1</sup>, Judith Márquez-Guzmán<sup>2</sup>, Sobeida Sánchez-Nieto<sup>3</sup> and Rocío Cruz-Ortega<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ecología, Departamento de Ecología Funcional, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias, Laboratorio de Desarrollo de Plantas, UNAM, Ciudad Universitaria, México

<sup>3</sup>Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, UNAM, Ciudad Universitaria, México

<sup>4</sup>Author for correspondence: Rocío Cruz-Ortega: [rcruz@ecologia.unam.mx](mailto:rcruz@ecologia.unam.mx)

Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., México

**Telephone number:** +52 (55) 5622-9032

**Fax number:** +52 (55) 5616-1976

**Running title:** *Alvaradoa amorphoides* germination and the antioxidant system

Germinación de *Alvaradoa amorphoides* y el sistema antioxidante

**Abstract:** Tropical dry forests are characterized by a high diversity of tree communities and extremely heterogeneous water availability. The tree *Alvaradoa amorphoides* is a pioneer species of the tropical dry forest found in Xochicalco, Morelos, Mexico. To determine the water requirements for this species to germinate, we evaluated the seed germination rates under field and laboratory conditions. In the field, the seeds had an overall mean germination rate of 42%, but the rate varied between the different sites independent of the soil relative humidity and landscape. *A. amorphoides* seeds exposed to a water potential of -0.5 MPa delayed germination, extending Phase II. At the -1.0 and -1.5 MPa water potentials, germination was inhibited by 80% and 100%, respectively, but the seeds remained viable. Although, the oxygen consumption did not differ between the treatments, the respiration profiles did not show the same triphasic curve as the control. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels were not significantly different in the seeds at the evaluated low-water potentials (-0.5 and -1.0 MPa), nor were the catalase, superoxide dismutase, and glutathione reductase activity. Only ascorbate peroxidase activity was inhibited at these two water potentials. Our data showed that the *A. amorphoides* seeds remained in phase II during low water potentials without high levels of ROS production and continued to be viable; this latter fact might explain the low influence of the humidity and landscape on the germination performance in the field.

**Key words:** *Alvaradoa amorphoides*, antioxidant system, germination, low water potential, Xochicalco.

**Resumen:** *Alvaradoa amorphoides* es un árbol representativo de la Selva Baja Caducifolia de la zona de Xochicalco en el Estado de Morelos, México. En éste trabajo se evaluaron los requerimientos hídricos para la germinación de ésta especie, tanto en campo como en laboratorio. En campo se evaluó la germinación en sitios con diferente geomorfología y características de humedad. En laboratorio se evaluó el porcentaje de germinación, imbibición, respiración y actividad de enzimas antioxidantes en semillas colocadas en soluciones de diferente potencial hídrico. El porcentaje de germinación en campo fue de 42%, pero fue diferente entre sitios independientemente de la humedad relativa y de la geomorfología del suelo. Las semillas expuestas a -0.5 MPa retrasaron su germinación, extendiendo la fase II de la germinación. Los potenciales de -1.0 y -1.5 MPa inhibieron la germinación 80 y 100% respectivamente, sin embargo, las semillas permanecieron viables. El consumo de oxígeno no varió en las semillas expuestas a los diferentes potenciales hídricos, aunque sí su perfil respiratorio, ya que no mostraron las tres fases características. Los niveles de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  y la actividad de Catalasa, Superóxido dismutasa y Glutación reductasa no fueron significativamente diferentes entre los potenciales hídricos probados (-0.5 y -1.0 MPa), sólo la actividad de la Ascorbato peroxidasa fue inhibida. Los resultados muestran que las semillas de *A. amorphoides* permanecen en fase II de la germinación en potenciales hídricos negativos, lo que podría explicar por qué el porcentaje de germinación, no se vio afectado por la geoforma y la humedad en condiciones de campo.

**Palabras clave:** *Alvaradoa amorphoides*, sistema antioxidante, germinación, potencial hídrico negativo, Xochicalco.

Tropical dry forests represent 42% of all tropical forests worldwide (Murphy and Lugo, 1986; Janzen, 1988). This ecosystem is one of the most threatened, and it is vulnerable due to increasing deforestation for agricultural and livestock activity, as well as human settlement (Trejo and Dirzo, 2000; Khurana and Singh, 2001). Tropical dry forests are characterized by a high diversity of tree communities and heterogeneous resource availabilities for water, nutrients, and light, among others. This ecosystem also shows a pronounced seasonality in rainfall, with two to six months of drought each year (Bullock and Solis-Magallanes, 1990; Khurana and Singh, 2001), and this seasonality affects the patterns of seed production, germination, survival, and seedling development. Water availability in these ecosystems affects the germination patterns (Garwood, 1983) and is considered one of the most important factors in modifying the structure and dynamics of this community (Murphy and Lugo, 1986). In a tropical dry forest, the soil water potential in the dry season can achieve up to -1.5 MPa (Engelbrecht *et al.*, 2006). The majority of species produces and disperse seeds in the dry season before reliable rains begin, which then allows them to germinate when the soil humidity is optimal (Baskin and Baskin, 1998; Ceccon *et al.*, 2006). Some species can germinate at low water potentials such as *Acacia senegal* (-1.4 MPa), *A. tortilis* (-1.0 MPa), *Leucaena leucocephala* (-1.6 MPa), *Cassia obtusifolia* (-0.5 MPa), and *C. occidentalis* (-0.5 MPa) (Khurana and Singh, 2001).

