



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
Biología Experimental

**EFFECTO DEL ACONDICIONAMIENTO MÁTRICO SOBRE VÍAS GENÉTICAS DE
SEMILLAS ALMACENADAS DE ESPECIES SILVESTRES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Ximena Gómez Maqueo Bribiesca

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 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
Biología Experimental

**EFFECTO DEL ACONDICIONAMIENTO MÁTRICO SOBRE VÍAS GENÉTICAS DE
SEMILLAS ALMACENADAS DE ESPECIES SILVESTRES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Ximena Gómez Maqueo Bribiesca

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2014

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

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 18 de agosto de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GÓMEZ MAQUEO BRIBIESCA XIMENA** con número de cuenta **302763364** con la tesis titulada **"EFECTO DEL ACONDICIONAMIENTO MÁTRICO SOBRE VÍAS GENÉTICAS DE SEMILLAS ALMACENADAS DE ESPECIES SILVESTRES"**, bajo la dirección de la **DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN:**

Presidente: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
Vocal: DR. ERICK DE LA BARRERA MONTPELLIER
Secretario: DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
Suplente: DR. JORGE NIETO SOTELO
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN MANDUJANO SÁNCHEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de octubre de 2014.



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 UNAM por haberme aceptado para realizar este proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca para la realización de este proyecto de maestría (CVU 480042).

Al Programa de Apoyos para Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM, por su aportación financiera para la asistencia al IV Congreso Mexicano de Ecología 2013 (Villa Hermosa, Tabasco) y al congreso Plant Gene Discovery and “Omics” Technologies 2014 (Viena, Austria).

Al proyecto PAPIIT con número IN200912-3 por el apoyo financiero otorgado para la culminación del trámite de titulación.

A mi tutora, la Dra. Alicia Gamboa de Buen por haberme aceptado como estudiante de maestría y por su asesoría durante la realización de este proyecto.

A los miembros del comité tutor el Dr. J. Eleazar Martínez Barajas y al Dr. César Mateo Flores Ortíz por asesorarme durante la realización de este proyecto, a través de sus comentarios, sugerencias y ayuda para la obtención de algunos de los resultados que presento en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Dr. Jorge Ramírez Salcedo, de la Unidad de Microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por el servicio de generación de los microarreglos heterólogos y por su asesoría para el análisis de los mismos.

A la M. en C. Laura Márquez del Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología, UNAM, por el servicio de secuenciación de los fragmentos de cDNA de *C. aesculifolia*.

Quiero agradecerles Ceci y Antoine por todo su amor y apoyo, son los mejores padres que una hija puede tener. Este es un logro más que hemos alcanzado juntos y que les dedico con todo mi amor. Me enorgullece ser parte de nuestra familia y que cada día somos mejores como individuos y los cuatro como un todo. Su mimijita los ama con todo el corazón.

Muchas gracias por todo Antonio, siempre estás ahí para mí, en los pequeños detalles, en las decisiones grandes, cuando se me excita lo neurás y necesito poner los pies en la tierra con urgencia... y sobre todo, en los mejores momentos de mi vida. Me encanta que seas MI BRO, te amo con todo mi corazón, siempre me haces sonreír y ver el mundo desde otra perspectiva que generalmente no es evidente para mí, pero que sí lo es para tí (*insert brofist here*).

Quiero agradecerte muchísimo, Alicia Gamboa, por toda la confianza que depositaste en mí persona. Hemos recorrido un largo camino, desde los primeros días en los que yo no tenía ni experiencia trabajando en un laboratorio de biología molecular, ni en el manejo y análisis de los miles de datos provenientes de un microarreglo. Todavía me falta mucho camino por recorrer, pero si he llegado hasta donde me encuentro ahora, es porque me has apoyado a cada paso que doy. La experiencia que tienes como académica y como docente es una verdadera fuente de inspiración para mí. Me emociona seguir trabajando y aprendiendo contigo y ver hasta donde somos capaces de llegar.

Quiero darte las gracias Marimar Garcíadiego (¡¡¡Ceiba Team!!!) por todo el trabajo que hicimos en equipo. Aprendimos juntas a manejar las semillas de Ceiba y gracias a eso logramos sacar adelante nuestros proyectos. Ahora nos toca seguir trabajando para contarle al mundo la historia de Ceiba ¡¡¡Ánimo Ceiba team!!!

Quiero darle un gran, gran, GRAN agradecimiento a todos mis compañeros del laboratorio de Ecología Fisiológica: Ángel Becerra, Alejandra Rosete, Sandra Alvarado, Esther Zúñiga, Martín Bonifacio, Alexis Salazar, Humberto Peraza, Elsa Quezada, Eric Cruz, Odette Avendaño, Alfredo González, Luis Pedrero, Alejandra López, Diana Soriano, Laura, Michelle Xicotencatl, Juan Sánchez, Jorge Martínez, Jorge Blanco, Alejandra Hernández, Manuel Esperón y Juan Pablo Ruiz. Gracias a ustedes aprendí a trabajar con los tratamientos de acondicionamiento y todos los secretos de la biología molecular. También

me dieron la bienvenida a su grupo, del cual me siento muy afortunada de formar parte. Yo en lo personal siento un vínculo muy especial con todos ustedes, que me ha permitido desarrollarme con seguridad en el laboratorio y que me ayudó muchísimo mientras aprendía a trabajar con las técnicas de biología molecular (y a superar la frustración cuando los experimentos no salían).

Quiero darle las gracias a la Dra. Alma Orozco por toda la asesoría y los consejos que me dio para realizar este trabajo. Si bien la Dra. Alma no pudo recibirme como estudiante de maestría, dado que ya tenía varios alumnos de nuevo ingreso al posgrado, sí me hizo el mejor regalo que pudo: haberme presentado con mi tutora y haber aceptado apoyarme en un trabajo convergente entre los intereses de investigación de las tres.

Mi agradecimiento también se extiende a mi familia: Emmy, Sergio, Lupi y Lore, quienes me abrieron las puertas de sus casas durante la licenciatura, dándome un espacio seguro donde realizar mis estudios y desarrollarme como persona. Ustedes siempre serán partícipes de todos mis logros como bióloga, porque no estaría terminando este proyecto de no ser por esa seguridad que me brindaron entonces, y que me siguen brindando ahora.

Quiero agradecerle también, Dr. Zenón Cano, por haberme ayudado a retomar mi camino hacia la investigación. Llegué a ti huyendo de mis inseguridades, esperando ser salvada. Pero tú no permitiste que me hundiera en mis miedos, en cambio me ayudaste a recordar a la Ximena decidida y dispuesta a trabajar por lo que quiere. Espero poder devolverte este enorme favor apoyándote a ti o a tus alumnos, yo como tu colega.

Finalmente quiero agradecer a mis sobrinitos Diego y Chío, mis dos grandes amores que llenan mis tardes de alegría y que logran que tareas tan rutinarias como lavar la ropa sean toda una experiencia. Cuando estoy con ustedes veo el mundo con otros ojos y lo redescubro, lo cual me ayuda a tener la mente abierta, a liberarme de prejuicios e ideas preconcebidas que solo bloquean el pensamiento (lo cual no es bueno para nadie ¡y en la labor científica menos!). Aunque ustedes están muy pequeños todavía para leer estas líneas, sé que llegará el día en que las leerán, pero para entonces ya sabrán lo importantes que son para mí los momentos que paso con ustedes.

A mis padres, Ceci y Antoine

A mi bro, Antonio

“Sólo en el crecimiento, la reforma y el cambio, paradójicamente, se encuentra la verdadera seguridad”

Anne Morrow Lindbergh

ÍNDICE

RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	7
2. ANTECEDENTES	8
2.1. GERMINACIÓN	8
2.1.1. Eventos tempranos de la germinación.	8
2.1.2. Germinación visible y desarrollo post-germinativo.	10
2.1.3. Transcriptomas y proteomas del proceso de germinación	11
2.1.4. El estado seco y longevidad de la semilla.....	13
2.2. ACONDICIONAMIENTO	13
2.2.1. Tipos de acondicionamiento.....	14
2.2.2. Procesos fisiológicos favorecidos por el acondicionamiento.....	15
2.2.3. Acondicionamiento de especies silvestres	16
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	17
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES	17
4. MÉTODO.....	17
4.1. Especies de estudio	17
4.2. Colecta y manipulación del material vegetal	18
4.3. Acondicionamiento mátrico	18
4.4. Prueba de germinación.....	19
4.5. Análisis de contenido de lípidos.....	20
4.6. Análisis estadístico	20
4.7. Análisis de la expresión génica	20
4.7.1. Extracción de RNA.....	20
4.7.2. Microarreglos heterólogos.....	20
4.7.3. Validación del microarreglo.....	21
4.7.4. Extracción de DNA genómico de <i>C. aesculifolia</i>	22
4.7.5. Síntesis de cDNA a partir de RNA de <i>C. aesculifolia</i>	22

4.7.6.	Diseño de oligos degenerados.....	22
4.7.7.	Amplificación de secuencias de DNA de <i>C. aesculifolia</i> por PCR.....	22
4.7.8.	Clonación en <i>E. coli</i>	23
4.7.9.	Análisis de secuencias clonadas	23
4.7.10.	Diseño de oligonucleótidos específicos de <i>C. aesculifolia</i>	23
4.7.11.	Nivel de expresión génica por PCR.....	23
5.	RESULTADOS	24
5.1.	Evaluación de la respuesta germinativa de semillas de las tres especies.....	24
5.1.1.	Germinación de semillas de <i>C. aesculifolia</i>	24
5.1.2.	Evaluación de la respuesta fisiológica de las semillas de <i>Gossypium hirsutum</i> :	31
5.1.3.	Evaluación de la respuesta fisiológica de las semillas de <i>Buddleja cordata</i> :.....	33
5.2.	Expresión de vías genéticas en semillas de <i>C. aesculifolia</i>	35
5.3.	Aislamiento y clonación de genes de <i>C. aesculifolia</i>	47
6.	DISCUSIÓN.....	52
7.	CONCLUSIONES	58
8.	BIBLIOGRAFÍA	59
9.	ANEXOS.....	64

Índice de figuras y cuadros

Figura 1.	Fases de la germinación	11
Figura 2.	Procesos celulares fomentados por el acondicionamiento	15
Figura 3.	Diseño experimental del análisis de microarreglos	21
Figura 4.	Germinación de semillas de <i>C. aesculifolia</i> con respuesta positiva al acondicionamiento	25
Figura 5.	Movilización de lípidos de reserva en semillas de <i>C. aesculifolia</i> con respuesta positiva al acondicionamiento	26
Figura 6.	Germinación de semillas de <i>C. aesculifolia</i> sin respuesta al acondicionamiento	27
Figura 7.	Movilización de lípidos de reserva en semillas de <i>C. aesculifolia</i> sin respuesta al acondicionamiento	28
Figura 8.	Comparación de la respuesta germinativa de semillas de <i>C. aesculifolia</i> con diferente tiempo en almacenamiento.....	29
Figura 9.	Perfil de ácidos grasos en semillas de <i>C. aesculifolia</i>	31
Figura 10.	Germinación de las semillas de <i>G. hirsutum</i>	32
Figura 11.	Germinación de las semillas de <i>B. cordata</i>	34

Figura 12. Mapa de calor del cambio en la expresión génica en respuesta al acondicionamiento mátrico	41
Figura 13. Vías del metabolismo primario en semillas de <i>C. aesculifolia</i> con respuesta positiva al acondicionamiento	42
Figura 14. Vías del metabolismo primario en semillas de <i>C. aesculifolia</i> sin respuesta al acondicionamiento.....	43
Figura 15. Agrupamiento de las secuencias obtenidas de genes de <i>C. aesculifolia</i>	50
Figura 16. Validación de los microarreglos	51
Cuadro 1. Comparación de la respuesta germinativa de semillas de <i>C. aesculifolia</i> con diferente tiempo en almacenamiento.....	29
Cuadro 2. Perfil de lípidos de las semillas de <i>C. aesculifolia</i>	30
Cuadro 3. Germinación de las semillas de <i>G. hirsutum</i>	33
Cuadro 4. Germinación de las semillas de <i>B. cordata</i>	34
Cuadro 5. Grupos funcionales de genes cuyos transcritos cambiaron su expresión en respuesta al acondicionamiento en semillas de <i>C. aesculifolia</i>	38

RESUMEN

El acondicionamiento es un tratamiento pre-germinativo que se ha utilizado para mejorar la respuesta germinativa y el establecimiento de las plántulas de diversas especies de interés económico o con potencial para la restauración. El acondicionamiento consiste en la hidratación controlada de la semilla, seguida de un proceso de deshidratación, lo cual anticipa los procesos tempranos de la germinación, previo a la protrusión de la radícula. *Ceiba aesculifolia*, *Gossypium hirsutum* y *Buddleja cordata* son especies pioneras, nativas de México y con abundantes semillas de fácil manipulación, que las vuelve candidatas para determinar el efecto del acondicionamiento a los niveles fisiológico, genético y molecular. En este estudio se evaluó la respuesta fisiológica de semillas de las tres especies y con distintos tiempos en almacenamiento, con base en la respuesta germinativa (inicio, tasa máxima, tiempo promedio y porcentaje final de germinación) y el cambio en la expresión génica. En semillas de *C. aesculifolia* el acondicionamiento mátrico mejoró el porcentaje final de germinación de semillas almacenadas durante tres años, el cual fue equiparable al porcentaje de germinación que presentaron cuando fueron colectadas. El tratamiento también promovió la movilización temprana de lípidos de reserva. Sin embargo, a los tres años nueve meses en almacenamiento las semillas perdieron la capacidad de responder al acondicionamiento y no se movilizaron los lípidos de reserva. Las semillas de *G. hirsutum* y de *B. cordata* no respondieron al acondicionamiento mátrico. Tanto en *G. hirsutum* como en *B. cordata* se requeriría de un análisis de otros factores no emulados durante este estudio que pudieran estar influyendo en la germinación de las semillas y por tanto en la respuesta positiva al tratamiento. El análisis de la expresión génica en semillas de *C. aesculifolia* por microarreglos heterólogos, utilizando como referencia el genoma completo de *Arabidopsis thaliana*, mostró que en semillas con y sin respuesta al acondicionamiento mátrico disminuyeron grupos funcionales de genes relacionados con la maduración de la semilla, y la expresión de genes ribosomales aumentó, con respecto a las semillas sin acondicionamiento. Esto concuerda con procesos tempranos de la germinación inducidos por la imbibición de la semilla, indicando que las semillas con y sin respuesta al tratamiento percibieron el estímulo hídrico y se inició el proceso de germinación. Sin embargo, al analizar otras vías genéticas, mostraron una respuesta contrastante. Las semillas que respondieron de manera positiva al acondicionamiento muestran un adelanto de procesos metabólicos enfocados hacia la producción de energía, principalmente por la vía aeróbica de degradación de lípidos, así como en planes de desarrollo post-germinativos que podrían favorecer el establecimiento de las nuevas plántulas. En cambio, las semillas sin respuesta al acondicionamiento presentaron principalmente un aumento en la expresión de la vía de fermentación y se redujo notablemente la expresión de genes relacionados con el metabolismo aeróbico y la expresión de genes de respuesta a estrés aumentó considerablemente. Dado que la respuesta de las semillas de *C. aesculifolia* fue contrastante a pesar de que se sometieron al mismo estímulo, se podría inferir que las vías de

señalización relacionadas con la imbibición y la movilización de lípidos fueron afectadas por el deterioro durante el almacenamiento. La percepción adecuada del estímulo hídrico que lleve hacia la movilización temprana de lípidos podría ser el punto de regulación más relevante para la respuesta positiva al acondicionamiento.

Palabras clave: germinación, acondicionamiento, microarreglos heterólogos, vigor, *Ceiba aesculifolia*, *Gossypium hirsutum*, *Buddleja cordata*.

ABSTRACT

Seed priming is a technique widely used for germination improvement of a variety of species of economical importance, or those that could be suitable for restoration programs. This technique involves seed imbibition, followed by desiccation to prevent radicle emergence. *Ceiba aesculifolia*, *Gossypium hirsutum* and *Buddleja cordata* are wild species from Mexico's tropical deciduous forests. These species produce abundant seeds that are easy to handle, and so are well suited for ecophysiological studies with a genetic and molecular approach. The aim of this study was to determine the physiological response to matric priming at the germination and gene expression level, of stored seed lots from the three species. *C. aesculifolia* seeds stored for three years improved their final germination percentage, which was comparable to the germination percentage registered when recently collected. Lipid mobilization was also induced by the treatment. However, after three years and nine months of storage, the seeds lost the capacity to respond to the treatment and no lipid mobilization was detected. The seed lots of *G. hirsutum* and *B. cordata* did not respond to matric priming. On these two species, further studies are needed to ascertain their germination requirements, which could have altered the response to matric priming. Heterologous DNA-based microarray gene expression analysis on *C. aesculifolia* seeds, with and without a positive response to priming, showed a down-regulation of gene groups involved in seed maturation and an up-regulation of transcription-related genes, especially of ribosomal genes, in comparison to untreated seeds. These processes correspond to some of the early-germination processes triggered by imbibition, and suggest that in both seed lots the water stimuli was perceived and germination was initiated. However, on other genetic pathways the seeds with and without response to priming showed contrasting gene expression profiles. Seeds with a positive response to the treatment showed an up-regulation of aerobic energy production pathways, especially through lipid catabolism. Post-germination programs were up-regulated as well, which could render an advantage on seedling establishment. On the opposite, seeds that did not respond to priming showed a down-regulation of aerobic metabolism, and an up-regulation of fermentation and stress-related genes. These contrasting responses, even though both seed lots were subjected to

the same treatment, could suggest a disarray of the signaling pathways related to the imbibition stimuli.

Key words: germination, priming, vigor, heterologous microarrays, *Ceiba aesculifolia*, *Gossypium hirsutum*, *Buddleja cordata*.

1. INTRODUCCIÓN

La semilla es considerada una etapa crucial en el ciclo de vida de las especies vegetales que las producen, así como en el proceso de establecimiento y regeneración de las comunidades vegetales a las cuales pertenecen (Landa *et al.*, 1997). Las semillas proveen de continuidad entre las generaciones de plantas y distribuyen el establecimiento de nuevos individuos en el tiempo y el espacio (Moreira de Carvahlo y Nakagawa, 1988; Fenner y Thompson, 2005), por lo que se han convertido en una herramienta fundamental para facilitar la producción de especies de interés agrícola, medicinal, textil, entre otros usos (Vázquez-Yañes y Batis, 1996).

En las últimas décadas se ha enfatizado la necesidad de restaurar los ecosistemas dañados a causa de actividades humanas (Landa *et al.*, 1997), utilizando las especies nativas de la zona a restaurar. Estas especies son silvestres en su mayoría y se desconocen las condiciones óptimas de germinación y del almacenamiento de sus semillas por períodos prolongados. La determinación de estas condiciones permitirá retrasar lo más posible la pérdida de vigor y viabilidad de las mismas.

El conocer las condiciones óptimas para cada especie silvestre implica un gran esfuerzo que, si bien ya existen programas y grupos de trabajo enfocados en ello, está lejos de cumplirse en los próximos años por la necesidad de analizar caso por caso las características y requerimientos de las semillas de cada especie (KEW, 2010). Por tal motivo, es importante buscar alternativas que permitan alcanzar mejores porcentajes de germinación incluso de las semillas que ya presenten poco vigor, debido al proceso natural de deterioro y el ocasionado por almacenamiento en condiciones subóptimas (Kozlowski, 1972; Fenner y Thompson, 2005). El aumento de la capacidad germinativa de semillas almacenadas en condiciones poco adecuadas podría aumentar las probabilidades de éxito de los programas de restauración utilizando estas semillas provenientes de especies propias de la comunidad (Vázquez-Yañes y Batis, 1996).