*Alvaradoa amorphoides*, a tree in the Picramniaceae family (formerly in Simaroubaceae), is well represented in the tropical forest area of Xochicalco in Morelos, Mexico. This tree not only contributes to the structure of the community, but it is also used as firewood by the local people (Ceccon and Hernández, 2009). The *A. amorphoides* seed has a membranous seminal coat that is permeable to water (Salazar and Soihet, 2001). This particular characteristic suggests the seeds might have tolerance mechanisms that allow them to germinate under water-stress conditions. Germination is one of the most vulnerable processes and can be inhibited or delayed by several

environmental factors, of which water stress is the most important. Seed germination begins with water uptake, and for this to occur, the soil humidity must be optimal (Hegarty and Ross, 1978; Bewley and Black, 1985). Metabolic processes such as mitochondrial respiration, which is associated with reactive oxygen species (ROS) production, are reactivated after imbibition (Bailly, 2004; Bailly *et al.*, 2008). A similar increase in ROS generation has been shown under different types of stress, especially drought and salinity stress, with the mitochondria as the primary organelle affected (Xiong *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2010). Under natural conditions, *A. amorhoides* seeds need to cope with variable water availability; thus, the seeds might tolerate water stress and germinate by adjusting the activity of their antioxidant system.

The objective of this study was to evaluate seed germination in *Alvaradoa amorhoides* under field and laboratory conditions to determine the species' water requirements. In the laboratory, we exposed seeds to low water potentials and examined their germination rate, water uptake, and respiration. We also examined antioxidant enzyme activity to determine whether the antioxidant system plays a role during the germination process.

## **Materials and methods**

*Field site, environmental characteristics, and seed collection.* The study was conducted in a tropical dry forest located in the Xochicalco archeological zone of the Miacatlan region in Morelos, Mexico (18° 48' 14" N and 99° 17' 46" W). We recorded the environmental conditions (temperature and humidity) at the field site in 2009 through the use of data loggers (Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) at four different locations. Additional data regarding annual precipitation was obtained from the nearest weather station at Zacatepec, Morelos (INIFAP-CEZCA) (Figure 1).



*Seed germination at the field site.* Eight individual *Alvaradoa amorphoides* trees were selected based on their distribution at the site to evaluate the seed germination rates in the field and make comparisons with the seed rain patterns for this species and zone as reported by Ceccon and Hernández (2009). The eight trees were located in different geomorphologies or landscapes such as foothills or depressions, hillsides, and hilltops, each of which is characterized by different soil humidity conditions or water potentials throughout the year (Table 1). The seeds were collected in April 2009 and sown in the field at the beginning of the rainy season (June) as follows: Fifty seeds were placed inside organza or silk fabric bags, and four bags were sown at a depth of 0.5 to 1 cm and 2 m apart to the north, east, south, and west of the center of the trunk, for a total of 200 seeds per tree (Figure 2). The seeds were left for one month, and then germination was recorded to determine the mean germination rate (%) per site. The mean length and width of 100 *A. amorphoides* seeds was also determined, with the image analysis program WinFOLIA (Regent Instruments Canada INC), which was  $0.53 \pm 0.0043$  cm and  $0.2135 \pm 0.002359$  respectively.

*Soil relative humidity.* Soil samples were collected with a 100 mL soil corer to determine the soil humidity at each of the different landscapes. Three samples were collected at 1, 1.5, and 2 m to the north, east, south, and west of the trunk of each of the eight *Alvaradoa amorphoides* trees and placed in a cooler for transport. The fresh weight was determined on arrival at the laboratory, after which the samples were dried in an oven at 105 °C for 24 h. The dry weight was determined, and the relative humidity (RH) was calculated as described by Siebe *et al.* (1996) with the formula  $RH (\%) = ((W1 - W2)/(W2)) \times 100$ , where W1 is the initial weight (mg) and W2 is the final or dry weight (mg). The data are reported as the soil RH (%).

*Seed germination in the laboratory at different water potentials.* Three negative water potentials were used to perform an *in vitro* evaluation of the effects of stress water potential on *Alvaradoa*

*amorphoides* seed germination: -0.5, -1.0, and -1.5 MPa. Polyethylene glycol (PEG 8000, Sigma) solutions were prepared based on the solute potential as calculated by the software SPMM (Michel and Ratclife, 1995) with the program for molar-molal-g-solute/g water conversion. Twenty seeds were placed in Petri dishes containing 5 mL of the water potential solutions or distilled water as a control. The experimental design was randomized with eight replicates per treatment. The Petri dishes were placed in a growth chamber (Conviron, G30, Canada), at 27 °C with a 12:12 h photoperiod. The data are presented as germination rates, with a seed defined as having germinated when the radicle length reached 1 to 2 mm.

*Water uptake by seeds at different water potentials.* To monitor the water uptake, the seeds were exposed to the water potentials as described above. Twenty-five seeds were placed in Petri dishes containing 5 mL of the PEG solutions. At 0, 6, 12, 48, 72, 96, and 170 h, independent seed samples were removed with four replicates per time point and treatment, and their fresh weight was estimated. The seeds were then immediately placed in an oven for drying at 105 °C for 24 h or until their weight was constant. The water uptake (the difference between fresh and dried weight) was calculated as described by Krishnan *et al.* (2004) with the formula  $((W1 - W2)/(W2)) \times 100$ , where W1 is the initial weight (mg) and W2 is the final or dried weight (mg). The data are reported as RH (%).

*Oxygen consumption during germination.* Oxygen consumption was evaluated 6, 12, 24, 48, and 96 h after the seeds imbibed the different water potential solutions. After placing 25 seeds in each Petri dish containing 5 mL of solution, they were placed in a growth chamber (Lab-Line Instruments, Inc., Illinois, USA) at 27 °C in the dark for the treatment period. For each time point, the oxygen uptake was monitored at room temperature with a Clark-type electrode connected to a biological oxygen monitor (YSI Oxygraph Model 5300; Yellow Spring Instruments, Ohio, USA) by transferring each 25-seed sample and 5-mL treatment solution to the

monitoring chamber and maintaining constant stirring. Three replicates were performed for each time point and treatment. The data are presented as  $\eta$ atoms of oxygen seed<sup>-1</sup> hour<sup>-1</sup>.

*ROS production and antioxidant enzyme activity during Alvaradoa amorphoides seed germination at different water potentials.* All spectrophotometric analyses were conducted with a Varian spectrophotometer (Varian Australia Pty Ltd., Mulgrave, Victoria, Australia).