Dentro de las alternativas existentes hasta ahora para mejorar el desempeño de las semillas se encuentran los tratamientos pre-germinativos de acondicionamiento o “priming” utilizados ampliamente para el mejoramiento de la respuesta germinativa de especies agrícolas. Este tratamiento consiste en una hidratación controlada de la semilla que activa los procesos celulares que ocurren durante las etapas tempranas de la germinación, sin llegar a la protrusión de la radícula, lo cual se evita al deshidratar nuevamente la semilla. Posteriormente la semilla es almacenada hasta el momento en que se vaya a realizar la siembra. El acondicionamiento favorece un alto porcentaje de germinación, la cual es

sincrónica y rápida, y además confiere a las semillas la capacidad de germinar y establecerse bajo condiciones de estrés (Bray, 1995; Varier, *et al.*, 2010; Nicasio-Arzeta *et al.*, 2011). En el presente estudio se evaluó la respuesta germinativa de semillas sometidas a un tratamiento de acondicionamiento, así como el cambio que genera este tratamiento a nivel de expresión génica y de movilización de lípidos de reserva en tres especies silvestres, con potencial para su uso en programas de restauración: *Ceiba aesculifolia*, *Gossypium hirsutum* y *Buddleja cordata*, cuyas semillas muestran signos de bajo vigor debido al almacenamiento en condiciones subóptimas.

2. ANTECEDENTES

2.1. GERMINACIÓN

De forma general, la germinación se puede definir como el conjunto de procesos que inician con la hidratación de la semilla, por medio de los cuales el embrión reanuda su metabolismo y que le permite continuar con su crecimiento activo, resultando en la protrusión de la radícula a través de las cubiertas seminales (Jann y Amen, 1977; Bewley, 1997; Nonogaki *et al.*, 2010).

La germinación es un proceso continuo que inicia desde la imbibición y antes de que sea visible la radícula a través de las cubiertas seminales (germinación *sensu stricto*). El proceso de germinación ha sido descrito principalmente en semillas que tienen la cualidad de almacenamiento tipo “ortodoxo”, las cuales pasan por una etapa de desecación en la planta madre durante su maduración, y que contribuye a su capacidad de ser almacenadas por tiempos prolongados, a diferencia de las semillas recalcitrantes, que no pasan por esta fase, o es muy corta (Angelovici *et al.*, 2010; Weitbrecht *et al.*, 2011). Bewley (1994) describe la germinación como un proceso trifásico, donde cada fase tiene un patrón característico de aumento en el contenido de humedad. A fin de comprender claramente el momento fisiológico en el cual se desarrolla este estudio, las fases canónicas de la germinación se englobaron en eventos tempranos de la germinación (fases I y II) y germinación *sensu stricto* (fase III y protrusión de la radícula), los cuales se describen a continuación.

2.1.1. Eventos tempranos de la germinación.

Imbibición o fase I. En esta fase ocurre una absorción rápida de agua, la cual es un proceso pasivo generado por las diferencias del potencial hídrico entre la semilla y el medio. En semillas muertas se puede observar un incremento en el peso fresco de las mismas como resultado de este proceso, sin embargo en estas semillas no se reactiva el metabolismo (Moreira de Carvahlo y Nakagawa, 1988; Hartmann y Kester, 1997; Don, 2006). Esta fase es muy rápida, caracterizada por un incremento acentuado de la respiración celular debido

al proceso de reparación y replicación de mitocondrias. Así mismo comienza la degradación de las sustancias de reserva debida a la síntesis o activación de enzimas. Al inicio de esta fase la glucólisis es mucho más activa para la producción de ATP mientras las mitocondrias están en proceso de reparación. Una vez activas, predomina el ciclo de las pentosas fosfato, en el cual se genera NADPH, que provee de poder reductor a enzimas con actividad antioxidante. Este sistema antioxidante protege proteínas y otros componentes celulares de la actividad especies reactivas de oxígeno (ROS) que se acumulan con la reactivación de la respiración (Nonogaki *et al.*, 2010; Weitbrecht *et al.*, 2011).

Degradación y traslocación o fase II. En esta fase se da el transporte activo de las sustancias de reserva, desde el tejido de reserva hacia el tejido meristemático; la absorción de agua disminuye considerablemente y la intensidad de la respiración comienza a decrecer lentamente. Así mismo, el eje embrionario todavía no reanuda completamente su crecimiento y elongación. Esta fase es mucho más larga, de ocho a diez veces la duración de la fase I (Moreira de Carvahlo y Nakagawa, 1988; Hartmann y Kester, 1997; Don, 2006). En las semillas que presentan germinación en dos etapas, por ejemplo *A. thaliana*, la ruptura de la testa ocurre durante esta fase, y posteriormente se da la ruptura de endospermo al inicio de la fase III cuando se da nuevamente una toma acelerada de agua y protruye la radícula. En las semillas sin endospermo, como *Brassica napus* y *Pisum sativum*, la ruptura de la testa ocurre previo a la fase III (Weitbrecht *et al.*, 2011).

Movilización de reservas. Las semillas acumulan sustancias de reserva en forma de carbohidratos, lípidos y proteínas (Mayer, 1982; Bewley *et al.*, 2013). Conforme la semilla se hidrata, inicia el metabolismo de estas sustancias por la activación de diversas enzimas almacenadas durante la etapa de maduración, que en su mayoría presentan actividad de hidrolasa, transferasa y fosforilasa (Mayer, 1982).

Los carbohidratos tienen diversos destinos, en particular los oligosacáridos como sacarosa, rafinosa, glucodifrutosa y fructanos están asociados con respiración, mientras que el resto de los azúcares, que son el resultado del metabolismo de almidón, pueden aportar esqueletos carbonados para la formación de otros compuestos en vías metabólicas distintas de la producción de energía (Mayer, 1982; Bewley *et al.*, 2013).

La movilización de lípidos comienza con la actividad de lipasas y lipoxigenasas que promueven el rompimiento de triacilgliceroles (TAG) en glicerol y cadenas de ácidos grasos libres. En las semillas puede haber más de un tipo de lipasa activa. El glicerol generalmente es dirigido hacia la respiración celular mientras los ácidos grasos libres entran al peroxisoma. En el peroxisoma son degradados por β -oxidación y en la mayoría de las semillas son convertidos en mayor proporción a carbohidratos por medio de la actividad de dos enzimas: la isocitrato liasa (ICL) y la malato sintetasa (MLS) del ciclo del glioxilato, que dirigen los carbonos hacia gluconeogénesis. Sin embargo, en algunas semillas como las de *Citrullus* y *Elaes* se ha descrito que los ácidos grasos son utilizados principalmente para

producción de energía en la respiración (Mayer, 1982; Graham, 2008; Theodoulou y Eastmond, 2012).

Las proteínas de reserva son solubilizadas y finalmente degradadas por proteasas en péptidos más cortos. Diversas proteinasas y peptidasas rompen estos péptidos, liberando los aminoácidos que son deaminados posteriormente. Los esqueletos carbonados pueden pasar a la producción de energía (en particular los provenientes de aspartato y glutamato), por la actividad de enzimas como la malato deshidrogenasa (MDH), la fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK) y la glutamato descarboxilasa (GAD). Los esqueletos de carbono pueden ser dirigidos también hacia otras vías metabólicas (Mayer, 1982; Weitbercht *et al.*, 2011). Así mismo, el metabolismo de metionina y cisteína está asociado con otros procesos celulares que regulan la germinación, como son la metilación de DNA y remodelamiento de cromatina, síntesis y señalización por citocininas, síntesis de glutatión y la síntesis de etileno. Este último favorece la germinación al inducir la degradación de la pared celular, bloqueando la señalización por ABA y facilitando la protrusión de la radícula (Rajjou *et al.*, 2012).

La movilización de estas sustancias de reserva, en particular la movilización de lípidos determinan la capacidad o el desempeño germinativo de las semillas, pero no impiden el proceso de germinación *per se*. En *A. thaliana* se ha observado que semillas mutantes, incapaces de llevar a cabo la β -oxidación son capaces de germinar a tasas mucho más lentas, pero no se logra el establecimiento de la plántula a menos que se proporcione una fuente externa de carbohidratos (Pritchard *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que la germinación y la movilización de sustancias de reserva son reguladas de forma independiente.

2.1.2. Germinación visible y desarrollo post-germinativo.

Protrusión de la radícula y crecimiento de la plántula. En esta fase se puede apreciar el crecimiento del eje embrionario por expansión celular, a causa de un nuevo incremento en la absorción de agua y la acción de proteínas remodeladoras de la pared celular. La división celular no parece jugar un papel fundamental en la protrusión de la radícula (Weitbrecht *et al.*, 2011; Dekkers *et al.*, 2013). Se incrementa la respiración celular, mientras que las sustancias que fueron transportadas en la fase anterior se utilizan para formar el citoplasma, protoplasma y paredes celulares. En esta fase se lleva a cabo la protrusión de la radícula a través de la cubierta seminal (Moreira de Carvahlo y Nakagawa, 1988; Hartmann y Kester, 1997; Don, 2006). En la Figura 1 se muestra un resumen de la dinámica hídrica y los principales procesos fisiológicos que ocurren durante el proceso de germinación.

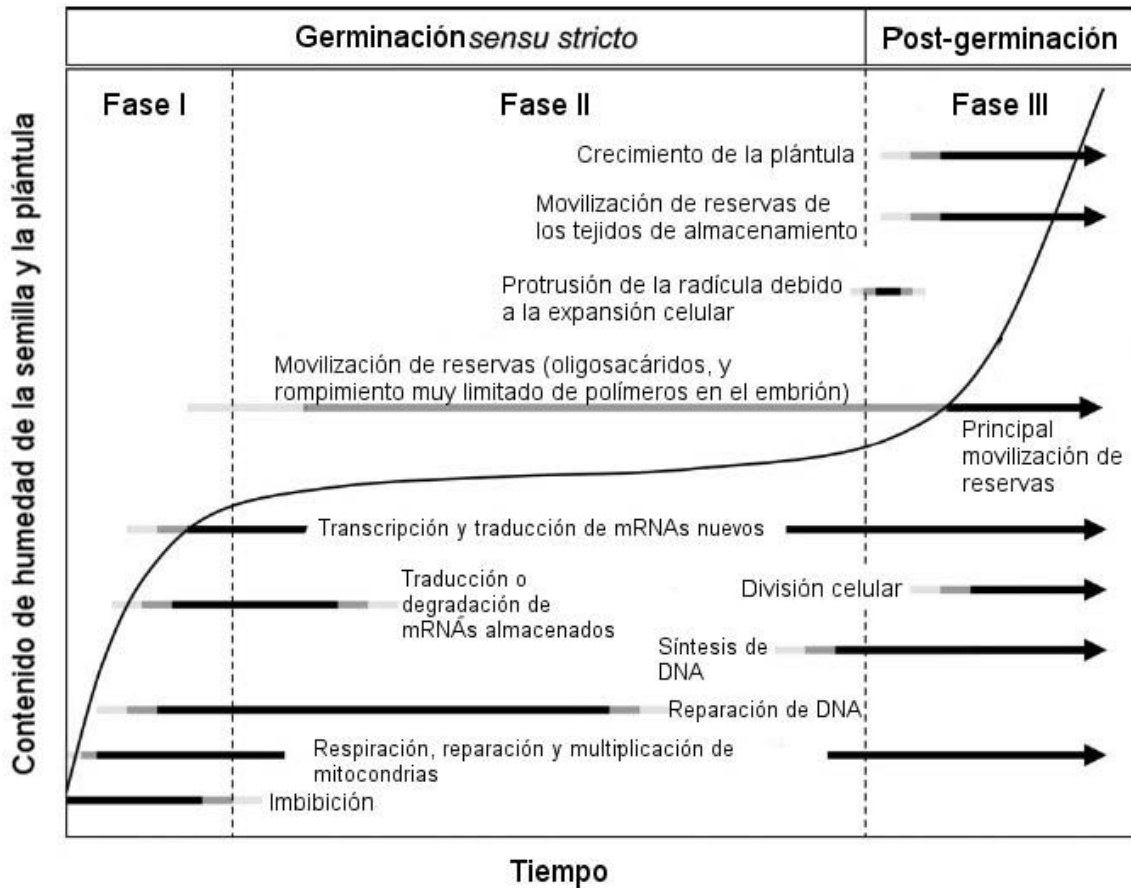


Figura1. Principales procesos metabólicos asociados a cada fase de la germinación. La línea continua indica el proceso de imbibición de la semilla (Nonogaki *et al.*, 2010).

2.1.3. Transcriptomas y proteomas del proceso de germinación

Los análisis de proteomas y transcriptomas de semillas secas demostraron que en ésta se encuentran todos los componentes necesarios para sostener la germinación y la síntesis de proteínas, previo al establecimiento de la plántula (Rajjou *et al.*, 2004; Kimura y Nambara, 2010). En transcriptomas de semillas secas de *A. thaliana* y *Hordeum vulgare* (Nakabayashi *et al.*, 2005; Narsai *et al.*, 2011; Rajjou *et al.*, 2012; Dekkers *et al.*, 2013) se han reportado más de 12,000 mRNAs distintos y más de 17,000 en *Oryza sativa* (Howell *et al.*, 2009). En los transcriptomas de semillas con y sin latencia se han reportado similitudes, lo que sugiere que el transcriptoma de la semilla seca es un reflejo del contexto en el que se da el proceso de maduración de la semilla y de su preparación para el proceso de germinación. Los transcriptomas de semillas sin latencia presentan una mayor proporción de proteínas de choque térmico y relacionadas a las especies reactivas de oxígeno (ROS), en comparación con las semillas con latencia, las cuales presentan mayores proporciones de transcritos de metabolismo de fosfato y lípidos así como de transcritos asociados a

citoesqueleto. Las diferencias en el transcriptoma se acentúan una vez que la semilla es hidratada (Kimura y Nambara, 2010).

El análisis del cambio en el transcriptoma entre semillas secas y distintos tiempos de hidratación ha demostrado que la germinación involucra cambios en la abundancia de mRNAs y metabolitos no sólo relacionados con el grado de hidratación de la semilla, sino también con el tejido estudiado y el estado fisiológico de la semilla (Howell *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2011; Dekkers *et al.*, 2013).

Dekkers y colaboradores (2013) describieron las diferencias de categorías funcionales y/o procesos biológicos sobrerrepresentados entre los transcriptomas del eje embrionario y del endospermo de semillas de *A. thaliana*. En el endospermo micropilar se activan tempranamente las categorías de transporte y metabolismo energético, defensa, respuesta a absísico y regulación de la transcripción; mientras que en el eje embrionario están sobrerrepresentados los planes de desarrollo post-germinativo. Hay categorías funcionales presentes en ambos tejidos, como son las asociadas a la función de la pared celular, metabolismo de nucleótidos y aminoácidos y el proceso de traducción. Las diferencias en el tipo de mRNAs que se da entre estos dos tejidos distinguen a su vez dos momentos fisiológicos en la semilla. El primer momento fisiológico comprende entre la transición del estado seco a la reactivación del metabolismo y de procesos celulares particulares para cada tejido, hasta el momento previo al rompimiento de la testa. Los primeros cambios son apreciables entre las 3 y 16 horas después de la imbibición en el endospermo y en la radícula respectivamente. En este primer momento fisiológico se observa que en ambos tejidos hay relativamente la misma cantidad de genes que aumentan su expresión como de los que disminuyen. El segundo momento fisiológico corresponde a la fase entre el rompimiento de la testa y el rompimiento del endospermo. En esta fase hay una sobrerrepresentación en el endospermo micropilar de genes asociados a degradación y transporte de proteínas, metabolismo secundario y estrés; mientras que en la radícula se expresan genes de metabolismo de DNA/RNA y proteínas. Es hasta las 38 h después de la hidratación cuando en el embrión se empiezan a expresar genes de metabolismo primario y secundario, biosíntesis de la pared celular y transporte, previo a la ruptura del endospermo.

Así mismo, en la primera fase transcripcional se observó una inversión del programa de maduración de la semilla. Esto es, los genes que en el proceso de maduración aumentaban su expresión, la disminuían en la germinación; en cambio los genes que se encontraban a bajos niveles de expresión en la maduración, lentamente aumentaron durante la germinación (Dekkers *et al.*, 2013). Esto concuerda con otros resultados obtenidos en semillas de *O. sativa*, en los cuales se distinguen cambios desde las primeras 3 horas de hidratación (Howell *et al.*, 2009). El recambio de mRNAs tanto en *O. sativa* como en *A. thaliana* es importante para la regulación de la transición de un programa de desarrollo a otro y del propio desempeño germinativo de las semillas (Rajjou *et al.*, 2004; Fait *et al.*, 2006; Howell *et al.* 2009; Kimura y Nambara 2010).

2.1.4. El estado seco y longevidad de la semilla

El tiempo transcurrido entre el momento de la liberación de las semillas de la planta madre y la germinación es muy variable entre las diferentes especies de plantas. En esta ventana de tiempo las semillas ortodoxas se encuentran en un estado de baja hidratación que limita los procesos metabólicos, y por lo tanto, un cambio en el contenido de humedad de la semilla puede afectar la longevidad y la posibilidad de almacenarlas por tiempos prolongados (Butler *et al.*, 2009; Weitbrecht *et al.*, 2011). El estado de metabolismo limitado genera dos situaciones: por un lado se pueden presentar una serie de procesos conocidos como procesos de posmaduración o “after-ripening”, los cuales favorecen la germinación, y que se han descrito para varias especies tanto domesticadas como silvestres; por otro lado las semillas se pueden enfrentar a condiciones de temperatura, humedad, luz y organismos patógenos que generen el deterioro o la muerte de la semilla (Weitbrecht *et al.*, 2011). Tanto en condiciones de laboratorio como en campo se dan ambas situaciones.

Las semillas pueden estar generando y acumulando compuestos que les ocasionen daño cuando se presentan variantes en las condiciones ambientales durante el almacenamiento. Este daño puede ser a nivel de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos de reserva, membranas y pared celular entre otros (Rajjou *et al.*, 2012). La acumulación de daño genera alteraciones en el inicio, la tasa y porcentaje final de germinación y las semillas pueden perder la capacidad de germinar en ambientes estresantes. Las plántulas pueden mostrar aberraciones morfológicas que impidan su establecimiento y supervivencia (Moreira de Carvahlo y Nakagawa, 1988; Don, 2006; Rajjou *et al.*, 2012).

Se han desarrollado diversas estrategias de almacenamiento en condiciones controladas que aminoran o retrasan el proceso de deterioro el mayor tiempo posible (Don, 2006; KEW, 2010). Sin embargo, determinar las condiciones óptimas para cada especie es un proceso ineficiente y poco viable de aplicar. Por lo tanto, es importante buscar alternativas que permitan contrarrestar parte del daño que las semillas han acumulado por su almacenamiento en condiciones subóptimas. El acondicionamiento puede ser un tratamiento viable y exitoso para revigorizar semillas deterioradas (Butler *et al.*, 2009; Catusse *et al.*, 2011; Rajjou *et al.*, 2012).