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content.* The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was measured colorimetrically as described by Jana and Choudhuri (1981). After pulverizing the treated seeds in liquid nitrogen, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was extracted by homogenizing 50 mg of the ground seeds with 50 mM phosphate buffer (pH 6.5; 1:3 w/v). The homogenate was centrifuged at 6,000 × g for 10 min, and 1.0 mL of the supernatant was mixed with 1 mL of 0.1% titanium sulfate in 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (v/v). After centrifuging the mixture again at 6,000 × g for 10 min, the yellow intensity was measured at 410 nm. An extinction coefficient of 0.28 μmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> was used to calculate the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level, which is expressed as μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup>.

*Total protein extraction and antioxidant enzyme activity: catalase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase, and superoxide dismutase.* Total protein was extracted from the treated seeds at 0 (initial time), 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h under native conditions (Lara-Nuñez *et al.*, 2009) and homogenized in an extraction buffer (100 mg/mL) containing 50 mM potassium phosphate (pH 7.0) with 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 1% polyvinylpolypyrrolidone for catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR) activity or with 1 mM ascorbate for ascorbate peroxidase (APX) activity. The homogenate was centrifuged at 3,000 × g for 10 min at 4 °C to remove cellular debris, and the protein concentration was determined with a Bradford assay (Bradford, 1976).

CAT (EC 1.11.1.6) activity was determined by assessing the consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (extinction coefficient 39.4 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) at 240 nm for 3 min (Aebi, 1984) in a 1 mL reaction volume

containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and 50 µg of protein extract. The data are presented as the mean of three replicates each from three independent experiments with activity expressed as µmol min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>.

APX (EC 1.11.1.11) activity was determined by the decrease in absorbance over 1 min at 290 nM (extinction coefficient 2.8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) in 1 mL of a reaction medium containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.5 mM ascorbic acid (ASC), 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and 25 µg protein extract (Jiang and Zhang, 2002). A blank was included for the low, non-enzymatic oxidation of ASC by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The data are presented as the mean of three replicates each from three independent experiments with activity expressed as µmol min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>.

GR (EC 1.6.4.2) activity was determined by monitoring the oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) at 340 nm (extinction coefficient 6.2 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) for 3 min in a 1 mL reaction volume containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 2 mM EDTA, 0.5 mM glutathione disulfide, and 50 µg of protein extract. The reaction was initiated by adding NADPH to 0.15 mM and evaluated every 20 seconds for 5 min. A blank was included for the background absorbance at 340 nm without NADPH (Jiang and Zhang, 2002). The data are presented as the mean of three replicates each from three independent experiments with activity expressed as µmol min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>.

SOD (EC 1.15.1.1) activity was assayed by monitoring the autoxidation of epinephrine (adenochrome) as described by Misra and Fridovich (1972) using an extinction coefficient of 4,020 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Activity was measured in a 0.5 mL reaction volume containing 50 mM sodium carbonate buffer (pH 10.2), 0.5 mM EDTA, 50 µg extracted protein, and 0.5 mL of epinephrine (10 mg/mL dissolved in 10 mM HCl, pH 2.0). After the lag phase (2–3 min), the autoxidation of

epinephrine was determined at 480 nm every 10 s for 3 min. Activity is reported as adenochrome  $\text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ .

The superoxide levels ( $\text{O}_2^-$ ) are expressed as  $\mu\text{mol}$  per  $\text{mg}$  protein and were calculated by dividing the highest absorbance of the data previous to the lag phase by the extinction coefficient and the milligrams of protein.

*Statistical analysis.* All data were analyzed by two-factor analyses of variance, with water potential and time as the two factors. The data was first tested for normality and homoscedasticity and germination data were transformed to arcsine. The statistical analysis was performed with the STATISTICA software package v 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

## Results

*Seed germination in the field.* The mean seed germination at the eight field sites (#1 to #8) was 42%, which does not take into account the soil humidity or geomorphology of the site. Sites #2, #3, and #5 showed the highest seed germination rates (63, 61, and 60%, respectively) and had soil RH values of 46, 50, and 23%, respectively (Table 1). Sites #1, #4, and #6 had germination rates of 45, 32, and 35%, respectively, with soil RHs of 45, 46, and 28%. The lowest rate of seed germination was found at sites #7 (9%) and #8 (21%), which had soil RHs of 59 and 41%, respectively (Table 1).

*Oxygen consumption, water uptake, and germination rate.* Figure 3 shows the three phases of germination, water uptake, and respiration as described by Bewley and Black (1997). Phase I was from 0 to 12 h, which corresponded to a 30% increase in the water uptake. In this phase, the detection of oxygen consumption demonstrated that seed metabolism had restarted (Bradford, 1995; Bewley and Black, 1997; Nonogaki *et al.*, 2010). Phase II, known as the stationary phase,

was from 12 to 72 h of imbibition, in which no detectable increase in water uptake or oxygen consumption occurred. In this phase, germination *sensu stricto* is activated, beginning with radicle protrusion (Bradford, 1995; Nonogaki, *et al.*, 2010). Phase III, or post-germination, occurred after 72 h, when the germination rate no longer changed, and both respiration and water uptake increased due to the presence of radicles in the germinated seeds (Figure 3).

Seeds that were germinated at a water potential of -0.5 MPa showed a 24 h delay. However, by 96 h they had reached the same high rate of germination as the control seeds. A water potential of -1.0 MPa inhibited germination by 84%, and the seeds did not begin to germinate until 96 h. The lowest water potential of -1.5 MPa inhibited germination completely (Figure 4A). The seeds that imbibed the negative water potentials took up significantly less water (Figure 4B). This decrease in the rate of imbibition was observed from 12 h onward, and the same reduced rate of water uptake was maintained during the entire observation period (Figure 4B).