2.2. ACONDICIONAMIENTO

El acondicionamiento es una técnica de mejoramiento de la respuesta germinativa de diversas semillas, que consiste en la hidratación de las mismas seguida de un proceso de deshidratación, con lo cual se inician los procesos tempranos de la germinación sin llegar a la protrusión de la radícula (Bray, 1995; Varier *et al.*, 2010). En diferentes especies de plantas, principalmente en especies cultivadas, esta técnica ha promovido una germinación sincrónica y rápida, porcentajes más altos de germinación, un incremento en el vigor de las

plántulas y el establecimiento en ambientes adversos, así como en la salida de la latencia (Varier *et al.*, 2010; Nicasio-Arzeta *et al.*, 2011).

En general, el acondicionamiento anticipa los procesos relacionados con la germinación de la semilla. Este tratamiento induce procesos relacionados con las etapas tempranas de la germinación (Varier *et al.*, 2010; Rajjou *et al.*, 2012). Los tipos de acondicionamiento se describen a continuación.

2.2.1. Tipos de acondicionamiento.

Existen muchas variantes por las cuales se puede llevar a cabo este tratamiento pre-germinativo de acondicionamiento, entre las cuales el más recurrido es el osmoacondicionamiento, en el que se utilizan soluciones osmóticas a base de sales inorgánicas como el polietilenglicol (PEG). Otro método de acondicionamiento, de menor costo y complejidad y usado frecuentemente, consiste en la inmersión de las semillas directamente en agua a una temperatura baja (hidroacondicionamiento; Varier *et al.*, 2010). Ambos métodos son poco aplicables en campo debido a la necesidad de condiciones constantes y equipo especial o costoso (Taylor *et al.*, 1988). Por otro lado, estos dos tipos de acondicionamiento pueden generar un ambiente de anoxia e inducir un estado de estrés hídrico en las semillas tratadas (Taylor *et al.*, 1988; Yacoubi *et al.*, 2010; Catusse *et al.*, 2011). Esto se refleja en porcentajes bajos de germinación y establecimiento al usar concentraciones altas de sales inorgánicas y por la aparición de proteínas asociadas a estrés en el proteoma, en particular proteínas de choque térmico, LEAs, peroxiredoxinas, lipoxigenasas, superóxido dismutasas y glutatión-s-transferasas (Campos *et al.*, 2002; Yacoubi *et al.*, 2010; Catusse *et al.*, 2011).

Un tercer tipo de acondicionamiento es el mátrico, incluyendo el acondicionamiento natural (Taylor *et al.*, 1988; González-Zertuche, 2005). El acondicionamiento mátrico se puede realizar en condiciones de laboratorio, usando una matriz sólida que simule el intercambio de agua entre las partículas del suelo y las semillas. El acondicionamiento natural se realiza directamente en campo, enterrando las semillas en el periodo existente entre la temporada de dispersión natural de las semillas en cuestión y el establecimiento de la temporada de lluvias. Durante ese tiempo las semillas sometidas a acondicionamiento natural se ven expuestas a ciclos de hidratación-deshidratación en el suelo y perciben diferentes señales ambientales que son determinantes para el establecimiento y supervivencia de la nueva planta en su entorno (González-Zertuche *et al.*, 2001; González-Zertuche, 2005; Olvera-Carrillo, 2001; Benítez-Rodríguez, 2005).

Con el objetivo de obtener condiciones de acondicionamiento cercanas al proceso natural, en este estudio las semillas fueron sometidas a un acondicionamiento mátrico en el laboratorio. La ventaja de este sistema es que no hay pérdida de material ocasionada por depredación, es de bajo costo y fácilmente aplicable en campo dado que no se utiliza material ni equipo sofisticado para su realización.

2.2.2. Procesos fisiológicos favorecidos por el acondicionamiento.

El acondicionamiento tiene efecto sobre una amplia gama de eventos fisiológicos que van desde la reparación de ácidos nucleicos, síntesis de proteínas, hasta la regulación del ciclo celular (Varier *et al.*, 2010). En la Figura 2 se resumen algunos de los procesos fisiológicos principales que se estimulan con los diversos tipos de acondicionamiento.

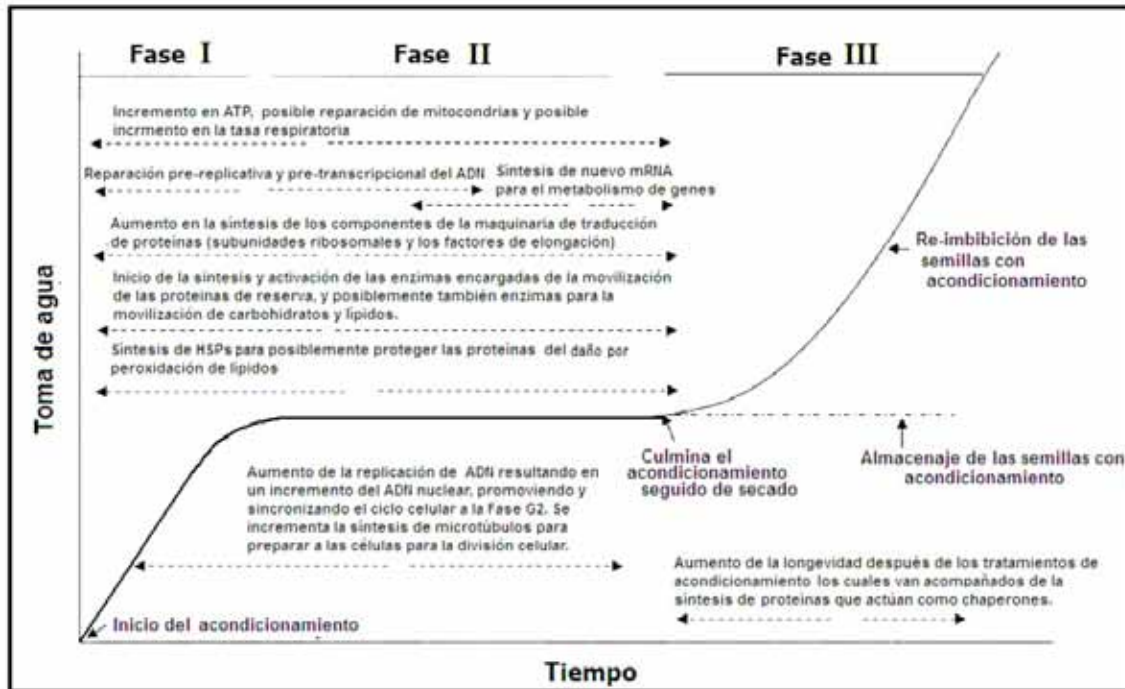


Figura 2. Principales procesos metabólicos que ocurren durante la germinación y que se estimulan con el acondicionamiento (tomado de Varier *et al.*, 2010).

El vigor es uno de los atributos asociados con la posibilidad de las semillas de germinar rápida y uniformemente ante una amplia gama de condiciones no óptimas para esa especie, o incluso en condiciones de estrés. En semillas de *Medicago sativa* y *Beta vulgaris* que presentan bajo vigor debido al envejecimiento acelerado, se ha demostrado que el acondicionamiento osmótico e hídrico pueden revertir parte del deterioro, favoreciendo la germinación sincrónica y mejores porcentajes de germinación, incluso en las semillas germinadas en un medio salino (Yacoubi *et al.*, 2010; Catusse *et al.*, 2011). Esta mejoría podría ser atribuida a la inducción de proteínas tipo LEA, proteínas de choque térmico, factores de transcripción, proteínas asociadas con la capacidad de síntesis de proteínas y la integridad de los canales dependientes de voltaje en mitocondrias. Así mismo, destacan enzimas asociadas a metabolismo primario, en particular el ciclo de las pentosas fosfato, lo cual podría favorecer la formación de NADPH, el cual provee de poder reductor a enzimas con actividad antioxidante. Estos resultados sugieren que el acondicionamiento de semillas deterioradas no solo promueve un adelanto de las etapas tempranas de la germinación, si no que puede implementar mecanismos de defensa contra una posible condición de estrés (Yacoubi *et al.*, 2010; Catusse *et al.*, 2011).

El análisis del transcriptoma de semillas de *Brassica oleracea* sometidas a osmoacondicionamiento reveló que este tratamiento induce los procesos tempranos de la germinación como es el metabolismo primario, y que favorece la transición hacia el proceso de germinación por medio de la degradación de mRNAs asociados a la maduración de la semilla (Soeda *et al.*, 2005).

2.2.3. Acondicionamiento de especies silvestres

La manipulación de semillas de especies silvestres es más complicada en comparación con especies domesticadas, debido a la heterogeneidad del estado de maduración de las semillas, así como el efecto materno sobre este proceso (Hay y Probert, 2013; Bewley *et al.*, 2013). Por tal motivo, la respuesta germinativa de los lotes de semillas colectados puede variar dependiendo del sitio o el año de colecta (González-Zertuche, 2005). Sin embargo, se han reportado respuestas favorables a diferentes tratamientos de acondicionamiento en especies como *Wigandia urens*, *Opuntia tomentosa*, *Dodonea viscosa*, *C. aesculifolia* y *B. cordata* (González-Zertuche *et al.*, 2001; Gamboa-deBuen *et al.*, 2006; Alvarado-López, 2009 y 2012; Garza-Caligaris *et al.*, 2012) aunque en algunos casos el acondicionamiento puede inducir una latencia secundaria (González-Zertuche *et al.*, 2001).

En particular para las semillas de *C. aesculifolia*, el acondicionamiento natural mejora la respuesta germinativa incrementando la tasa y porcentaje final de germinación, la cual a su vez es mucho más sincrónica y con un tiempo de inicio menor con respecto a las semillas sin acondicionamiento (Alvarado-López, 2012). Así mismo, las semillas que responden positivamente al acondicionamiento natural movilizan lípidos, lo cual se ve reflejado en una disminución significativa del contenido de lípidos totales en las semillas con acondicionamiento natural (Alvarado-López, 2012).

Los estudios de las semillas de *G. hirsutum* se han realizado en su mayoría en variedades de algodón domesticado (Tamcot 2111, TM1, cv. SZ93-14, cv. Sivon, entre otras), en particular para mejorar la tolerancia a la desecación y la producción de fibra (Saranga *et al.*, 2004; Chee *et al.*, 2005; Chaudhary *et al.*, 2009). Para el caso de la planta silvestre, el interés de la comunidad científica se ha enfocado en la preservación de la variabilidad genética de la especie, para mejorar las variedades domesticadas (Chee *et al.*, 2005; Chaudhary *et al.*, 2009). En la variedad domesticada cv. SZ93-14 se ha reportado que el acondicionamiento hídrico sincroniza la germinación, pero disminuye el porcentaje final de germinación (Murungu *et al.*, 2004), y modificando el potencial hídrico del sustrato en el cual se germinan las semillas es posible potenciar los efectos del acondicionamiento hídrico, obteniendo incluso porcentajes más altos de germinación (Murungu *et al.*, 2003).

Las semillas de *B. cordata* presentaron una respuesta favorable al acondicionamiento natural, osmótico e hídrico al ser germinadas en condiciones de temperatura alternante

(González-Zertuche 2005). Las semillas de esta especie mostraron un polimorfismo fisiológico de respuesta al acondicionamiento de acuerdo al sitio de origen de las semillas, tipo de acondicionamiento aplicado y condiciones de luz y temperatura del sitio donde fueron enterradas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios en los niveles de transcritos debidos al acondicionamiento materno, para identificar la o las vías genéticas que podrían estar relacionadas con el vigor de semillas almacenadas de *Ceiba aesculifolia*, *Gossypium hirsutum* y *Buddleja cordata*.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la respuesta germinativa de semillas de bajo vigor de *C. aesculifolia*, *G. hirsutum* y *B. cordata* al aplicar un tratamiento de acondicionamiento materno.
- Identificar las vías genéticas y procesos biológicos que cambian su expresión en respuesta al tratamiento de acondicionamiento materno en semillas de *C. aesculifolia*, *G. hirsutum* y *B. cordata* por medio del análisis de microarreglos heterólogos, comparando contra el genoma completo de *Arabidopsis thaliana*.

4. MÉTODO

4.1. Especies de estudio

Ceiba aesculifolia (Kunth) Britten y Baker F. (Malvaceae), conocido como ceiba o pochote es un árbol de hasta 15m de alto, hermafrodita, de hojas digitado compuestas, caducifolio. Sus semillas muestran una respuesta al almacenamiento de tipo ortodoxo. Es una especie pionera-secundaria, originaria de las regiones tropicales subhúmedas de América, y su distribución en México abarca desde la costa de Sinaloa hasta Oaxaca y el sur de Chiapas, en la cuenca del Balsas en Puebla, México, Morelos, Guerrero y Michoacán, hasta Yucatán y Quintana Roo (Pennington y Sarukhán, 1998; Niembro *et al.*, 2010).

Gossypium hirsutum L. (Malvaceae), el algodón silvestre, es un arbusto anual, de hasta 1.5 m de alto, con tallos usualmente ramificados estrellado-pubescentes. Es endémica de

Mesoamérica, y su distribución en México abarca principalmente zonas semiáridas y subtropicales en los estados de Veracruz, Oaxaca, Yucatán, Campeche, Quintana Roo Sinaloa y Durango. Es de gran importancia como fuente de variabilidad genética para el mantenimiento de cultivares utilizados en la producción de fibras textiles y la obtención de aceites de su semilla (CONABIO, 2012).

Buddleja cordata H.B.K. (Loganiaceae), conocido como Tepozán, es un árbol o arbusto de 1 a 5 m de alto, de corteza oscura y fisurada, con follaje persistente. Tiene una amplia distribución en el Valle de México como elemento de la vegetación secundaria de bosques de pino-encino, zacatonales, matorrales xerófilos y áreas urbanas localizados entre 2 200 y 3 000 m.s.n.m. Coloniza con facilidad sitios abiertos y perturbados (Mendoza, 2003).

4.2. Colecta y manipulación del material vegetal

Las semillas de *C. aesculifolia* (municipio de Actopan, Veracruz), *G. hirsutum* (municipio Morro Ayuta, Oaxaca) y *B. cordata* (Parque ecológico de la Ciudad de México, Ajusco) se colectaron en 2009, 2010 y 2006 respectivamente. Se almacenaron en el laboratorio a temperatura ambiente (25-27°C) en frascos de vidrio sellados, hasta el momento de realizar las pruebas de germinación.

Evaluación de la condición de deterioro. Para las semillas de *G. hirsutum* y *B. cordata* se hizo un ensayo preliminar comparando semillas almacenadas previamente y semillas recién colectadas a inicios de 2012. Las semillas se germinaron en placas de agar al 1%, incubadas en cámaras de germinación a 25°C (*G. hirsutum*) y a temperatura alternante de 23-35°C (*B. cordata*), con fotoperiodo 12h luz/12h oscuridad. Se registró la germinación acumulada por día, durante 13 días.

El ensayo preliminar con las semillas de *G. hirsutum* se llevó a cabo con lotes colectados en 2010 y 2012. El lote de 2010 presentó signos drásticos de deterioro, por lo cual se eliminó del ensayo con acondicionamiento. Con el lote de 2012 se evaluó el efecto del acondicionamiento mátrico, medido en función del inicio, tasa y porcentaje final de germinación.

4.3. Acondicionamiento mátrico

Las semillas de las tres especies se colocaron dentro de bolsas de organza, las cuales se enterraron durante dos días (basados en un ensayo preliminar) en macetas con suelo estéril, humedecido a capacidad de campo. Las macetas se mantuvieron en oscuridad y a 25°C. Posteriormente se exhumaron las semillas y se dejaron secar entre hojas de papel periódico durante dos días más, en oscuridad y a 25°C. Una vez concluido el tratamiento, se congelaron muestras de semillas con y sin acondicionar para los análisis de contenido de lípidos y de expresión génica. Estas muestras se mantuvieron a -70 °C hasta el momento de su utilización. Para el caso de *C. aesculifolia* se realizó el tratamiento de acondicionamiento

una segunda vez, con semillas provenientes del mismo lote de semillas almacenadas desde 2009. Este segundo tratamiento de acondicionamiento (2013) se realizó nueve meses después del primer tratamiento de acondicionamiento (2012). Se procedió con el mismo método de acondicionamiento mátrico y de congelamiento del material vegetal necesario para los ensayos moleculares. Debido a que las semillas acondicionadas en 2012 y en 2013 mostraron una respuesta diferente al mismo tratamiento de acondicionamiento en función del tiempo que permanecieron en almacenamiento, se usó el término de “respuesta positiva” (2012) y “sin respuesta” (2013) al acondicionamiento mátrico para distinguir ambos tratamientos en la sección de resultados.

4.4. Prueba de germinación

Para las semillas de *C. aesculifolia* y *G. hirsutum* se utilizaron 90 y 150 semillas por tratamiento repartidas en 3 y 5 réplicas de 30 semillas cada una, respectivamente. Se comparó el desempeño germinativo de semillas sometidas a el tratamiento de acondicionamiento mátrico contra semillas sin acondicionamiento mátrico (control). Las semillas se germinaron en placas de agar al 1%, incubadas en una cámara de germinación LAB-LINE Biotronette (LAB-LINE Instruments Inc.) a 25°C, con fotoperiodo 12h luz/12h oscuridad. Para el caso de *G. hirsutum* se colocó papel filtro humedecido sobre las semillas para generar un ambiente de mayor humedad dentro de la placa de agar. Se registró la germinación acumulada por día, durante 20 días (*C. aesculifolia*) y 15 días (*G. hirsutum*), de acuerdo a estudios previos de Alvarado-López (2012, para el caso de *C. aesculifolia*) y a una curva de germinación preliminar para el caso de *G. hirsutum*.

Para las semillas de *B. cordata* se utilizaron 250 semillas repartidas en 5 réplicas de 50 semillas cada una. Las semillas se colocaron en placas de agar al 1% y se incubaron en una cámara de germinación LAB-LINE Biotronette (LAB-LINE Instruments Inc.) con temperatura alternante entre 25 y 35 °C, como fue descrito por González-Zertuche (2001). Se compararon los lotes de semillas acondicionadas de 2006, 2009 y 2012 con su respectivo control. Se registró la germinación acumulada por día, durante 13 días.

En las tres especies estudiadas se consideró que una semilla había germinado cuando la radícula era visible a través de la testa y el endospermo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de germinación y los estudios previos de Alvarado-López (2012, Fig. 3) sobre movilización de lípidos y otras sustancias de reserva, se decidió medir la movilización de lípidos con las semillas de *C. aesculifolia*. Para el caso de *G. hirsutum* y *B. cordata* no se hicieron ni el análisis de contenido de lípidos ni el de la expresión génica por medio de microarreglos, ya que no mostraron una respuesta favorable al acondicionamiento mátrico (Figs. 11 y 12). Por lo tanto, a partir del apartado siguiente todo el análisis sobre contenido de lípidos, molecular y metabólico será exclusivamente sobre las semillas de *C. aesculifolia*.

4.5. Análisis de contenido de lípidos

La cuantificación del porcentaje de lípidos totales se hizo por el método de Bligh y Dyer (1959) en semillas control, con acondicionamiento mátrico y semillas control germinadas (Anexo 1).

Así mismo se hizo la extracción y transesterificación de ácidos grasos (modificado de Priestley *et al.*, 1985) para determinar el perfil de ácidos grasos libres contenidos por medio de cromatografía de gases (Anexo 1).