Respiration, or oxygen consumption, began after 6 h of imbibition for all treatments with no significant differences observed between them (Figure 4C). In fact, no differences were observed between the treatments for the oxygen consumption of the seeds during Phases I and II of germination. After 72 h (Phase III) of water uptake, the oxygen consumption began to increase only in the control seeds. Although the seeds germinated at the -0.5 MPa water potential (80–90%), no increase in respiration or water uptake was observed.

*ROS levels and antioxidant enzyme activity during germination.* Dry seeds displayed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> production as well as CAT, SOD, and GR enzyme activity (initial times are shown in Figure 5), but no APX activity was observed. At no time were there differences in the levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> when the seeds were germinated at negative water potentials (-0.5 and -1.0 MPa; Figure 5A, B). In addition, the water potential did not modify the CAT, SOD, or GR activities ( $P > 0.05$ ). However, at 72 h, the CAT activity of seeds at the -0.5 MPa water potential was significantly less

than that of the control seeds (0 MPa). The different dynamics of enzyme activity were related to the imbibition time, but were not caused by the treatments. APX activity was observed until 48 h, and both the -0.5 and -1.0 MPa water potentials resulted in a significant decrease in activity ( $P < 0.05$ ; Figure 5E).

## Discussion

*Germination under field conditions.* In this study, *Alvaradoa amorphoides* seeds showed an overall mean germination rate of 42%, but the germination rates varied between the eight sites independent of the soil RH and geomorphology (Table 1). At one site with a high soil RH (#7,) we recorded only a 9% germination rate. Conversely, another site that had a low RH (#5) showed higher germination rates (60%). These results suggest that *A. amorphoides* seeds may tolerate reduced soil humidity levels, which is in agreement with other studies of dry tropical forest species (e.g., Khurana and Singh, 2001). However, the heterogeneous soil conditions and the presence of rocks in the Xochicalco region (shallow soil, 5 cm) may play an important role in determining seed germination rates. According to Evans and Etherington (1990), plant species have different tolerance levels to dehydration depending on the soil water availability of their native habitat. These authors suggested that each species has a critical hydration level for successful germination.

*Germination, water uptake, and oxygen consumption at negative water potentials under laboratory conditions.* The *Alvaradoa amorphoides* seeds showed the same three-phase process of water uptake during imbibition that has been previously described for orthodox seeds with a permeable seed coat (Bradford, 1995). These three phases were evident in both the germination times and oxygen consumption (Figure 3). When the seeds were germinated under conditions of

negative water potential, germination was almost abolished at the -1.0 and -1.5 MPa water potentials, and it was delayed at the -0.5 MPa water potential. As Bradford (1995) described, Phase II (plateau phase) is considered the period of germination *sensu stricto*. The length of this phase is sensitive to environmental factors such as water availability that affect the timing and extent of germination. Although seed germination was diminished by 80% to nearly 100% at water potentials of -1.0 and -1.5 MPa, respectively, when these seeds were transferred to water (0 MPa), they were still viable and able to germinate ( $95 \pm 2\%$  and  $78 \pm 3\%$ , respectively; Hernández-Pérez observation). Seed germination delay or inhibition caused by negative water potentials has also been observed in sorghum (Lobato *et al.*, 2008), red beet (Gummerson, 1986), some species of the genus *Piper* (Daws *et al.*, 2002), *Bulnesia retama* (Rodríguez-Rivera *et al.*, 2007), and *Ficus aurea* (Swagel *et al.*, 1997).

Water uptake by the seeds was reduced at the three low water potentials tested (Figure 4B). The treated seeds imbibed as much as the control seeds up to 12 h, then stabilized, and most importantly, did not display the second water uptake increase that the control seeds showed at 48 h. However, the seeds treated at the -0.5 MPa water potential were able to reach 100% of the control seed germination rate after 96 h. The respiratory rate was also monitored during germination due to the importance of this process in maintaining energy metabolism in the seeds and as a major source of ROS (Moller, 2001; Bailly, 2004; Macharel *et al.*, 2007; Noctor *et al.*, 2007). In the control seeds, the respiratory rate encompassed three phases (Patanè *et al.*, 2006). At the negative water potentials, the respiration rate showed only two phases, the first respiratory burst followed by the plateau phase that extended to 170 h. The seeds treated at the -0.5 MPa water potential had a delay in germination, which confirmed that seed respiration or the metabolic energy supply was a limiting factor in the timing of germination, as reported previously by Dahal *et al.* (1996) for tomato seeds. This finding was also supported by the



observation that seeds exposed to the lowest water potentials (-1.0 and -1.5 MPa) were able to germinate when they were transferred to pure water. Dahal *et al.* (1996) suggested that the reduced respiration rate at low water potentials was a consequence of rather than the cause of the germination rate.

*ROS and antioxidant enzyme activity during germination.* It is known that in orthodox seeds, imbibition starts the reactivation of mitochondrial respiration and seed reserve mobilization, and these processes can generate an excess of ROS (Tommasi *et al.*, 2001; Bailly, 2004; Bailly *et al.*, 2008; Kranner *et al.*, 2010). However, our results showed that there were no significant differences over time in the levels of either H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, or O<sub>2</sub><sup>-</sup> between the seeds that imbibed at a low water potential and the control seeds. These results are in contrast to the findings of studies with crop seeds, which showed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased during Phase I of germination (Puntarulo *et al.*, 1988; Bellani *et al.*, 2002). One possible explanation for the lack of change in ROS production could be a tight control by their antioxidant system (Bailly *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2010).

Although the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels did not increase significantly, an increase in CAT activity was detected in the control seeds, which coincided with the second respiratory burst that was observed in these seeds (Bailly, 2004; Bailly *et al.*, 2008). With the exception of an increase over time in the control seeds, CAT activity was unaffected by the water potential.

It has been reported that orthodox seeds enter the resting stage with neither an ASC content nor ascorbate peroxidase activity, and the ascorbate-glutathione (ASH-GSH) cycle begins to be active during germination Phase II or III when the radicles protrude and germination is completed (De Tullio and Arrigoni, 2003). Our study confirmed this finding in *A. amorphoides*; the activity of ascorbate peroxidase began after 48 h of imbibition for all treatments. Interestingly, the seeds from the low water-potential treatments (-0.5 and -1.0 MPa; -1.5 MPa was not included since seeds germination showed 100% inhibition) had significantly less activity ( $P < 0.5$ ) than the

control seeds. Other authors have reported that orthodox seeds do not have APX activity (Cakmak *et al.*, 1993; Tommasi *et al.*, 2001, De Tullio and Arrigoni, 2003). Therefore, even though we observed GR activity, it seems that the ASC-GSH cycle was not functional during Phase I of germination. It is possible that the ASC content and APX activity are related to Phases II and III of germination when the radicles begin to protrude. It is known that ASC is required for the activity of dioxygenases, which are involved in the synthesis of plant hormones such as ethylene, gibberellic acid, and abscisic acid, among others, which are required for the cell cycle and cell division in radicles (Nambara and Marion-Poll, 2003). The low APX activity in the treated seeds might explain the lower germination rates of these seeds.

## **Conclusions.**

In summary, it is clear that when *Alvaradoa amorphoides* is exposed to a low water potential (-0.5 MPa), germination is delayed and extends to Phase II, which is also true for the seeds exposed to water potentials of -1.0 and -1.5 MPa. Even though the seeds did not germinate under these conditions, they were able to do so when they were transferred to plain water. This behavior may explain why there were no differences in the germination rates observed in the field related to the soil humidity or landscape. On the other hand, the low water potentials did not affect antioxidant enzyme activity, and intriguingly there was no oxidative burst when germination began, suggesting that *A. amorphoides* tightly regulates the ROS levels.

Based on our results, *Alvaradoa amorphoides* is a tolerant species that can endure water stress during seed germination by extending Phase II and tightly maintaining control of stress response mechanisms such as ROS production and antioxidant enzyme activity.

## Acknowledgments

This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM). V. Hernández-Pérez acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) and UNAM. We also acknowledge to the two anonymous reviewers for their valuable comments and suggestions.

## Literature cited

- Aebi H. 1984. Catalase. In: Paker L. Ed. *Methods in Enzymology*, Vol. 105, pp. 121–126, Academic Press, Orlando.
- Bailly C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seeds biology. *Seed Science Research* **14**:93-107.
- Bailly C., El-Maarouf-Bouteau H. and Corbineau F. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies* **331**:806–814.
- Baskin J.M. and Baskin C.C. 1998. *Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press. San Diego.
- Bellani L.M., Guarnieri M. and Scialabba A. 2002. Differences in the activity and distribution of peroxidases from three different portions of germinating *Brassica oleracea* seeds. *Physiologia Plantarum* **114**:102-108.
- Bewley J.D. and Black M. 1985. *Seeds Physiology of Development and Germination*. 2a edition. Plenum Press, New York.

- Bewley J.D. and Black, M. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* **9**:1055-1066.
- Bradford M.R. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* **72**:248-254.
- Bradford K.J. 1995. Water relations in seed germination. In: J. Kigel and G. Galili, Eds. *Seed Development and Germination*, pp. 351-396, Marcel Dekker, New York.
- Bullock S. and Solis-Magallanes J. 1990. Phenology of canopy trees of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* **22**:22-35.
- Cakmak I., Dragana S. and Marschner H. 1993. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of Experimental Botany* **44**:127-132.
- Ceccon E., Huante P. and Rincón E. 2006. Abiotic factors influencing tropical dry forests regeneration. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49**: 305-312.
- Ceccon E. and Hernández P. 2009. Seed rain dynamics following disturbance exclusion in a secondary tropical dry forest in Morelos, Mexico. *Revista de Biología Tropical* **57**:257-269.
- Dahal P., Kim N-S. and Bradford K.J. 1996. Respiration and germination rates of tomato seeds at suboptimal temperatures and reduced water potentials. *Journal of Experimental Botany* **47**:941-947.
- Daws M.I, Burslem D.F.R.P., Crabtree L.M., Kirkman P., Mullins C.E. and Dalling J.W. 2002. Differences in seed germination responses may promote coexistence of four sympatric *Piper* species. *Functional Ecology* **16**: 258-267.
- De Tullio M.C. and Arrigoni O. 2003. The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. *Seed Science Research* **13**:249-60.
- Engelbrecht B.M.J., Dalling E.J.W., Pearson T.R.H., Wolf E.R.L., Gálvez D.A., Koehler E.T., Tyree E.M.T. and Kursar T.A. 2006. Short dry spells in the wet season increase mortality of tropical pioneer seedlings. *Oecologia* **148**:258-269.

- Evans C.E. and Etherington J.R. 1990. The effect of soil water potential on seed germination of some British plants. *New Phytologist* **115**:539-548.
- Garwood N. 1983. Seed germination in a seasonal tropical forest in Panama: a community study. *Ecological Monographs* **53**:159-181.
- Gummerson R.J. 1986. The effect of constant temperatures and osmotic potentials on the germination of Sugar Beet. *Journal of Experimental Botany* **37**:729-741.
- Hegarty T., and Ross, H. 1978. Some characteristics of the water-sensitive process in the inhibition of germination by stress for water. *Annals of Botany* **42**:1223-1226.
- Jana S. and Choudhuri M.A. 1981. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. *Aquatic Botany* **12**:345-354.
- Janzen D.H. 1988. Tropical dry forests: the most endangered major ecosystem. In: Wilson, E.O. Ed. *Biodiversity*, pp.130-137, National Academic Press, Washington, D.C.
- Jiang M. and Zhang J. 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* **53**:2401-2410.
- Khurana E., and Singh J.S. 2001. Ecology of seed and seedling growth for conservation and restoration of tropical dry forest: a review. *Environmental Conservation* **28**:39-52.
- Kranner I., Minibayeva F.V., Beckett R.P. and Seal C.E. 2010. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist* **188**:655-673.
- Krishnan P., Nagarajan, S. and Moharir A.V. 2004. Thermodynamic characterization of seed deterioration during storage under accelerated ageing conditions. *Biosystems Engineering* **89**:425-433.