4.6. Análisis estadístico

Se hizo una transformación arcoseno del porcentaje de germinación y del porcentaje de lípidos. Se ajustaron a una curva sigmoide con la función $y=a/(1+b^{-cx})$ (ver parámetros en Anexo 2). Para el análisis de germinación se obtuvieron los siguientes valores: inicio (día al que se presenta el 1% de germinación), tasa (1° derivada máxima), tiempo medio (día al cual se alcanza el 50% de germinación) y porcentaje final de germinación (Alvarado-López, 2012). Se evaluó si existen diferencias significativas entre semillas recién colectadas y semillas de bajo vigor con y sin acondicionamiento mátrico, según fuera el caso, por medio de una prueba de t de student o de un análisis de varianza de una vía (ANDEVA), seguidas de una prueba de Tuckey para medias distintas. En los casos en los que no se cumplió la normalidad de la distribución de los datos se hizo un análisis de varianza tipo Kruskal-Wallis para diferencias de medianas. Todos los análisis estadísticos se hicieron usando los programas Table Curve 2D v. 5.01 y SigmaPlot v. 11.0

4.7. Análisis de la expresión génica

4.7.1. Extracción de RNA.

Se utilizó el protocolo de extracción de Li y Trick (2005), el cual fue desarrollado para extracción de RNA a partir de semillas con contenido elevado de almidón (Anexo 3). Para eliminar cualquier contaminante residual se utilizó un kit de purificación RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Dado que la muestra de RNA se utilizó para obtener cDNA con el cual se realizó la hibridación en el microarreglo, se tomaron en consideración las siguientes recomendaciones para tener mejores resultados (Ramírez *et al.*, 2003):

- El RNA debe estar lo más concentrado posible.
- La banda 28s del ribosoma debe ser al menos dos veces más grande que la banda 18s.
- No se requiere aislar el RNA mensajero.

4.7.2. Microarreglos heterólogos.

Se realizó el análisis de microarreglos heterólogos utilizando como referencia el genoma completo de *Arabidopsis thaliana*. Se hizo la comparación del cambio en el nivel de expresión entre las semillas control y con acondicionamiento mátrico. Las semillas control

y acondicionadas utilizadas para este análisis se congelaron a -70°C el día que se completó el tratamiento de acondicionamiento (al final del segundo día de deshidratación en oscuridad). Ese mismo día que fue realizada la prueba de germinación con las semillas restantes. En total se usaron 10 semillas para la extracción de RNA de calidad, siguiendo un protocolo de extracción para semillas ricas en carbohidratos (modificado de Li y Trick, 2005). Con las muestras de RNA obtenidas de *C. aesculifolia* se hicieron dos microarreglos: comparando control vs acondicionamiento y el inverso (acondicionamiento vs control) para eliminar falsos positivos (Fig. 3).

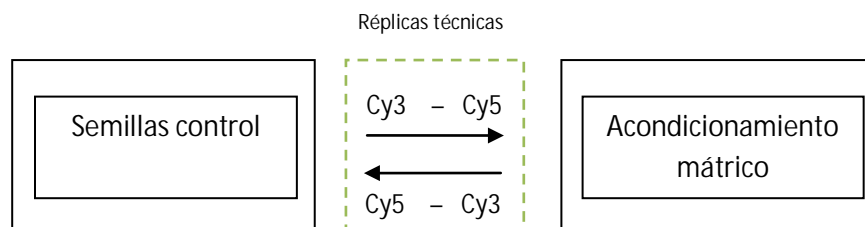


Figura 3. Diseño experimental del análisis con la técnica de microarreglos. Se utilizaron 2 laminillas, una por réplica técnica. En la primer laminilla se asigna un fluoróforo a cada condición, en la segunda laminilla se invierten los fluoróforos (réplica técnica).

La hibridación del microarreglo, la normalización y análisis estadístico del cambio de expresión de los transcritos se realizó en la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Sólo se analizaron los genes cuyos transcritos rebasaran el umbral de 1.5 veces la expresión detectada para ese gen en comparación con el grupo control, por medio de bases de datos y herramientas bioinformáticas en línea, entre ellas: David bioinformatics database (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), The Arabidopsis Information Resource (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>), The Plant Metabolic pathways (PMN, <http://www.plantcyc.org/>) y el National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

4.7.3. Validación del microarreglo.

Se seleccionaron 17 genes cuyos niveles de transcrito cambiaron en respuesta al tratamiento de acondicionamiento mátrico para validar el cambio en la expresión detectado por el microarreglo. Estos genes están asociados a vías de metabolismo primario, debido a que el análisis preliminar de los resultados sugería que la producción de energía fue uno de los procesos celulares que se vieron afectados principalmente por el tratamiento. En general, se dio preferencia a los transcritos detectados en el microarreglo de las semillas que sí respondieron al acondicionamiento. Así mismo se seleccionaron genes cuyos transcritos codifican para proteínas con actividad comprobada experimentalmente y que están ubicados en puntos de interconexión, entrada o salida de una vía a otra, o cuya actividad contribuye a la regulación de esa vía en particular. Los cambios en el nivel de expresión se comprobaron por medio de PCR de punto final. La estrategia para obtener parte de las

secuencias de los genes de *C. aesculifolia* con las cuales validar el cambio en la expresión se describen abajo.

4.7.4. Extracción de DNA genómico de *C. aesculifolia*.

Se utilizó un protocolo modificado para maíz (tejidos con contenido alto de carbohidratos). Se utilizaron las primeras hojas verdaderas (uno o dos foliolos pequeños, equivalente a entre 100 y 250 µg de tejido macerado) obtenidas de plántulas crecidas en cámaras LAB-LINE Biotronette (LAB-LINE Instruments Inc.) a 25°C y fotoperíodo de 12h luz/oscuridad. Las hojas se colectaron después del medio día ya que a esa hora presentaban menos carbohidratos que interfirieran con la extracción; el material se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido (Anexo 4). El DNA genómico se utilizó para la amplificación de la secuencia nucleotídica de los 17 genes seleccionados para la validación del microarreglo.

4.7.5. Síntesis de cDNA a partir de RNA de *C. aesculifolia*

Se sintetizó cDNA utilizando un oligo dT, a partir de RNA obtenido de las semillas control y de las semillas con acondicionamiento natural. El cDNA total se utilizó tanto para el aislamiento inicial de los 17 cDNAs específicos de *C. aesculifolia* seleccionados, por medio de oligos degenerados como para la validación del microarreglo por PCR de punto final, usando los oligos específicos para las secuencias de cDNA de *C. aesculifolia* (Anexo 5).

4.7.6. Diseño de oligos degenerados.

De los genes seleccionados como candidatos para la validación del microarreglo se realizó un Blast discontinuo para analizar el grado de conservación de sus secuencias de cDNA, usando la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Se hizo la comparación de al menos cinco secuencias provenientes de especies como *Arabidopsis lyrata*, *Brassica* sp, *Camelina sativa*, *Theobroma cacao*, *G. hisutum* y *Vitis vinifera*. La inclusión de *V. vinifera* en el Blast es importante ya que pertenece al grupo más basal de angiospermas, lo cual es un buen indicador del grado de conservación de la secuencia y por tanto aumenta las probabilidades de éxito en la obtención una secuencia específica de *C. aesculifolia*. Los oligos se diseñaron con servicios en línea de diseño de oligos (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Primer3: <http://primer3.wi.mit.edu/>), se eligieron los pares de oligos que brindaran las secuencias más largas posibles (entre 300 y 1000pb), que el oligo no cayera en un intrón o entre dos exones, que tuvieran un porcentaje de GC cercanos al 50% y una *Tm* (temperatura de fusión) similar entre los 57°-63° C (Anexo 6).

4.7.7. Amplificación de secuencias de DNA y cDNA de *C. aesculifolia* por PCR.

Se inició con un protocolo estándar de PCR usando una mezcla de volumen final de 50 µl, utilizando DNA o cDNA como templado. En el caso de no haber logrado la amplificación de algún fragmento de DNA o cDNA en condiciones estándar, se modificó el volumen de Mg⁺⁺ o el volumen de oligos; esto con la finalidad de favorecer un alineamiento de los

oligos mucho más inespecífico y aumentar las posibilidades de amplificar el fragmento correcto (Anexo 7).

Se seleccionaron sólo los fragmentos amplificados que fueran de mayor o del mismo peso molecular que el esperado para el gen en *A. thaliana*. Los fragmentos se purificaron por el método de SGW (Siliconized glass wool, Anexo 7) y se ligaron en un vector pGEM-T easy (®PROMEGA, Anexo 7), el cual contiene un gen de resistencia a ampicilina y el gen lac Z, que permite la selección por color de las colonias que contienen el vector con la secuencia de interés.

4.7.8. Clonación en *Escherichia coli*.

Los cDNAs que fueron aislados por PCR y ligados en pGEM-T easy se amplificaron en células competentes de *E. coli* utilizando un protocolo de asimilación de vector por medio de shock térmico. Posteriormente se confirmó la ligación del vector con el inserto correcto por medio de la purificación de plásmidos por lisis alcalina (“boiling miniprep”) y su digestión con enzimas de restricción. Las colonias con el inserto del peso molecular correcto fueron purificadas con un kit de QIAGEN (“spin miniprep”, Anexo 8).

4.7.9. Análisis de secuencias clonadas

Los fragmentos clonados en *E. coli* fueron enviados a la unidad de secuenciación del Instituto de Biología, UNAM. Las secuencias fueron analizadas en la base de datos del NCBI, usando las herramientas de Blast discontinuo de nucleótidos y conversión a proteína (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). En caso de que con esas dos herramientas no se encontrara similitud con alguna secuencia dentro de la base de datos, se utilizó un Blast con el nivel más bajo de astringencia únicamente sobre el genoma de *A. thaliana*.

4.7.10. Diseño de oligonucleotidos específicos de *C. aesculifolia*.

Con las secuencias de cDNA de *C. aesculifolia* obtenidas se diseñaron los oligonucleotidos específicos con los cuales realizar la validación por PCR de punto final. Estos oligos se diseñaron para generar una banda de cDNA de 300 a 550pb de longitud. Las características de cada oligo se enlistan en el Anexo 9.

4.7.11. Nivel de expresión génica por PCR

El cambio en la expresión génica se analizó por PCR de punto final. En el Anexo 7, Cuadro 3 se muestra el programa de PCR utilizado. Se comparó el cambio en la abundancia de los transcritos detectados en el microarreglo con la presencia/ausencia de la banda esperada para cada gen de *C. aesculifolia*, en las muestras de cDNA de semillas con acondicionamiento, su grupo control, y de semillas control germinadas. Esta presencia/ausencia de la banda debía coincidir con el cambio en la abundancia de los transcritos detectados en el microarreglo. Se utilizó a la actina 7 (Act7) como control interno de la amplificación por PCR (Garza-Caligaris *et al.*, 2012).

5. RESULTADOS

5.1. Evaluación de la respuesta germinativa de semillas de las tres especies.

5.1.1. Germinación de semillas de *C. aesculifolia*.

✓ Semillas con respuesta positiva al acondicionamiento mátrico.

Las semillas de *C. aesculifolia* colectadas en 2009 y germinadas tres años después (2012) iniciaron la germinación y alcanzaron el 50% de germinación antes (día 3, $t = -4.366$, $P = 0.001$; día 6 $t = 10.433$, $P = 0.0001$, respectivamente) que lo reportado para este lote cuando las semillas estaban recién colectadas (inicio al día 7 y 50% de germinación al día 10). Así mismo las semillas sin acondicionar presentaron un porcentaje final significativamente menor que el reportado para este lote cuando al momento de la colecta ($t = -5.362$, $P = 0.006$; Garza-Caligaris *et al.* 2012) (Fig. 4, línea punteada y discontinua).

El lote de semillas de 2009, analizado en 2012, se sometió a acondicionamiento mátrico y como respuesta a este tratamiento también se incrementó el porcentaje final de germinación (72.22% para las semillas control y 85.55% para las semillas acondicionadas Fig. 4; $t = -2.758$, $P = 0.041$). En las semillas con acondicionamiento, la germinación inició en el día 2, mientras que el grupo control inició al día 3. No se encontraron diferencias significativas entre estos dos tratamientos para la tasa de germinación ($6.763 \pm 1.22\%$ y $6.307 \pm 0.517\%$, $t = 0.592$, $P = 0.586$, respectivamente) o para el día en el cual se alcanza el 50% de germinación (día 6, $t = 1.706$, $P = 0.163$).

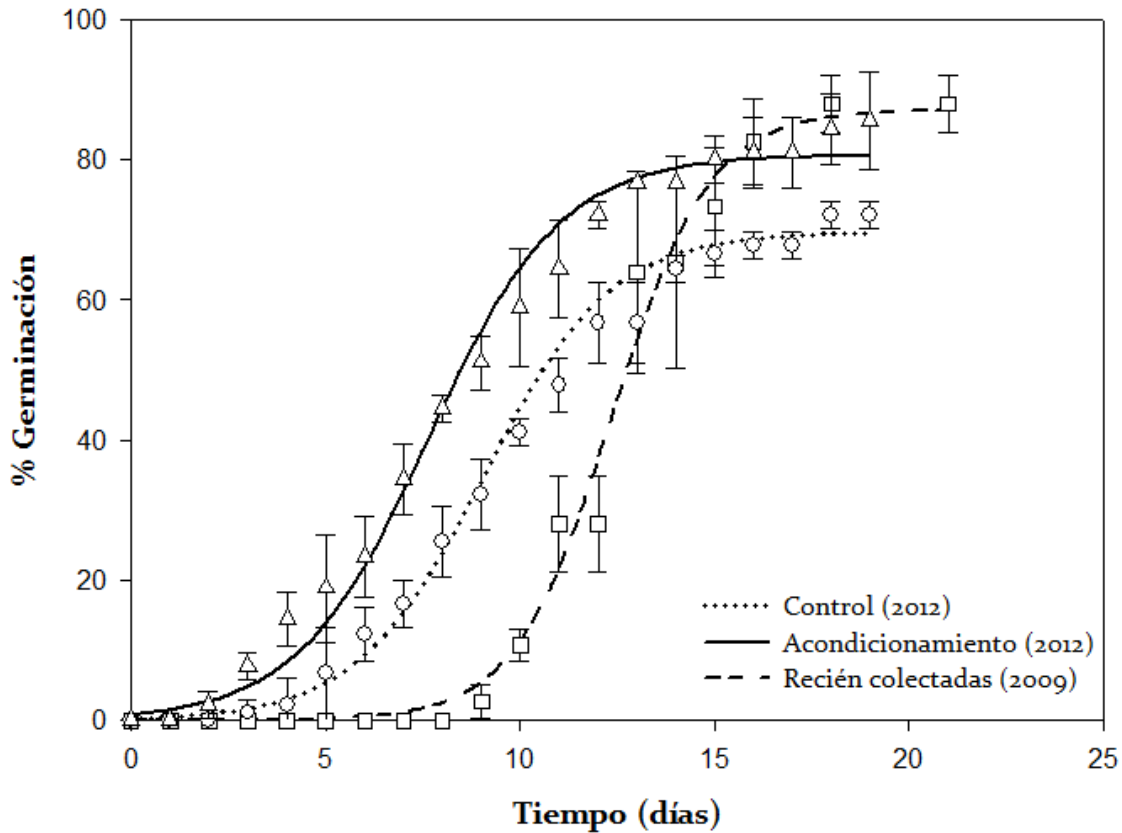


Figura 4. Germinación de las semillas de *C. aesculifolia* con respuesta positiva al acondicionamiento mátrico. Como punto de referencia, se muestra la respuesta germinativa de las semillas al momento de ser colectadas, reportado por Alvarado-López (2012). Se observa la tasa y porcentaje final de germinación de las semillas con deterioro por almacenamiento (línea punteada), las semillas con deterioro por almacenamiento a las cuales se les aplicó el tratamiento de acondicionamiento mátrico (línea continua), y la tasa y porcentaje de germinación de las semillas reportada por Garza-Caligaris *et al.* (2012) inmediatamente después de ser colectadas en campo (línea discontinua). Los símbolos indican el promedio de germinación por día; las barras verticales indican la desviación estándar. El porcentaje final de germinación de las semillas acondicionadas es equiparable al porcentaje final de germinación de las semillas cuando fueron colectadas.

En las semillas de *C. aesculifolia* se cuantificó el contenido de lípidos totales. En la semilla sin acondicionamiento (control), los lípidos corresponden al $35.68\% \pm 0.79$ del peso total. Con el tratamiento de acondicionamiento este porcentaje se redujo de manera significativa a un $32.03\% \pm 1.68$, y a $20.14\% \pm 0.52$ en la semillas germinadas (Fig. 5; $F_{(2,8)} = 158.376$, $P = 0.001$).

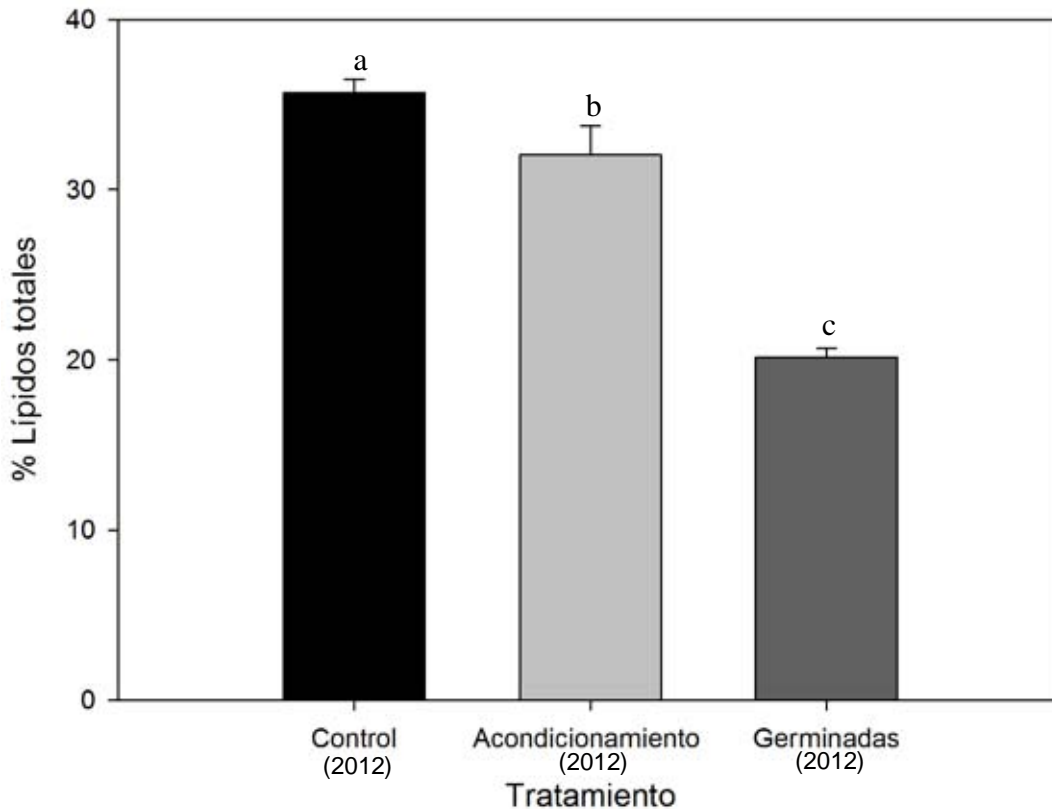


Figura 5. Promedios del porcentaje de lípidos totales contenidos en las semillas de *C. aesculifolia* que respondieron positivamente al acondicionamiento mátrico. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos ($F_{(2,8)}=158.376$, $P=0.001$). Las barras verticales indican la desviación estándar.

✓ Semillas de *C. aesculifolia* sin respuesta al acondicionamiento mátrico

En 2013 se realizó otra curva de germinación al lote de semillas de 2009, aplicando el mismo tratamiento de acondicionamiento. Para esta fecha, nueve meses después, ya no se observó una respuesta favorable al tratamiento de acondicionamiento (Fig. 6). Las semillas con acondicionamiento presentaron un porcentaje final de germinación del 69%, el cual fue significativamente menor que su grupo control (78.5%, $t=4.0$, $P=0.016$) y que las semillas con acondicionamiento del primer ensayo (85.55%, $t=-4.195$, $P=0.014$). La germinación inició en el día 2 tanto en el tratamiento de acondicionamiento como en el control; no hubo diferencias significativas entre éstos tanto en la tasa de germinación (4.88% y 4.55% por día, respectivamente; $t=0.450$, $P=0.676$) como en el momento en el que se alcanza el 50% de la germinación total (día 7 ± 0.46 y 11 ± 2.88 respectivamente; $t=2.323$, $P=0.081$).

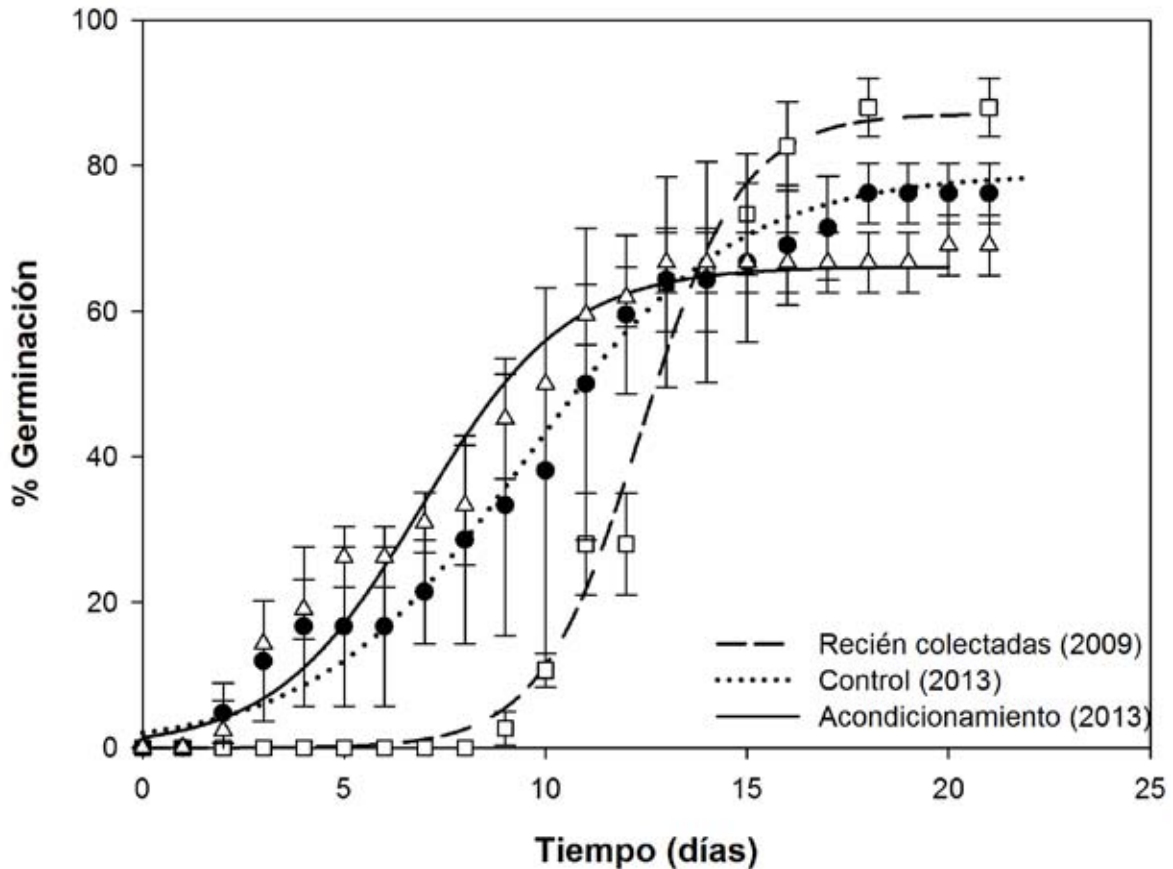


Figura 6. Germinación de las semillas de *C. aesculifolia* que no respondieron favorablemente al acondicionamiento mátrico. Como punto de referencia, se muestra la respuesta germinativa de las semillas al momento de ser colectadas, reportada por Alvarado-López (2012). Se observa la tasa y porcentaje final de germinación de las semillas con deterioro por almacenamiento (línea punteada) y las semillas con deterioro por almacenamiento a las cuales se les aplicó el tratamiento de acondicionamiento mátrico (línea continua). Los símbolos indican el promedio de germinación por día; las barras verticales indican la desviación estándar.

Se hizo el análisis del contenido de lípidos de las semillas que no respondieron al acondicionamiento. En la Figura 7 se observa que no hubo diferencias significativas en el contenido de lípidos entre las semillas con acondicionamiento mátrico y su control. En las semillas germinadas, el contenido de lípidos disminuyó significativamente con respecto a las semillas control y las acondicionadas ($28.21\% \pm 2.22$, $30.76\% \pm 2.69$ y $19.83\% \pm 1.65$ respectivamente; $H=5.956$, $g.l.= 2$, $P= 0.025$).

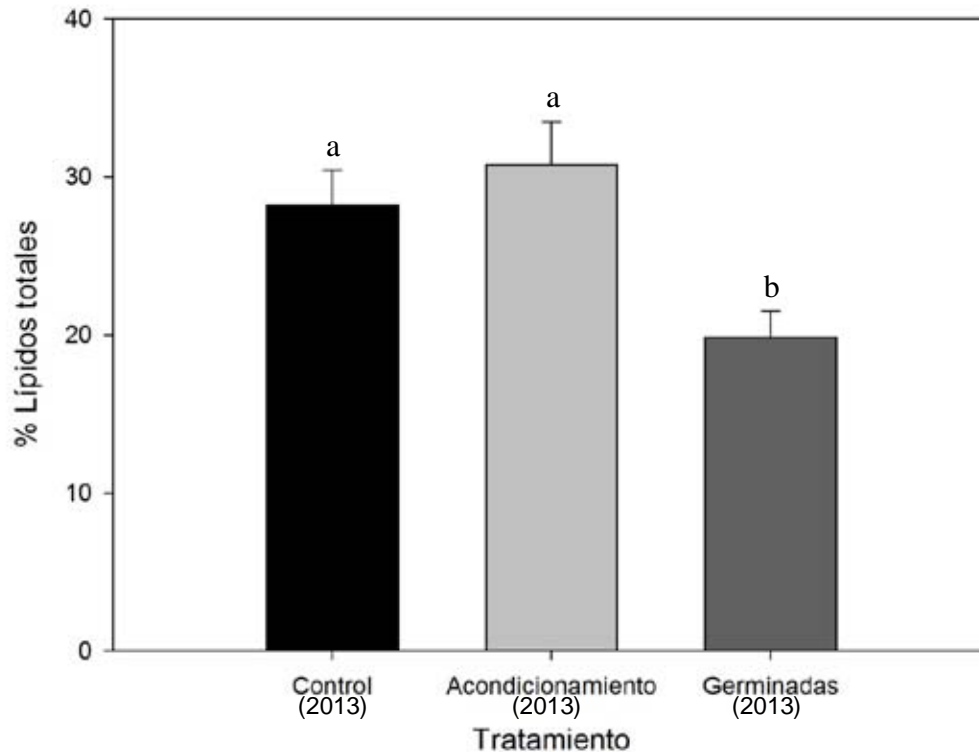


Figura 7. Promedio del porcentaje de lípidos totales contenidos en las semillas de *C. aesculifolia* que no respondieron al acondicionamiento mátrico. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos ($H=5.956$, $g.l.=2$, $P=0.025$). Las barras verticales indican la desviación estándar.

✓ Comparación de la respuesta germinativa de las semillas de *C. aesculifolia* con diferentes tiempos en almacenamiento

Las semillas de *C. aesculifolia* mostraron una respuesta diferente al mismo tratamiento de acondicionamiento en función del tiempo que permanecieron en almacenamiento (Fig. 4 y 6). Por un lado, las semillas que respondieron positivamente al tratamiento, que alcanzaron un porcentaje final de germinación significativamente mayor que su grupo control, permanecieron tres años en almacenamiento. En cambio, las semillas que no respondieron al tratamiento, donde el porcentaje final de germinación fue menor que su control, permanecieron tres años y nueve meses en almacenamiento. A pesar de las diferencias en la respuesta al tratamiento, la capacidad germinativa de estos dos grupos de semillas se mantuvo (Fig. 8). El porcentaje final de germinación fue significativamente mayor en las semillas sin respuesta al acondicionamiento ($t=-28.824$, $P=0.001$; Cuadro 1). Para el resto de los atributos analizados no hubo diferencias estadísticamente significativas (tasa: $7.9\pm 1.299\%$ y $4.88\pm 1.01\%$, respectivamente, $t=-2.042$, $P=0.111$; 50% de germinación: día 7.9 ± 0.604 y 11.081 ± 2.889 , respectivamente, $t=-1.866$, $P=0.136$; Cuadro 1). También se observa en la Figura 8 que las semillas que no respondieron al tratamiento muestran mayor variación, lo que indica que el desempeño en general de estas semillas fue más irregular que las semillas germinadas nueve meses antes.

Cuadro 1. Atributos del desempeño germinativo analizados en semillas de *C. aesculifolia* almacenadas durante tres años (Control 2012), o tres años nueve meses (Control 2013). Al final de cada columna se denota el valor estadístico de *P*, el cual sólo fue significativo para el porcentaje final de germinación. Se muestran promedios y desviaciones estándar.

Lote	Inicio (día)	Tasa (% h ⁻¹)	50% germinación (día)	% final germinación
Control 2012	~3	7.9±1.299	7.9±0.604	72.22±1.924
Control 2013	~2	4.88±1.01	11.081±2.889	78.571±0.0
Valor de <i>P</i>	0.392	0.111	0.139	0.001

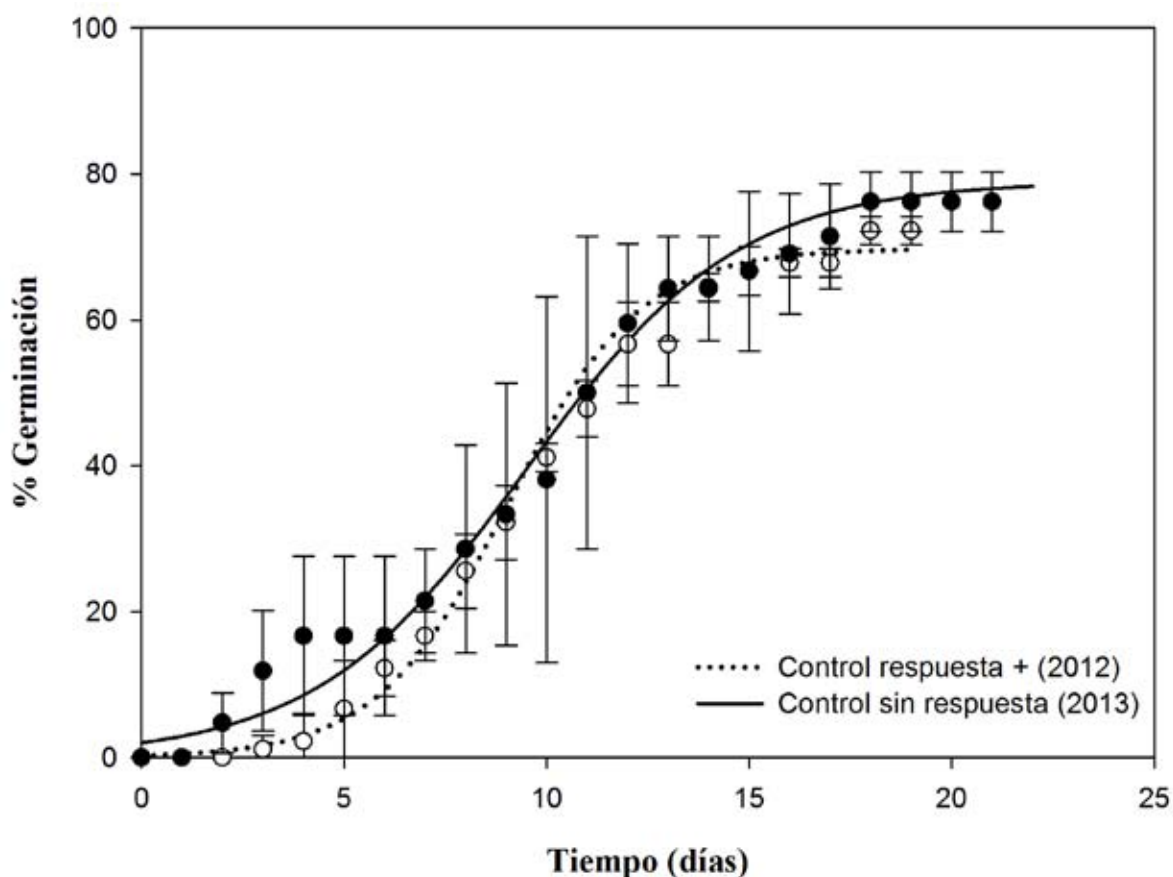


Figura 8. Germinación de las semillas de *C. aesculifolia* después de haber sido almacenadas durante tres años (control respuesta +) y tres años, nueve meses (control sin respuesta). Los símbolos indican el promedio de germinación por día; las barras verticales indican la desviación estándar. Las semillas “control sin respuesta” muestran mayor variación en el desempeño germinativo que las semillas “control respuesta +”.

✓ Contenido de ácidos grasos en semillas de *C. aesculifolia*

Se analizó el tipo y contenido de ácidos grasos presentes en las semillas de *C. aesculifolia* que fueron colectadas en 2009 con y sin respuesta al tratamiento de acondicionamiento. Así mismo se analizó el contenido de ácidos grasos de un lote de semillas recién colectado en 2014 para determinar si hubo diferencias en el contenido de ácidos grasos entre semillas

almacenadas y recién colectadas. En el Cuadro 2 se indica el contenido (mg/g) de los cuatro ácidos grasos detectados: linoléico, oléico, palmítico y esteárico. Dado que hubo una variación elevada en los datos, se calculó la proporción de cada tipo de ácido graso en relación al contenido de ácido esteárico de cada muestra (Fig. 9). No hubo diferencias significativas en la proporción de los ácidos grasos entre los lotes independientemente de la edad o del tratamiento de acondicionamiento (palmítico, $F_{(4, 12)} = 0.473$, $P = 0.755$; linoléico, $F_{(4, 12)} = 0.914$, $P = 0.500$; oléico, $F_{(4, 12)} = 0.685$, $P = 0.622$; esteárico, $H = 3.093$, $g.l. = 12$, $P = 0.542$).

El ácido graso más abundante en las semillas de *C. aesculifolia* es el ácido linoléico, seguido del oléico; ambos son ácidos grasos de tipo insaturado. De los ácidos grasos saturados destaca el ácido palmítico, el cual es el tercer tipo de ácido graso abundante en estas semillas. Finalmente el ácido esteárico se detectó en cantidades muy bajas.

Cuadro 2. Contenido y tipo de ácidos grasos de semillas de *C. aesculifolia*. Los tratamientos “Control S” y “Acon. S” corresponden a las semillas que respondieron favorablemente al tratamiento de acondicionamiento (Fig. 5 y 6); mientras que los tratamientos “Control N” y “Acon. N” corresponden a las semillas sin respuesta al acondicionamiento (Fig. 7 y 8). Se muestran promedios y desviaciones estándar.

Tratamiento	Contenido de ácidos grasos (mg/g)			
	Palmítico	Linoléico	Oléico	Esteárico
Recién colectadas	9.908±4.258	14.382±5.818	10.842±4.449	0.938±0.117
Control 2012	13.060±6.388	18.032±6.963	14.323±7.356	1.234±0.147
Acon. 2012	10.627±1.764	16.002±3.981	10.894±3.472	1.282±0.518
Control 2013	19.863±16.390	35.113±31.808	23.503±21.290	0.338±2.827
Acon. 2013	13.215±5.449	20.060±7.714	15.073±7.117	0.704±0.663

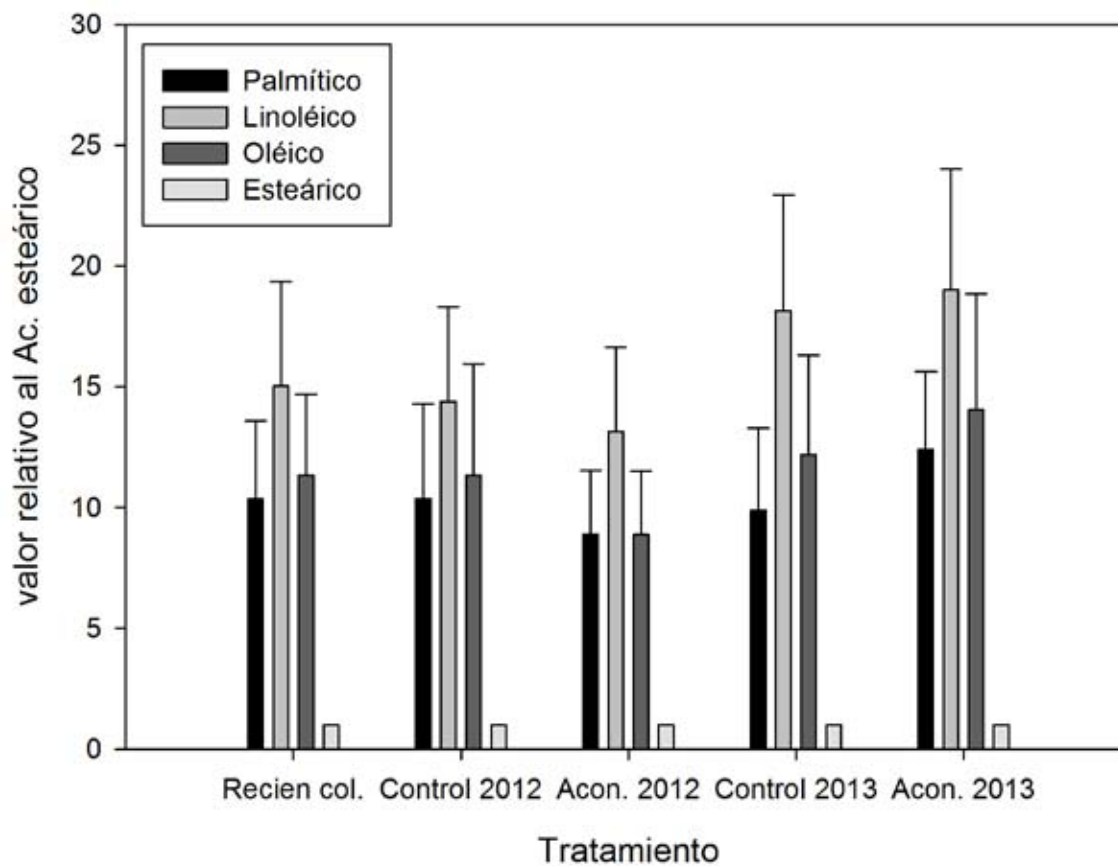


Figura 9. Contenido y tipo de ácidos grasos presentes en las semillas de *C. aesculifolia*, proporcionales al contenido de ácido esteárico, el cual se le asignó el valor de 1 para el análisis. Se indica el promedio para cada ácido graso; las barras verticales indican la desviación estándar. Recién col: semillas colectadas en 2014, sin almacenar. Control/Acon. 2012: semillas control y con acondicionamiento que respondieron favorablemente al tratamiento de acondicionamiento; Control/Acon. 2013: semillas control y con acondicionamiento sin respuesta al tratamiento.