- Lara-Nuñez A., Romero-Romero T., Ventura J.L. Blancas V., Anaya A.L. and Cruz-Ortega R. 2006. Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Cell and Environment* **29**:2009-2016.
- Lobato A.K.S., Oliveira Neto C.F., Costa R.C.L., Santos Filho B.G., Silva F.K.S., Cruz F.J.R., Abboud A.C.S. and Laughinghouse H.D. 2008. Germination of sorghum under the influences of water restriction and temperature. *Agricultural Journal* **3**:220-224.
- Macherel D., Benamar A., Avelange-Macherel M. and Tolleter D. 2007. Function and stress tolerance of seed mitochondria. *Physiologia Plantarum* **129**:233-241.
- Michel B.E. and Ratcliffe D. 1995. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. *Agronomy Journal* **87**:130-162.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S. and Mittler R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment* **33**:453-467.
- Misra H.P. and Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal Biology Chemistry* **247**:3170-3175.
- Moller I.M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Biology* **52**:561-591.
- Murphy P.G. and Lugo A.E. 1986. The ecology of tropical dry forest. *Annual Review of Ecology and Systematics* **17**:67-88.
- Nambara E. and Marion-Poll A. 2003. ABA action and interaction in seeds. *Trends in Plant Science* **8**:213-217.
- Noctor G., De Paepe R. and Foyer C.H. 2007. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science* **12**:125-134.

- Nonogaki H., Bassel G.W. and Bewley J.D. 2010. Germination- Still a mystery. *Plant Science* **179**:574-581.
- Patanè C., Cavallaro V., Avola G. and D'Agosta G. 2006. Seed respiration of *Sorghum bicolor* (L) Moench during germination as affected by temperature and osmoconditioning. *Seed Science Research* **16**:251-260.
- Puntarulo S., Galleano M., Sanchez R.A. and Boveris A. 1991. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects* **1074**:277-283.
- Rodríguez-Rivera M.F., Sosa L.R., Fernández E.A., Reale M.I. and Villarreal V. 2007. Efecto del estrés hídrico a distintas temperaturas sobre la germinación de semillas de *Bulnesia retama* (Gill. ex. Hook.) Griseb. -Zigofiláceas - en San Luis, Argentina. *Phyton (BuenosAires)* **76**:5-17.
- Salazar R. and Soihet C. 2001. Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina Vol, II. *Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE)*, Costa Rica p. 65-66.
- Siebe C., Jahn R., Stahr K. 1996. Manual para la Descripción y Evaluación Ecológica de Suelos en el Campo: Chapingo, México, Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C., Publicación Especial, 4, 57 p.
- Swagel E.N., Bernhard A., Van H., and Ellmore G. 1997. Substrate water potential constraints on germination of the strangler fig *Ficus aurea* (Moraceae). *American Journal of Botany* **84**:716-722.
- Tommasi F., Paciolla C., De Pinto M.C. and De Gara L. 2001. A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* seeds. *Journal of Experimental Botany* **52**:1647-1654.

Trejo I. and Dirzo R. 2000. Deforestation of seasonally dry tropical forest: a national and local analysis in Mexico. *Biological Conservation* **94**:133-42.

Xiong L. and Zhu J-K. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment* **25**:131-139.



1 **Table 1.** Germination rates and soil relative humidity at the sites of eight individual *Alvaradoa amorphoides* trees and their  
2 corresponding landscape, slope, and the soil depth at which the seeds were sown. \*Mean of 12 replicates  $\pm$  standard error;  
3 \*\*germination was evaluated. Mean annual relative humidity was calculated from the five samples taken throughout the year.

# site	Land shape	Slope	Soil depth (cm)	Germination %	% of Soil Relative Humidity*					
					MAR	JUN	JUL**	SEP	JAN	ANNUAL
1	Side hill	12°	5.04	45	16 $\pm$ 2	52 $\pm$ 3	49 $\pm$ 4	83 $\pm$ 7	9 $\pm$ 1	45
2	Foot hill	2°	2.73	63	17 $\pm$ 1	40 $\pm$ 2	46 $\pm$ 4	69 $\pm$ 2	13 $\pm$ 4	46
3	Side hill	12°	2.17	61	16 $\pm$ 1.2	46 $\pm$ 2	50 $\pm$ 2	69 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	50
4	Top hill	4°	1.41	32	12 $\pm$ 1	36 $\pm$ 3	46 $\pm$ 2	63 $\pm$ 4	10 $\pm$ 1	46
5	Top hill	4°	1.41	60	16 $\pm$ 1	25 $\pm$ 1	23 $\pm$ 2	42 $\pm$ 3	4 $\pm$ 1	23
6	Side hill	11°	1.41	35	8 $\pm$ 1	31 $\pm$ 3	28 $\pm$ 4	54 $\pm$ 4	8 $\pm$ 1	28
7	Side hill	11°	1.41	9	5 $\pm$ 1	50 $\pm$ 5	59 $\pm$ 4	86 $\pm$ 5	14 $\pm$ 1	59
8	Side hill	17°	0.65	21	11 $\pm$ 1	42 $\pm$ 2	41 $\pm$ 1	63 $\pm$ 2	9 $\pm$ 4	41
	Total mean			42	13 $\pm$ 1	42 $\pm$ 6	43 $\pm$ 1	67 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	

## Figure Legends

**Figure 1.** Meteorological data collected during 2009 in the Xochicalco archeological zone in Morelos, Mexico. Asterisk shows the month of seed collection. Rainfall or annual precipitation was obtained from the Zacatepec meteorological station in Morelos (INIFAP-CEZACA) and represents the mean precipitation from 1952 to 2005.

**Figure 2.** Geomorphology or landscape of the site in the Xochicalco archeological zone in Morelos, Mexico. The eight *Alvaradoa amorphoides* trees (S1 to S8) are represented; seeds were sown north, south, east, and west from the center of each trunk.