5.1.2. Evaluación de la respuesta fisiológica de las semillas de *Gossypium hirsutum*:

✓ Curva preliminar de germinación de los tres lotes de semillas de *G. hirsutum*.

Para el caso del lote de 2010, se presentó un porcentaje de germinación menor al 10% tanto en semillas control como en semillas con acondicionamiento. En el resto de las semillas de este lote comenzó el proceso de descomposición en los primeros 5 días del ensayo. Las semillas silvestres y cultivadas colectadas en 2012 presentaron porcentajes de germinación de 50% y 80% respectivamente. El análisis de la respuesta al acondicionamiento mátrico se continuó solo con estos últimos.

✓ Respuesta germinativa de las semillas silvestres y cultivadas colectadas en 2012.

Se observaron diferencias significativas entre las semillas silvestres colectadas en 2012 y la variedad cultivada en cuanto al porcentaje final de germinación ($53.33 \pm 15.27\%$ y $83.33 \pm 5.77\%$; $t = -5.976$, $P = 0.001$) y en la tasa de germinación ($39\% \pm 33$ y $123\% \pm 85$,

respectivamente $t= -2.006$, $P= 0.073$). No se detectaron diferencias significativas en el tiempo al 50% de germinación (día 1, $t= 1.646$, $P= 0.131$, Cuadro 3).

Las semillas silvestres con acondicionamiento alcanzaron el 50% de semillas germinadas antes que su grupo control (día 1 y día 2, respectivamente; $t=5.033$ $P=0.007$) y aunque no se detectaron diferencias en el inicio de la germinación (día 1; $t=1.375$, $P=0.241$), en la tasa de germinación ($40\% \pm 11$ y $39\% \pm 33$; $t=0.180$, $P=0.866$) o el porcentaje final de germinación (60% y $53.33\% \pm 15.27$, respectivamente; $t=0.180$, $P=0.866$), sí se observa una tendencia a la germinación más sincrónica con el tratamiento de acondicionamiento. Las semillas de la variedad cultivada con acondicionamiento alcanzaron un porcentaje de germinación significativamente mayor que su grupo control ($96.66\% \pm 5.77$ y $83.33\% \pm 5.77$, respectivamente; $t=-2.828$, $P= 0.047$) y en general respondió mejor al tratamiento de acondicionamiento, mostrando una germinación más rápida y sincrónica que las semillas silvestres (Fig. 10 y Cuadro 3). No se encontraron diferencias significativas entre las semillas acondicionadas y su control en el inicio de la germinación (día 1; $t=0.837$, $P=0.450$), en la tasa de germinación ($172\% \pm 146$ y $123\% \pm 85$, respectivamente; $t=-0.505$, $P=0.640$) o el momento al 50% de la germinación (día 1; $t=1.659$, $P=0.173$).

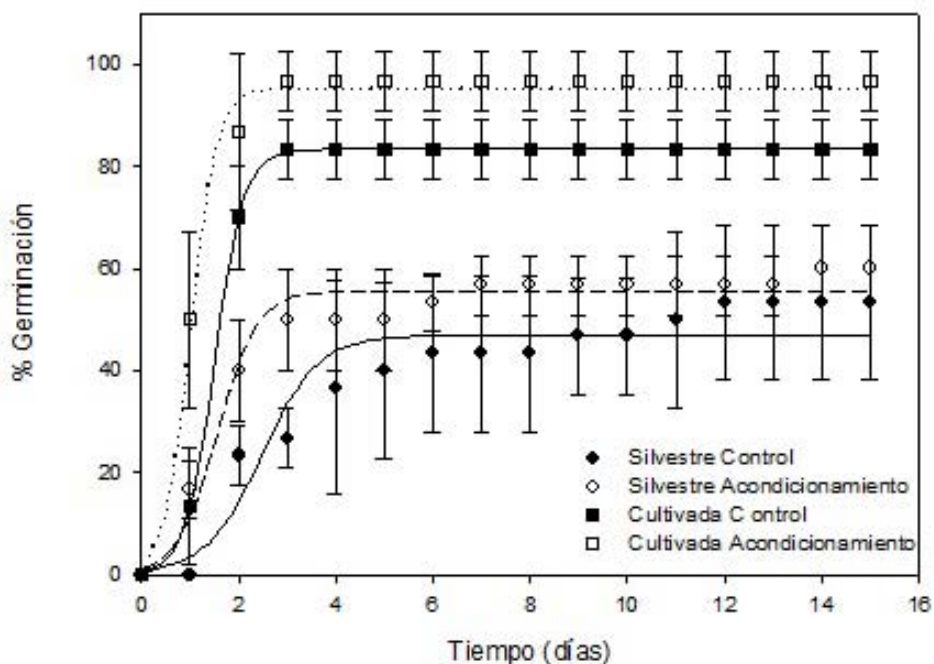


Figura 10. Respuesta fisiológica de las semillas de *G. hirsutum* silvestres y cultivadas al acondicionamiento mátrico de 2 días. C: control; P: acondicionamiento mátrico. Los símbolos indican el promedio de germinación por día; las barras verticales indican la desviación estándar.

Cuadro 3. Resultados obtenidos del tratamiento de acondicionamiento para los dos lotes de semillas de *G. hirsutum* comparados contra sus respectivos controles. Se muestra el promedio y desviación estándar para el porcentaje final y tasa de germinación. Así mismo se indica el día en el cual se inició la germinación y el día en el que se alcanza el 50% de semillas germinadas.

Lote	Parámetro	P	Control	Acondicionamiento
Cultivadas	% final de germinación	0.047	83.33% ±5.77	96.66% ±5.77
	Inicio	0.450	Día 1	Día 1
	Tasa de germinación	0.640	123%± 85 (por día)	172% ±146 (por día)
	50% germinación	0.082	Día 1	Día 1
Silvestres	% final de germinación	0.492	53.33% ±15.27	60%
	Inicio	0.241	Día 1	Día 1
	Tasa de germinación	0.986	39%±33 (por día)	40%±11 (por día)
	50% germinación	0.007	Día 2	Día 1

5.1.3. Evaluación de la respuesta fisiológica de las semillas de *Buddleja cordata*:

Las semillas de *B. cordata* colectadas en 2006, 2009 y 2012 presentaron un comportamiento germinativo similar en respuesta al acondicionamiento mátrico. Sólo se encontraron diferencias significativas en el porcentaje final de germinación entre las semillas colectadas en 2006 y las colectadas en 2012 (Fig. 11; $F_{(2, 29)} = 24.333$, $P=0.001$). No hubo diferencias significativas en el inicio (día 1, $F_{(2, 29)} = 2.017$, $P=0.112$), tasa ($H=7.681$ *g.l.* = 5, $P=0.175$) o en el día al 50% de germinación (día 3, $F_{(2, 29)} = 2.203$, $P=0.087$). Así mismo, para los tres años de colecta no hubo diferencias significativas entre el acondicionamiento y su grupo control en ninguno de los cuatro atributos analizados (Cuadro 4).

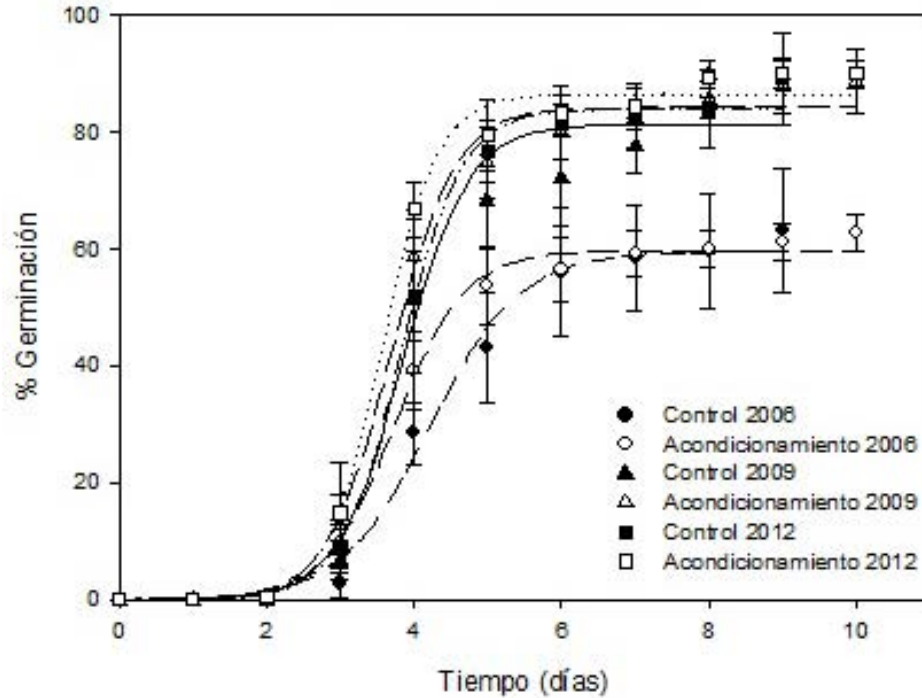


Figura 11. Germinación de semillas de *B. cordata* colectadas en tres años distintos. Los símbolos indican el promedio de germinación por día; las barras verticales indican la desviación estándar. No hubo diferencias significativas entre el tratamiento de acondicionamiento y su grupo control correspondiente para cada año de colecta.

Cuadro 4. Resultados obtenidos del tratamiento de acondicionamiento para los tres lotes de semillas de *B. cordata*, comparados contra sus respectivos controles. Se muestran los promedios y desviación estándar para el porcentaje final y tasa de germinación germinación. Así mismo se indica el día en el cual se inició la germinación y el día en el que se alcanza el 50% de semillas germinadas.

Lote	Atributo	P	Control	Acondicionamiento
2006	% final de germinación	0.996	63.2% ±10.545	62.8% ±3.033
	Inicio	0.112	Día 1	Día 1
	Tasa de germinación	0.175	30% (por día)	32% (por día)
	50% germinación	0.087	Día 3	Día 3
2009	% final de germinación	0.893	90.0%±2.244	88.8% ±5.403
	Inicio	0.112	Día 1	Día 1
	Tasa de germinación	0.175	37% (por día)	40% (por día)
	50% germinación	0.087	Día 3	Día 3
2012	% final de germinación	1.0	89.2%±7.949	90.00%±2.244
	Inicio	0.112	Día 1	Día 1
	Tasa de germinación	0.175	39% (por día)	45% (por día)
	50% germinación	0.087	Día 3	Día 3

5.2. Expresión de vías genéticas en semillas de *C. aesculifolia*.

Comparación entre semillas que respondieron al acondicionamiento y semillas que no respondieron al tratamiento.

Para las semillas que respondieron al acondicionamiento mátrico se registraron 3098 genes cuyos transcritos cambiaron su expresión (cambio de 1.5 veces su expresión con respecto al grupo control). De estos genes, 1601 corresponden a los genes que aumentaron su expresión y en los 1497 genes restantes se presentó una disminución de su expresión. Las semillas que no respondieron al acondicionamiento mátrico, a nivel de desempeño germinativo, también presentaron cambios en la expresión génica. Se registraron 2868 genes que cambiaron su expresión 1.5 veces con respecto al grupo control. De éstos, 1483 corresponden a los genes que aumentaron su expresión y 1385 genes disminuyeron su expresión.

La base de datos DAVID se utilizó para clasificar funcionalmente (agrupamientos o “clusters”) tanto a los genes que aumentaron como a los que disminuyeron su expresión. Este tipo de clasificación agrupa los genes en relación a su localización celular, función molecular y procesos biológicos afines que reflejan, a *grosso modo*, los cambios relevantes en la expresión génica correspondiente a las semillas que respondieron o no al tratamiento de acondicionamiento. En el Cuadro 5 se enlistan las principales 20 categorías funcionales que aumentaron o disminuyeron su expresión, tanto en semillas con respuesta favorable al acondicionamiento, como en las semillas sin respuesta favorable a éste. Este tipo de análisis asigna un orden jerárquico de importancia a cada cluster generado, de acuerdo a la información disponible para los genes detectados en cada microarreglo, y por tanto, no se puede excluir la posibilidad de que uno de los clusters obtenidos en las semillas que sí respondieron al acondicionamiento también esté presente en las semillas que no respondieron al acondicionamiento y viceversa. Por tal motivo, en la Figura 12 se muestra un “mapa de calor” en el cual se hizo una búsqueda y contraste de las categorías funcionales descritas en el Cuadro 5 para determinar cuáles de éstas son compartidas entre las semillas con o sin respuesta favorable al acondicionamiento y cuáles son exclusivas de cada grupo de semillas.

En las semillas que sí respondieron al tratamiento destacan las categorías funcionales que aumentan su expresión relacionadas con metabolismo primario, desarrollo post-germinativo o de estructuras de la parte aérea de la planta, de modificación de la pared celular y de mantenimiento de la homeostasis (primera columna del Cuadro 5). En las semillas que no respondieron al tratamiento destacan las categorías funcionales de respuesta a estrés (osmótico, salino, calor o patógenos), de regulación de la transcripción y empaquetamiento de DNA, respuesta a luz, proteólisis, ubiquitinación, de respuesta a ABA, etileno y auxinas,

factores de transcripción en diferenciación de hojas y ciclo circadiano (tercera columna del Cuadro 5).

Las categorías que bajaron su expresión en las semillas que sí respondieron al acondicionamiento están relacionadas con el desarrollo post-embionario, formación de la semilla y latencia, efectores asociados a ubiquitina, proteólisis, proteínas de pared celular y unión a citoesqueleto, de regulación negativa del desarrollo post-embionario y despolimerización de actina en citoesqueleto, síntesis de lípidos y carbohidratos, actividad de GTPasas en traducción de proteínas, disgregación del complejo de traducción y de respuesta a luz (segunda columna del Cuadro 5). Las semillas que no respondieron al acondicionamiento presentaron categorías relacionadas con la asimilación de fosfato, metabolismo de sustancias de reserva, ubiquitinación, defensa contra patógenos e inducción de apoptosis, transducción de señales e interacción con proteínas ancladas a membrana, modificación de la pared celular (pectinesterasas), organización de la pared celular (extensinas), desarrollo y maduración de la semilla y de regulación negativa de fotomorfogénesis y respuesta a luz (cuarta columna del Cuadro 5).

En la Figura 12 se observa que la mayor parte de los genes que cambian su expresión son distintos entre las semillas que sí respondieron al acondicionamiento (columna A y C) y las que no respondieron a éste (columna B y C), a pesar de que la mayoría de las categorías funcionales se comparten (barras verticales negras que se indican a la derecha de cada columna). Así mismo, en esta figura las áreas en negro de cada columna indican la ausencia o un cambio no significativo en la abundancia de transcritos para ese gen, en el microarreglo correspondiente a ese lote de semillas. De los 5,966 genes analizados, solamente se detectaron 176 genes que aumentaron su expresión y 183 genes que la disminuyeron en ambos lotes de semillas. De estos genes destacan los pertenecientes al cluster funcional de unión a ATP, el cual presentó el mayor número de genes compartidos (Fig.12, columna derecha). Así mismo se detectaron 48 genes que aumentaron su expresión en las semillas que sí respondieron al tratamiento pero que disminuyeron su expresión en las semillas que no respondieron al mismo. En cambio, se detectaron 152 genes que disminuyeron su expresión en las semillas con respuesta favorable al acondicionamiento y que aumentaron su expresión en las semillas sin respuesta favorable a este tratamiento.

Las semillas con y sin respuesta positiva al acondicionamiento mostraron cambios de expresión contrastantes. Se detectaron clusters funcionales que fueron exclusivos para cada lote de semillas, e incluso en los que solamente se presentó aumento o disminución de transcritos de los genes pertenecientes a ese cluster (Figura 12). En las semillas que respondieron favorablemente al acondicionamiento aumentó la expresión de genes relacionados con asimilación de nitratos, metabolismo de glutamato, coenzima-A ligasas, síntesis de terpenos, con dominio NUDIX y b-lectinas. En estas semillas también disminuyó la expresión de genes relacionados con la unión célula-célula, disgregación del complejo de traducción y GTPasas asociadas a ésta, con dominio SEC14 y CCCH. En las

semillas que no respondieron al acondicionamiento solamente aumentaron genes del cluster funcional de proteínas con dominio NAC, mientras que disminuyeron categorías de genes como las relacionadas con la regulación negativa de la fotomorfogénesis, ribosomas de cloroplasto y metalopeptidasas.

Por otro lado, en las categorías funcionales compartidas entre los dos lotes de semillas y que presentaron más contrastes en el cambio de expresión génica se incluyen las categorías de metabolismo primario, estrés, canales iónicos, empaquetamiento de DNA, factores de transcripción de la familia Homeobox y unión de ATP, en los cuales se observa que mientras en un lote de semillas aumentan o disminuyen su expresión, en el otro lote el patrón de expresión es el inverso (Fig. 12). Este patrón inverso de expresión es notorio en particular en los clusters relacionados con el metabolismo de carbohidratos, proteínas y principalmente de lípidos (Fig. 12, 13 y 14). Esto, aunado a la movilización de lípidos totales para cada lote de semillas (Fig. 6 y 7) y lo reportado por Alvarado-López (2012), sugiere que la movilización de lípidos podría ser fundamental en la capacidad de respuesta positiva al acondicionamiento mátrico de las semillas de *C. aesculifolia*. Por lo tanto el análisis de las vías genéticas se enfocará en cambios detectados en el metabolismo primario, haciendo énfasis en la movilización de lípidos. Los cambios detectados en cada vía se describirán de acuerdo al diagrama presentado en las Figuras 13 y 14 (modificado de Weitbrecht *et al.*, 2011 y Theodoulou y Eastmond, 2012), que corresponden al metabolismo en semillas con o sin respuesta al tratamiento, respectivamente. En el Anexo 10 se muestran los listados de genes resaltados en estas figuras. Así mismo, se indica el cambio en el nivel de expresión para cada gen y se denota con un asterisco (*) los genes seleccionados para la validación de los niveles de expresión detectados por el microarreglo.

Cuadro 5. Clasificación tipo “cluster” funcional por términos relacionados (anotaciones de proceso biológico, función molecular y componente celular). Se muestran los 20 agrupamientos principales de genes que aumentan o disminuyen su expresión en semillas de *C. aesculifolia*.

Semillas que respondieron al acondicionamiento				Semillas que no respondieron al acondicionamiento			
Aumento de expresión		Disminución de expresión		Aumento de expresión		Disminución de expresión	
Cluster funcional	# genes	Cluster funcional	# genes	Cluster funcional	# genes	Cluster funcional	# genes
1. En núcleo, parte del lumen de otros organelos	57	1. Desarrollo post-embriionario, formación de la semilla, latencia	66	1. Componentes de núcleo	52	1. Asimilación de fosfato, manganeso. Metabolismo de sustancias de reserva	18
2. Desarrollo del fruto, semilla y post-embriionario	38	2. Efectores asociados a ubiquitina: F-box	59	2. Respuesta a estrés osmótico, estrés salino	87	2. Dominios LRR y AAA asociados a defensa contra patógenos y apoptosis	44
3. Coenzima-A ligasas, metabolismo y transporte de lípidos	5	3. Uniones célula-célula	4	3. Respuesta estímulos abióticos: radiación, luz roja y roja lejana	87	3. Metabolismo de citocininas y auxinas	10
4. Desarrollo de hoja y estructuras asociadas, desarrollo de la parte aérea	11	4. Dominio FBD, rico en leucinas	18	4. Dominio NAC; protección de polipéptidos en proceso de síntesis; ubiquitinación	4	4. Dominio EFH, y de unión a calcio. Transducción de señales e interacción con proteínas ancladas a membrana	25
5. Metabolismo de carbohidratos	4	5. Actividad de GTPasas durante traducción a proteínas	13	5. Unión a ATP, metabolismo de fósforo; actividad de cinasas	225	5. Desarrollo de raíz	15
6. Factores de transcripción de desarrollo floral, desarrollo post-embriionario	56	6. Cis-trans isomerasas	16	6. Unión a GTP; movilización de vesículas	29	6. Pectinesterasas, inhibidores de pectinesterasas; modificación de pared celular	29
7. Metabolismo de glutamato	4	7. Unión de proteínas por dominio Kelch (unión a actina)	10	7. Unión a DNA, regulación de la transcripción; factores de	154	7. Organización de pared celular, extensinas	9

8. Cloroplastos, tilacoides	9	8. Pared celular	43	8. Empaquetamiento de DNA, organización de cromatina	18	8. Ribosomas de cloroplasto	7
9. Modificación de la pared celular, actividad de pectinesterasas	10	9. Unión de aminoácidos	8	9. Respuesta a ABA, auxinas y etileno	78	9. Peptidasas, carboxipeptidasas	33
10. Desarrollo de hojas y morfogénesis de la parte aérea	15	10. Unión de moléculas lipofílicas, SEC14	6	10. Dominio TPR	16	10. Metalopeptidasas asociadas a desarrollo y meduración de semillas	9
11. Hidrolasas con dominio Nudix	5	11. Ankirinas (unión de proteínas en citoesqueleto, transportadores de iones, transducción de señales)	12	11. Ubiquitinación	17	11. Cinasas de tirosina	22
12. B lectinas, dominio PAN	8	12. Regulación negativa de desarrollo post-embriionario	16	12. Factores de transcripción con dominio Homeobox	22	12. Transporte de lípidos de reserva en semillas; inhibidores de alfa-amilasas	21
13. Síntesis de terpenos	5	13. Acetilación de histonas	9	13. Dominio PPR, mitocondriales	33	13. Dominio LRR, asociado a defensa e interacción planta-patógeno	19
14. Metabolismo de lípidos	4	14. Disgregación de complejos protéicos, disgregación del complejo de traducción	4	14. Dominio LRR; defensa, respuesta a patógenos	41	14. Respuesta a monosacáridos, en desarrollo de raíz	4
15. Homeostasis redox	8	15. Respuesta a luz roja	15	15. Unión a RNA, respuesta a estrés por calor, defensa contra patógenos		15. Síntesis de carbohidratos y metabolismo de polisacáridos	13
16. MADS, floración diferenciación	6	16. Proteólisis, ubiquitinación	66	16. Factores de transcripción bHLH en floración y	17	16. Regulación negativa de fotomorfogénesis y respuesta a luz	5

				procesos asociados a ciclo circadiano; diferenciación a epidermis y/o tricomas			
17. Metabolismo de glicerolípidos, síntesis de GPI	5	17. Proteínas con dedos de zinc tipo CCCH (en ciclo celular)	8	17. Diferenciación y morfogénesis de hojas, desarrollo de la parte apical	18	17. Canales dependientes de voltaje, transporte de metabolitos a órganos sumidero	12
18. Metabolismo de oligosacáridos	7	18. Metabolismos de isoprenoides, síntesis de lípidos	27	18. Proteólisis, catabolismo de proteínas por ubiquitinación	55	18. Receptores de membrana, señalización	75
19. Citoesqueleto	18	19. Glicosil-hidrolasas, metabolismo de carbohidratos	7	19. ATPasas con dominio AAA (transporte, degradación y plegamiento correcto de proteínas)	30	19. Dominio WD40; ubiquitinación	17
20. Asimilación de nitratos	3	20. Regulación negativa de despolimerización de actina, citoesqueleto	8	20. Dominio EFH, cinasas dependientes de calcio; señalización en respuesta a patógenos	24	20. Canales iónicos, porinas. Desintoxicación por metales pesados. Fosforilación oxidativa	31

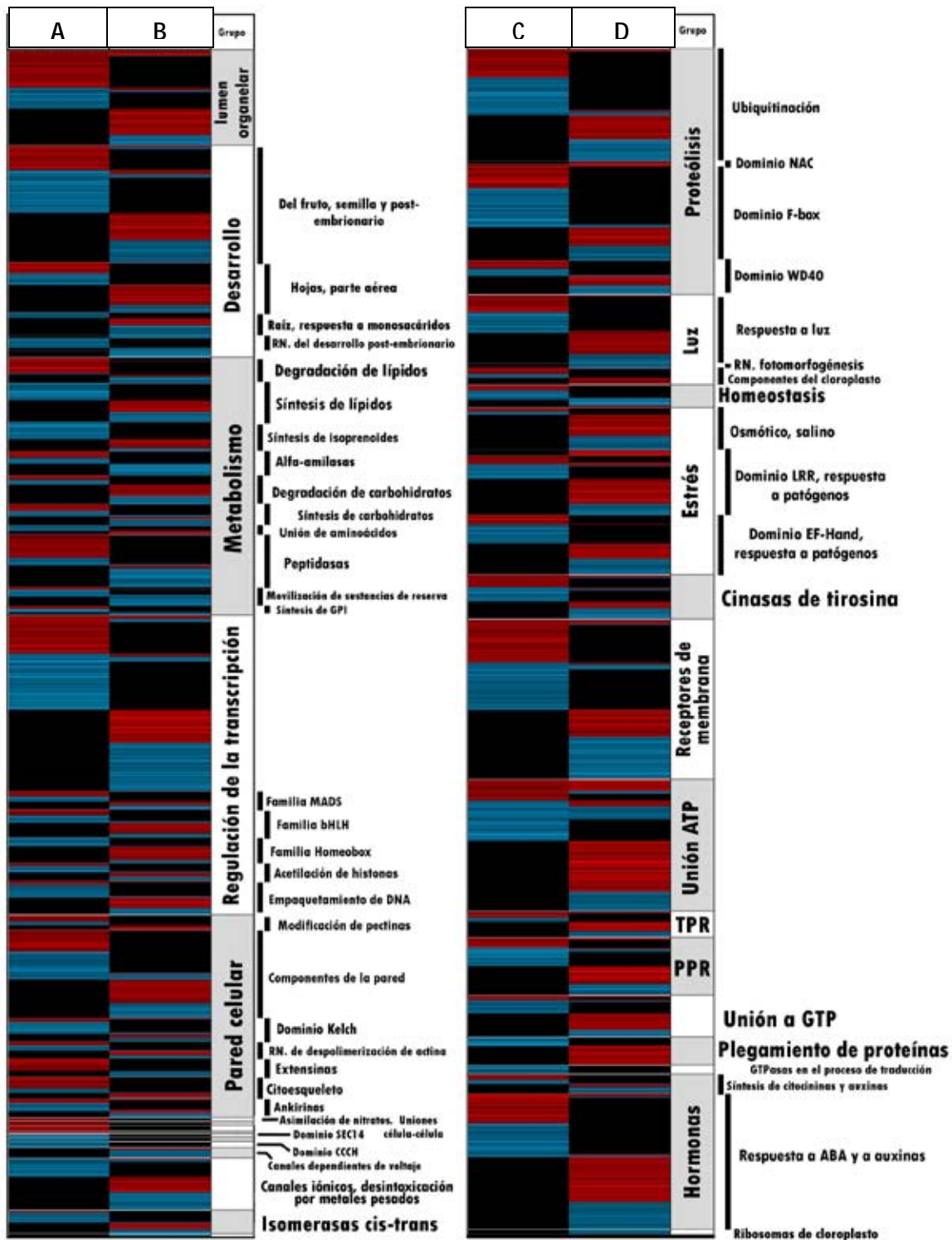


Figura 12. Mapa de calor del cambio en la expresión génica de las semillas de *C. aesculifolia* en respuesta al acondicionamiento mátrico. Se muestran los clusters funcionales descritos en el Cuadro 5. A y C: semillas con respuesta favorable al tratamiento; B y D: semillas sin respuesta al acondicionamiento. Genes en rojo: aumento de la expresión; genes en azul: disminución de la expresión. Las áreas en negro corresponden a la ausencia de transcritos en el microarreglo de las semillas con respuesta favorable al acondicionamiento, pero que sí fueron detectados en las semillas sin respuesta favorable al acondicionamiento y viceversa. Barras verticales negras delimitan los grupos de genes que corresponden a cada cluster funcional. RN: regulación negativa.

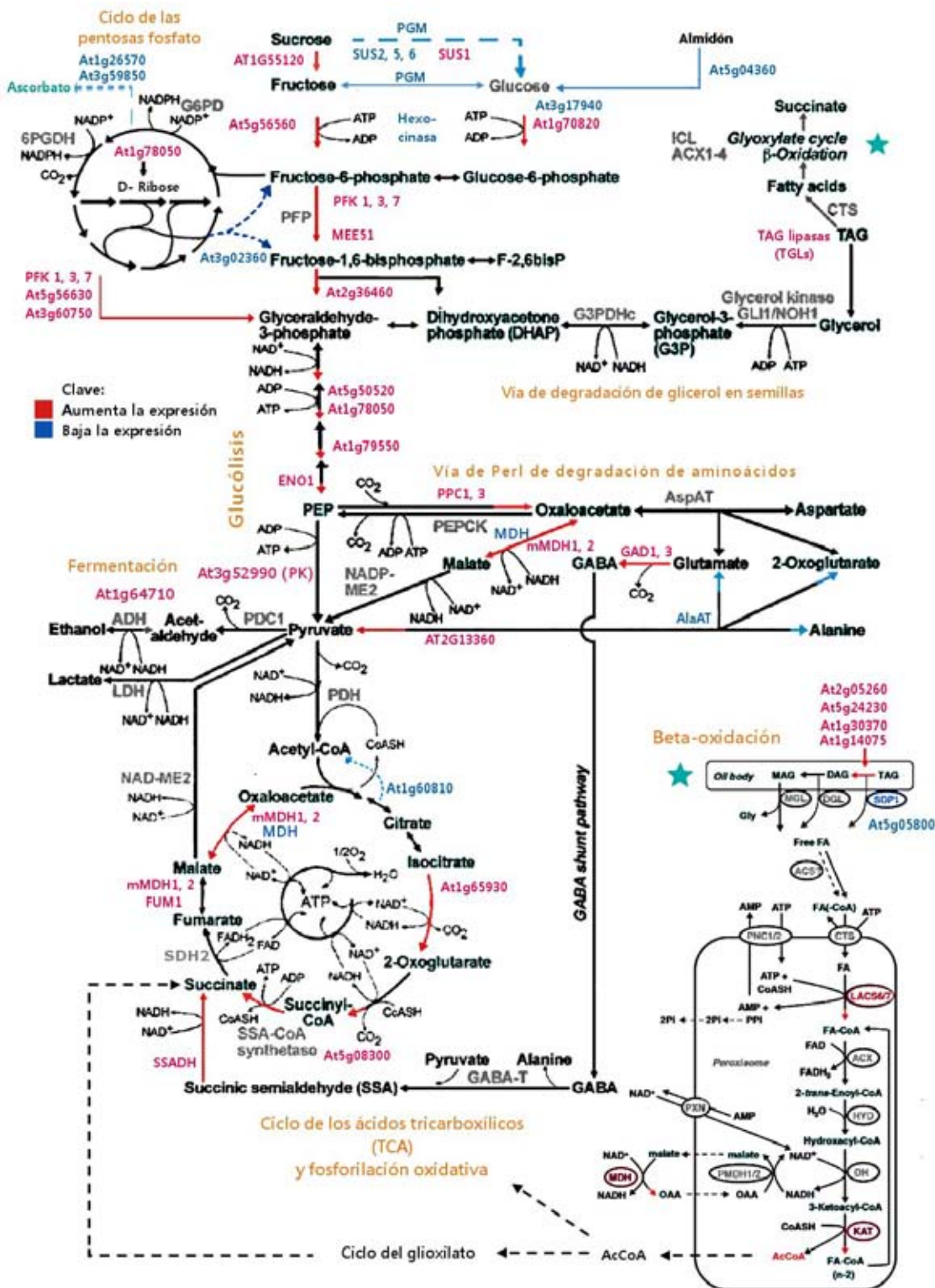


Figura 13. Vías principales del metabolismo primario en semillas durante el proceso de germinación, en semillas con respuesta positiva al acondicionamiento matricio (modificado de Weitbrech *et al.*, 2011 y Theodoulou y Eastmond, 2012). Los genes y flechas en rojo indican aumento en la expresión mientras que los genes y flechas en azul indican disminución en la expresión, como consecuencia del acondicionamiento matricio. La estrella en color verde indica el punto de conexión entre la vía de degradación del glicerol y la beta-oxidación.

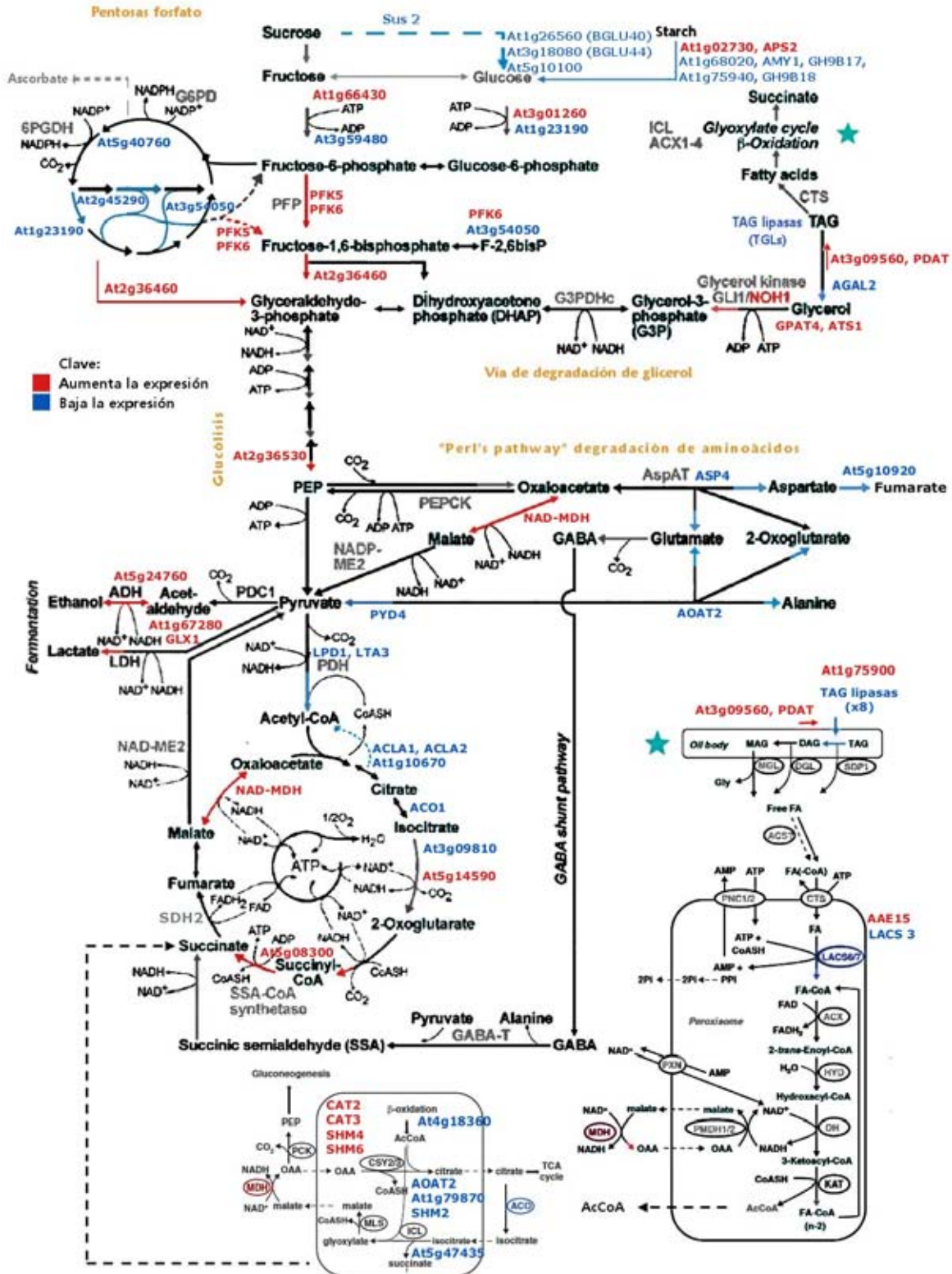


Figura 14. Vías principales del metabolismo primario en semillas durante el proceso de germinación en semillas sin respuesta positiva al acondicionamiento (modificado de Weitbrech *et al.*, 2011 y Theodoulou y Eastmond, 2012). Los genes y flechas en rojo indican aumento en la expresión mientras que los genes y flechas en azul indican disminución en la expresión, como consecuencia del acondicionamiento mátrico. La estrella en color verde indica el punto de conexión entre la vía de degradación del glicerol y la beta-oxidación.

Metabolismo de lípidos. En esta vía, los ácidos grasos de cadena larga son oxidados para liberar moléculas de Acetil-CoA, el cual puede ser utilizado como fuente de energía, ya sea directamente o al ser transformado en azúcares que se puedan transportar hacia otros tejidos. En semillas, la degradación de los ácidos grasos se lleva a cabo generalmente por medio de la β -oxidación, el ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis (Nelson y Cox, 2005). El acondicionamiento mátrico en las semillas de *C. aesculifolia* que sí respondieron al tratamiento indujo la expresión de genes clave en la vía de degradación de lípidos. En particular, se detectó un aumento en la expresión de una lipasa (*At3g14075*) que sugiere una activación en la ruptura de triacil-glicerol a ácidos grasos. El incremento en la expresión del transportador de ácidos grasos LACS6 (*At3g05970*) podría promover la entrada de ácidos grasos al peroxisoma y, finalmente, los genes propios de la β -oxidación (*At2g33150*, *At3g06860*, *At5g43280* y *At3g15020*) fomentarían la formación de acetil-CoA el cual puede ser transportado a mitocondria para entrar a TCA o enviado al glioxisoma para la formación de succinato y posteriormente favorecer la gluconeogénesis (Fig.12 y Cuadro 5; Graham, 2008; Theodoulou y Eastmond, 2012).

Las semillas que no respondieron muestran una disminución notable en los genes involucrados en el metabolismo primario, incluyendo la vía de degradación de lípidos (Figura 14 y Anexo 10). Esto es evidente en la disminución de la expresión de genes que codifican para varias lipasas (*At1g74460*, *At1g75880*, *At2g23540*, *At5g08460*, *At5g16120*, *At5g42170*, *At5g45670* y *At5g45960*) y transportadores de ácidos grasos libres hacia el peroxisoma como LACS3 y LACS7. Por otro lado, se activó un acarreador de ácidos grasos de cadena larga de cloroplasto (AAE15) y, aunque este gen se ha reportado como parte de la vía de la degradación de ácidos grasos, no forma parte de la vía demostrada de degradación en semillas (Theodoulou y Eastmond, 2012). Este acarreador podría estar dirigiendo los ácidos grasos a la formación de fosfolípidos y otros componentes de membrana del cloroplasto.