**Figure 3.** *Alvaradoa amorphoides* germination phases (PI, PII, and PIII), water uptake, and respiration under controlled conditions.

**Figure 4.** *Alvaradoa amorphoides* seeds exposed to water potentials of 0, -0.5, -1.0, and -1.5 MPa. (A) Germination (%); (B) water uptake (%); and (C) rate of respiration ( $\eta$ atoms of oxygen seed<sup>-1</sup> hour<sup>-1</sup>). N = 8, low case different letters mean significant difference (Tukey test,  $P < 0.05$ ).

**Figure 5.** Reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant enzyme activity in *Alvaradoa amorphoides* seeds exposed to three negative water potentials. (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and (B) superoxide production; and (C) catalase (CAT), (D) superoxide dismutase (SOD), (E) ascorbate peroxidase (APX), and (F) glutathione reductase (GR) activity. Data are the mean of at least eight replicates, and bars represent the standard error. \*Denotes statistical differences (Tukey test,  $P < 0.05$ ) with respect to the control seeds (0 MPa) at the specific time.

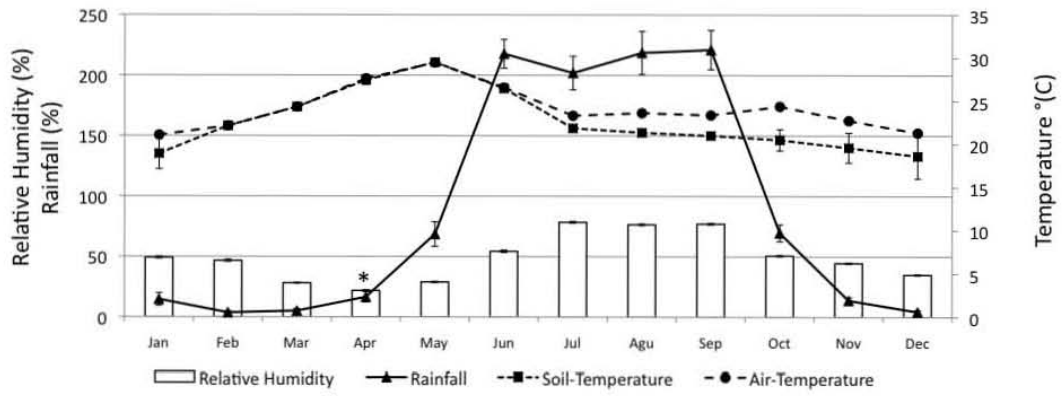


Figure 1.

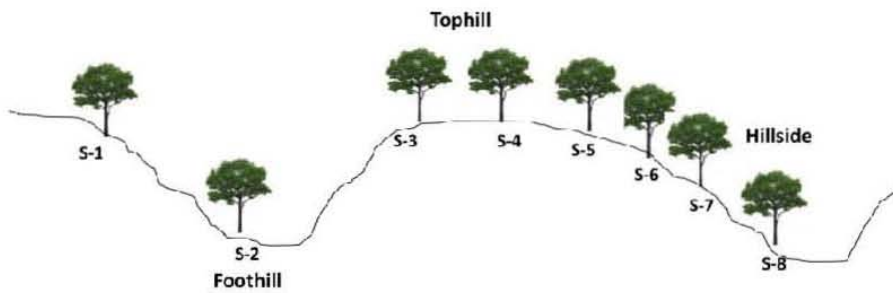


Figure 2.

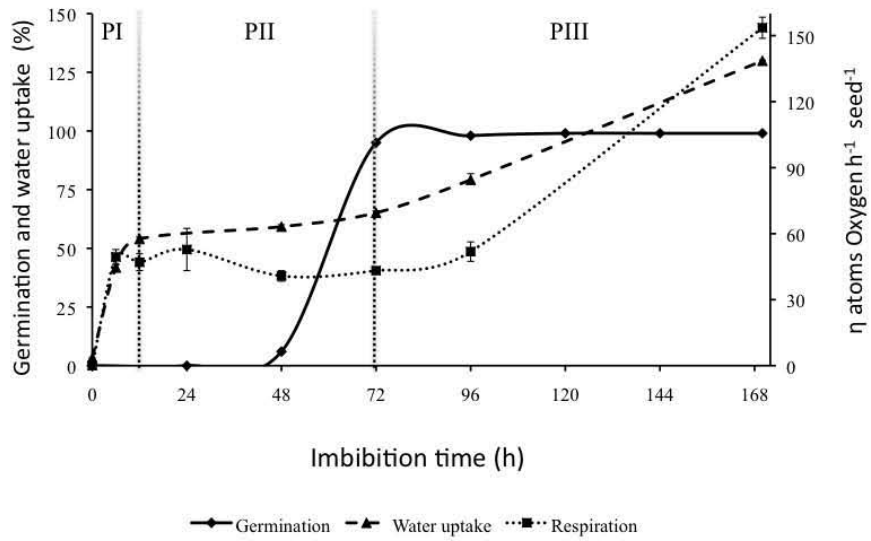


Figure 3.

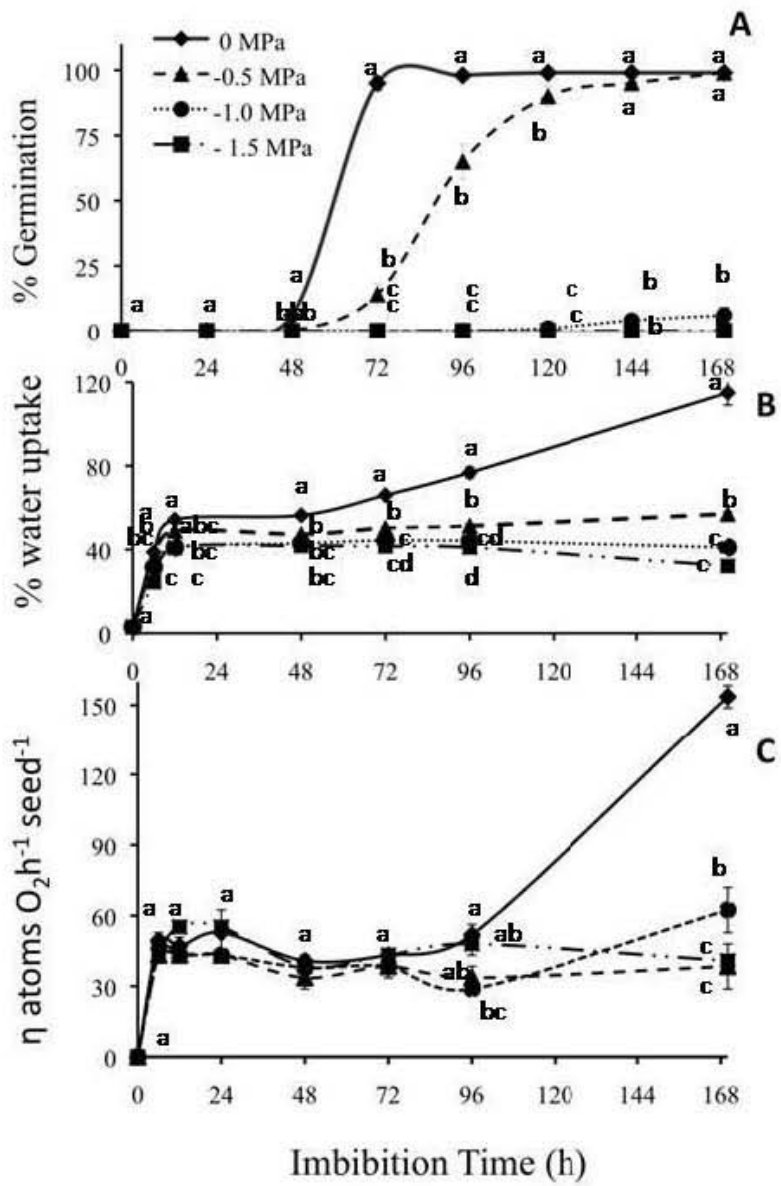


Figure 4.

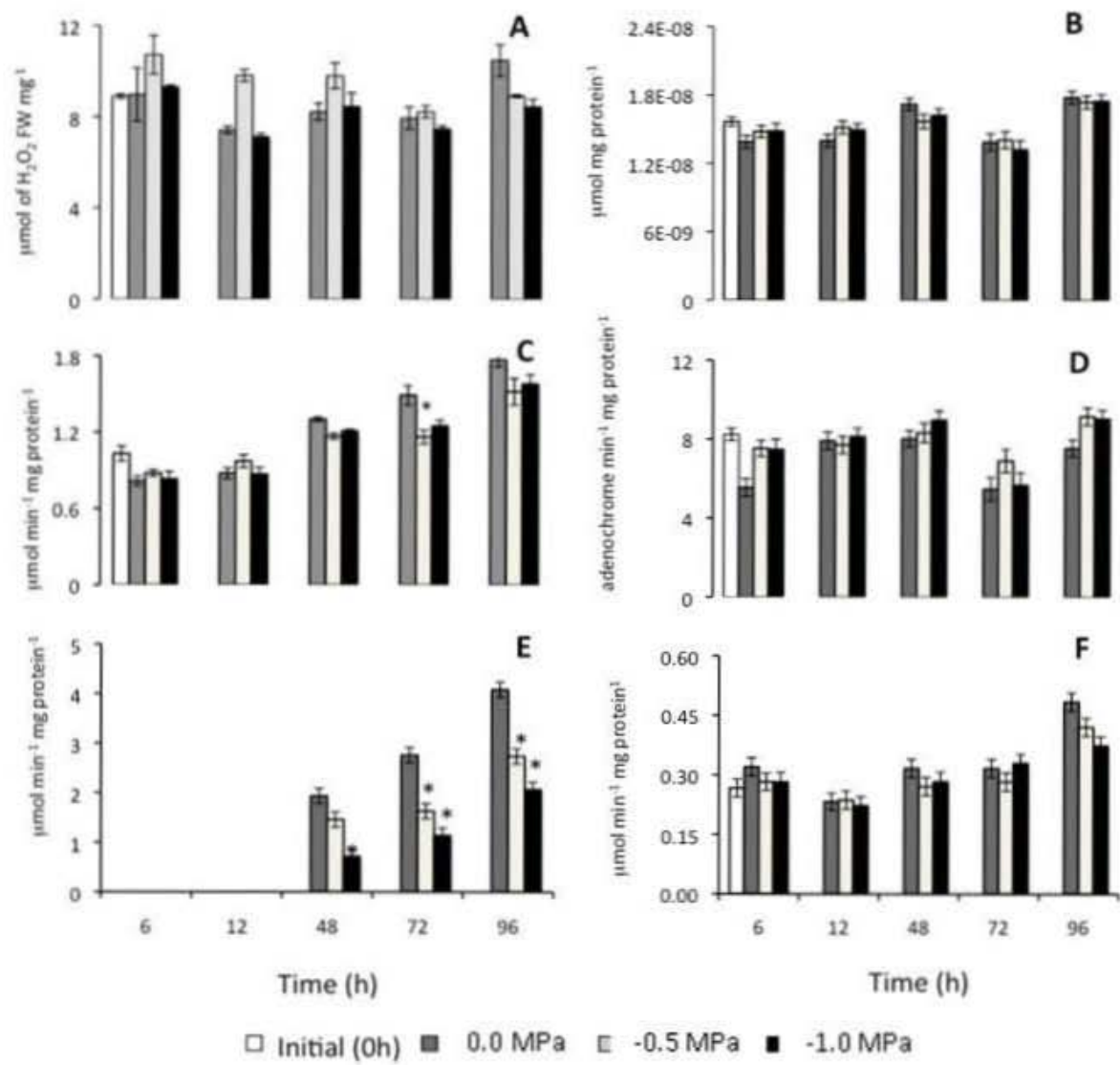


Figure 5.