Glucólisis, gluconeogénesis y ciclo de las pentosas fosfato. El metabolismo de los azúcares está mediado por la interconexión de estas tres vías. La glucólisis y la gluconeogénesis comparten reacciones enzimáticas reversibles (Nelson y Cox, 2005). Por un lado, la glucólisis es la vía principal de catabolismo de la glucosa hacia piruvato y ATP. Por otro lado, la gluconeogénesis utiliza estas enzimas en sentido opuesto para la formación de glucosa a partir de piruvato, que pueda ser transportada posteriormente hacia otros tejidos en forma de sacarosa o ser almacenada en forma de almidón (Nelson y Cox, 2005; Bewley *et al.*, 2013). Durante el desarrollo post-germinativo, la gluconeogénesis es utilizada para formar glucosa a partir del Acetil-CoA proveniente del catabolismo de lípidos por β -oxidación y el ciclo del glioxilato (Nelson y Cox, 2005; Graham 2008). En el ciclo de las pentosas fosfato, los esqueletos carbonados de las diferentes pentosas y hexosas son interconvertidos para generar precursores de otras vías biosintéticas (por ejemplo nucleótidos y aminoácidos) o son dirigidos hacia la producción de energía vía glucólisis a

nivel de fructosa-6P y gliceraldehído-3P (Nelson y Cox, 2005). En general, de los genes que aumentaron su expresión en estas vías destacan los genes cuyos productos dirigen los carbonos principalmente hacia la formación de energía a través de la entrada a TCA (fosfofructocinasas). En las semillas que no respondieron al acondicionamiento hay menos genes que aumentaron su expresión. En particular destacan los que codifican para otras dos fosfofructocinasas, y aldolasas, las cuales dirigen la vía hacia la producción de piruvato. Pasando este punto de la vía no parece haber conexión de la glucólisis con el TCA, en cambio hay genes que aumentaron su expresión en la vía de fermentación.

En particular, en las semillas que sí respondieron al acondicionamiento mátrico aumentó la expresión de tres genes de fosfofructocinasas (*At4g29220*, *At4g26270* y *At5g56630*), que conectan bidireccionalmente la glucólisis con el ciclo de las pentosas fosfato y también aumentó la expresión de genes propios del ciclo de las pentosas como la transcetolasa (*At3g60750*), la cual cataliza la interconversión de ribulosa 5-fosfato y xilulosa 5-fosfato hacia gliceraldehído 3-fosfato, intermediario de la glucólisis. Por otro lado, se redujo la actividad de una transaldolasa (*At1g12230*) que interconvierte el gliceraldehído 3-fosfato en fructosa 6-fosfato y de una fosfoglucmutasa (*At1g70730*) que interconvierte la ribosa 5-fosfato en ribosa 1-fosfato la cual entra a la vía de síntesis de purinas y pirimidinas. En este contexto, el flujo de carbonos provenientes de estas vías parece ser dirigido en mayor proporción hacia la formación de energía y en menor medida a la utilización de los esqueletos carbonados para la formación de otros intermediarios metabólicos.

En las semillas que no respondieron al acondicionamiento aumenta la expresión de genes cuyos productos se ubican en los puntos de salida de los esqueletos carbonados hacia gliceraldehído 3-fosfato (*At2g36460*, gen compartido que también se expresó en las semillas que sí respondieron al tratamiento) y fructosa 6-bifosfato (PFK3 y PFK5). Así mismo, disminuyó la expresión de genes con funciones relacionadas a los pasos intermedios de la interconversión de las pentosas. No hubo cambios en la expresión de genes que indicaran que los esqueletos carbonados pudieran ser dirigidos a otras vías metabólicas además de la glucólisis.

Vía de Perl de degradación de GABA y otros aminoácidos. Esta vía contribuye hacia la formación de energía por medio del flujo de carbono de aminoácidos como alanina, metionina, aspartato y glutamato. Estos aminoácidos pueden entrar al TCA por medio de la degradación del ácido gama-aminobutírico (GABA) a través de su conversión a succinato, proceso en el cual intervienen glutamato descarboxilasas (*At5g17330*, *At2g02000* y *At2g02010*) y SSADH1 (*At1g79440*). Otro punto de entrada es a nivel de la conversión a piruvato, sin embargo, en este punto hay tanto genes que aumentaron como genes que disminuyeron su actividad en las semillas que sí respondieron al tratamiento. Para estas semillas no se puede establecer una direccionalidad hacia piruvato, o hacia la formación de purinas (Anexo 10, genes clasificados en metabolismo de glutamato y genes de

metabolismo de purinas). El metabolismo de aminoácidos parece dirigirse únicamente por la vía de GABA.

En las semillas que no respondieron al acondicionamiento prácticamente todos los transcritos detectados en el microarreglo pertenecientes a genes relacionados con esta vía bajaron su expresión (*At5g10920*, *At1g70580*, *At1g62800*, *At3g08860*), indicando que la direccionalidad de los esqueletos carbonados provenientes de aminoácidos no están siendo utilizados para producción de energía. Así mismo disminuyó la expresión de genes asociados con el metabolismo de otros aminoácidos, como metionina, cisteína y triptófano, los cuales están asociados con la síntesis de etileno, citocininas y de S-adenosilmetionina (Adomet).

Metabolismo de piruvato y fermentación. Solo aumentó la expresión de una oxidorreductasa (*At5g24760*) en la vía de la fermentación, en las semillas que sí respondieron al acondicionamiento. Éste parece no haber generado una condición de anaerobiosis y por lo tanto no se detectaron cambios en la expresión de los genes involucrados en esta vía metabólica (Fig. 13 y Anexo 10). En cambio, las semillas que no respondieron al tratamiento sí mostraron un aumento en la expresión de genes de la fermentación hacia piruvato (Fig. 14), sugiriendo que estas semillas experimentaron un proceso de anaerobiosis durante la hidratación.

Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). En respuesta al acondicionamiento se presentaron seis genes que aumentaron su expresión y tres genes que disminuyeron. De éstos últimos destaca el gen *At1g60810*, el cual regula el mantenimiento del acetil-CoA en el citosol en lugar de entrar a TCA, y que por tanto podría tener un efecto positivo en la activación del ciclo a pesar de bajar su expresión (Fatland *et al.*, 2002). Los otros dos genes que disminuyeron son la aconitato hidratasa 1 (*At4g35830*) y aconitasa 2 (*At4g26970*), los cuales también participan en el ciclo del glioxilato, catalizando la interconversión de citrato a isocitrato.

De los genes que aumentaron su expresión destaca la malato deshidrogenasa (*At3g15020*), la cual cataliza la interconversión de malato a oxaloacetato. Ambos compuestos también son intermediarios en otras vías metabólicas como la β -oxidación, ciclo del glioxilato, la vía de Perl y el metabolismo del piruvato. La interconversión de malato y oxaloacetato facilita la movilidad entre vías, ya que por un lado se puede formar oxaloacetato a partir de fosfoenolpiruvato (por acción de PPC1 y PPC3, Anexo 10) y luego a malato, el cual puede ser almacenado en vacuola o transportado a mitocondria para mantener activo al TCA y producir energía (Nelson y Cox, 2005; Taiz y Zeiger, 2002).

5.3. Aislamiento y clonación de genes de *C. aesculifolia* a partir de DNA y cDNA.

Se obtuvieron las secuencias de cDNA específicas de *C. aesculifolia* para cuatro genes, los cuales se enlistan a continuación. En la descripción de cada secuencia se muestra el porcentaje de identidad con la secuencia de *A. thaliana* y en la Figura 15 se muestra el agrupamiento de la secuencia de *C. aesculifolia* con otras secuencias de *G. hirsutum* y *T. cacao*, especies de la misma familia que *C. aesculifolia* (Malvaceae), disponibles en la base de datos del NCBI.

- **Fosfofructocinasa 7 (*At5g56630*).**

Longitud de la banda obtenida (cDNA): ~550pb.

Identidad con respecto a *At5g56630*: 386/482(80%), Espacios: 4/482 (580 nucleótidos secuenciados).

Secuencia nucleotídica:

```
CTGGGCCGCGTCAAAGGTGTATTTTGAATCAGATGAAGTGCATGCCTGCATTGTAAC
ATGTGGTGGTCTATGCCCGGGCTCAACACAGTGATCAGGGAAATCGTGTGTGGCCTT
TATCACATGTACGATGTCAGTAAAATTCCTTGAATAGATGGAGGATACAGAGGTTTTT
ATGCCAAGAACAATCACCTTAACACCTAAAGTTGTTGATGATATCCATAAACGCGG
TGGTACAGTCCTTGGGACATCAAGAGGGGGTCATGACACCTCAAAGATTGTGGATAGC
ATTCAGGATCGTGGAATCAATCAGGTGTATATAATTGGTGGTGGTGGGACACAAAGAG
GAGCAGCAGTGATTTTTGAGGAAATTAGAAGACGTGGCCTCAAGGTAGCTGTTGTTGG
AATCCCCAAAACCATTGACAATGACATTCCGGTTATTGACAAATCATTTGGTTTTGAC
ACAGCGGTAGAAGAAG
```

Traducción a proteína:

Identidad: 142/160(89%), Equivalencias: 151/160(94%), Espacios: 0/160

<i>Ceiba</i>	77	SGPRQKVYFESDEVHACIVTCGGLCPGLNTVIREIVCGLYHMYDVSKILGIDGGYRGFYA	256
		+GPRQKVYFESDEVHACIVTCGGLCPGLNTVIRE+V L +MY V +ILGIDGGYRGFYA	
<i>Arabidopsis</i>	624	AGPRQKVYFESDEVHACIVTCGGLCPGLNTVIREVVSSLSYMYGVKRIILGIDGGYRGFYA	803
<i>Ceiba</i>	257	KNTITLTPKVVDIHKRGGTVLGTSRGGHDTSKIVDSIQDRGINQVYIIGDGTQRGAAV	436
		KNTI L KVV+DIHKRGGT++GTSRGGHDT+KIVDSIQDRGINQVYIIGDGTQRGA+V	
<i>Arabidopsis</i>	804	KNTIPLNSKVVDIHKRGGTIIIGTSRGGHDTNKIVDSIQDRGINQVYIIGDGTQRGASV	983
<i>Ceiba</i>	437	IFEEIRRRGLKVAVVGIPKTIIDNDIPVIDKSFGFDTAVEE	556
		IFEEIRRR LKVAVVGIPKTIIDNDIPVIDKSFGFDTAVEE	
<i>Arabidopsis</i>	984	IFEEIRRRRLKVAVVGIPKTIIDNDIPVIDKSFGFDTAVEE	1103

- **Malato deshidrogenasa (*At1g04410*).**

Longitud de la banda obtenida (cDNA): ~550pb.

Identidad con respecto a *At1g04410*: 333/408(82%), Espacios: 0/408.

Secuencia nucleotídica:

GCTGCAAATTGCAAGGTTCTAGTTGTTGCTAACCCTGCCAACACCAACGCATTGATCC
TGAAGGAATTTGCACCTTCAATCCCTGCAAAGAACATTACCTGTTTGACAAGGCTGGA
TCATAACAGGGCATTAGGTCAAATCTCAGAGAGGCTAAATGTCCAAGTTTCTGATGTT
AAGAATGTGATTATTTGGGGTAATCATTCACTCAGTATCCTGATGTCAATCACG
CCACAGTTAAGACTCCATCTGGTGAAAAGCCTGTTTCGCGAGCTCGTTAAGGATGATGA
ATGGTTGAATGGAGAATTCATAACCACTGTCCAACAACGTGGTGCTGCAATCATAAAA
GCTAGGAACTCTCAAGTGCCTTTCTGCTGCTAGTGCTGCTTGTGACCACATCCGTG
AC

Traducción a proteína:

Identidad: 127/136(93%), Positivos: 132/136(97%), Espacios: 0/136. Letras en minúsculas indican tripletes alternos al triplete que codifica para ese aminoácido en la secuencia de *A. thaliana*.

<i>Ceiba</i>	28	AANCKVLVVANPANTNALILKEFAPSIPAKNITCLTRLDHNRALGQISERLNVQVSDVKN	207
		A NCKVLVVANPANTNALILKEFAPSIP KNITCLTRLDHNRALGQ+SERL+V VSDVKN	
<i>Arabidopsis</i>	122	APNCKVLVVANPANTNALILKEFAPSIPEKNITCLTRLDHNRALGQVSERLSVPVSDVKN	181
<i>Ceiba</i>	208	VIIWGNHSSTQYPDVNHATVKTPSGEKPVRELVKDEWLNGEFITTVQQRGAAIKARKL	387
		VIIWGNHSSTQYPDVNHATVKT SGEKPVRELVK+DEWLNGEFI+TVQQRGAAIKARKL	
<i>Arabidopsis</i>	182	VIIWGNHSSTQYPDVNHATVKTSSEKPVRELVKDEWLNGEFISTVQQRGAAIKARKL	241
<i>Ceiba</i>	388	ssalsaasaaCDHIRD	435
		SSALSAAS+ACDHIRD	
<i>Arabidopsis</i>	242	SSALSAASSACDHIRD	257

• **Glutamato descarboxilasa 3 (GAD3, *At2g02000*).**

Longitud de la banda obtenida (cDNA): 800pb.

Identidad con respecto a *At2g02000*: 432/550(79%), Espacios: 0/550.

Secuencia nucleotídica:

CGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTAGCAATGAATCCACCACTTGCTG
CATCAACATGAATTGGAGTATCCATCCAGTTTCTTTGTTCTTTTCTAGC
AGAAGATCATTGAGAAGCTTGACATCTTCAAATTTCCCATTAAGCGTTGA
ACCCAAGATAGCAGCCACACAAATGGTGTTTTTCATCAACCATTTCCACAG
CTTTGACAGGGTCCATGACGTAGTAACCTTCCCTCAGCTTCACTTCCCTTC
AACTCCACTTCAAAGTACCTAGCAAATTTCTCCAGCAAACCTGAACATT
GGCTCCGGTGACAATGTTGGGCTTGTGTAAGGTTTGCCTTCTGCTTTAC
GCTTGTCTGCCACTTTCTTTTGAAAGCTAGGCCAGCCAACATGATTGCC
TCCGATGACCCGACGGTTCCCACCCCGACAGCTGCTTCGGAGTCCCCAAG

CGGAGCATTGAACAGATGAGCTATGATGTTACACATCGATTCTGAAGCT
 CGGTGGTGACAGGGTACTCATCCATGTCAACATAGTTCTTGTTAATGGCA
 TCCATAATGAGCTTATCACACTCAGGCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCG

Traducción a proteína:

Identidad: 162/174(93%), Positivos: 168/174(97%), Espacios: 0/174. Letras en minúsculas indican tripletes alternos al triplete que codifica para ese aminoácido en la secuencia de *A. thaliana*.

<i>Ceiba</i>	530	AINKNYVDMDEYPVTTTELQNRVCNIIAHLFNAPLGDSEAAVGVGTVGSSEAIMLAGLAFK	351
		+INKNYVDMDEYPVTTTELQNRVCN+IA LFNAPLGD EAAVGVGTVGSSEAIMLAGLAFK	
<i>Arabidopsis</i>	79	SINKNYVDMDEYPVTTTELQNRVCNMIARLFNAPLGDGEAAVGVGTVGSSEAIMLAGLAFK	138
<i>Ceiba</i>	350	RKWQNKRKAEGKPYDKPNIVTGANVQVCWEKFARYFEVELKEVKLREGYYVMDPVKAVEM	171
		R+WQNKRKA+G PYDKPNIVTGANVQVCWEKFARYFEVELKEV LRE YYVMDPVKAVEM	
<i>Arabidopsis</i>	139	RQWQNKRKAQGLPYDKPNIVTGANVQVCWEKFARYFEVELKEVNLREDYYVMDPVKAVEM	198
<i>Ceiba</i>	170	VDENTICVAAILGSTLNGEFedvkl1ndllleknkETGWDTPIHVDAASGGFIA	9
		VDENTICVAAILGSTL GEFEDVKLLNDLL+EKNK+TGWDTPIHVDAASGGFIA	
<i>Arabidopsis</i>	199	VDENTICVAAILGSTLTGFEFEDVKLLNDLLVEKNKQETGWDTPIHVDAASGGFIA	252

- **Malato deshidrogenasa 2** (mitocondrial, *At3g15020*).

Longitud de la banda obtenida (cDNA): 800pb.

Identidad con respecto a *At3g15020*: 579/732(79%), Espacios: 0/732.

Secuencia nucleotídica:

TGATATCGTTGGAACCTCCCGGTGTTGCTGCTGATGTCAGCCACATCAACACTAGATCT
 GAGGTTGCTGGATATGTTGGTGAAGAGCAATTGGGGCAAGCTTTGGAGGGATCTGATG
 TTGTCATCATTCTGCTGGGGTGCCAAGAAAGCCTGGTATGACTCGTGATGATCTTTT
 CAACATCAATGCTGGAATTGTCAAAGGTTTATGTGCTGCTATTGCTAAGTATTGCCCC
 AATGCACTTGTTAATATGATCAGCAACCCTGTCAATTCAACCGTTCCAATTGCTGCTG
 AGGTTTTCAAGAAGGCTGGGACATATGATGACAGAAAGTTGTTTGGCGTAACTACCCT
 TGATGTGGTTAGGGCTAAGACTTTCTATGCTGGGAAGGCAAAGTAAATGTTGCAGAT
 GTTAATGTCCCAGTTGTTGGTGGTCATGCTGGAATAACTATTCTCCCACTCTTTACTC
 AAGCCACACAAAAGCCAATTTGTCTGACGAGGATATCAAGGCTCTCACAAAGCGAAC
 ACAAGATGGAGGCACTGAAGTTGTGGAAGCAAAGGCTGGAAAGGGGTCAGCAACGTTA
 TCAATGGCCTATGCCGGAGCCATTTTTGCTGATGCTTGCCTTAAGGGATTGAATGGCG
 TTCCTGATGTTGTGGAGTGTTCATTTGTGCAGTCGACTGTCCTGAACCTCCATTCTT
 TGCTTCTAAAGTAAGACTGGGCAAGAACGGAGTGGA

Traducción a proteína:

Identidad: 105/126 (93%), Positivos: 118/126(97%), Espacios: 0/126

<i>Ceiba</i>	72	FDIVGTPGVAADVSHINTRSEVAGYVGEELGQALEGSDVVIIPAGVPRKPGMTRDDLNFN	251
		+DI TPGVAADV HINTRS+V+GY+G++ LG+ALEG+D+VVIIPAGVPRKPGMTRDDLNFN	
<i>Arabidopsis</i>	252	YDIANTPGVAADVGHINTRSQVSGYMGDDDLGKALEGADLVIIPAGVPRKPGMTRDDLNFN	431
<i>Ceiba</i>	252	INAGIVKGLCAAIAKYCPNALVNMISNPVNSTVPPIAAEVFKKAGTYDDRKLFVTTLDVV	431
		INAGIVK L AIAKYCP ALVNMISNPVNSTVPPIAAE+FKKAGTYD++KLFVTTLDVV	
<i>Arabidopsis</i>	432	INAGIVKNLSIAIAKYCPQALVNMISNPVNSTVPPIAAEI FKKAGTYDEKLFVTTLDVV	611
<i>Ceiba</i>	432	RAKTFY 449	
		RA+TFY	
<i>Arabidopsis</i>	612	RARTFY 629	

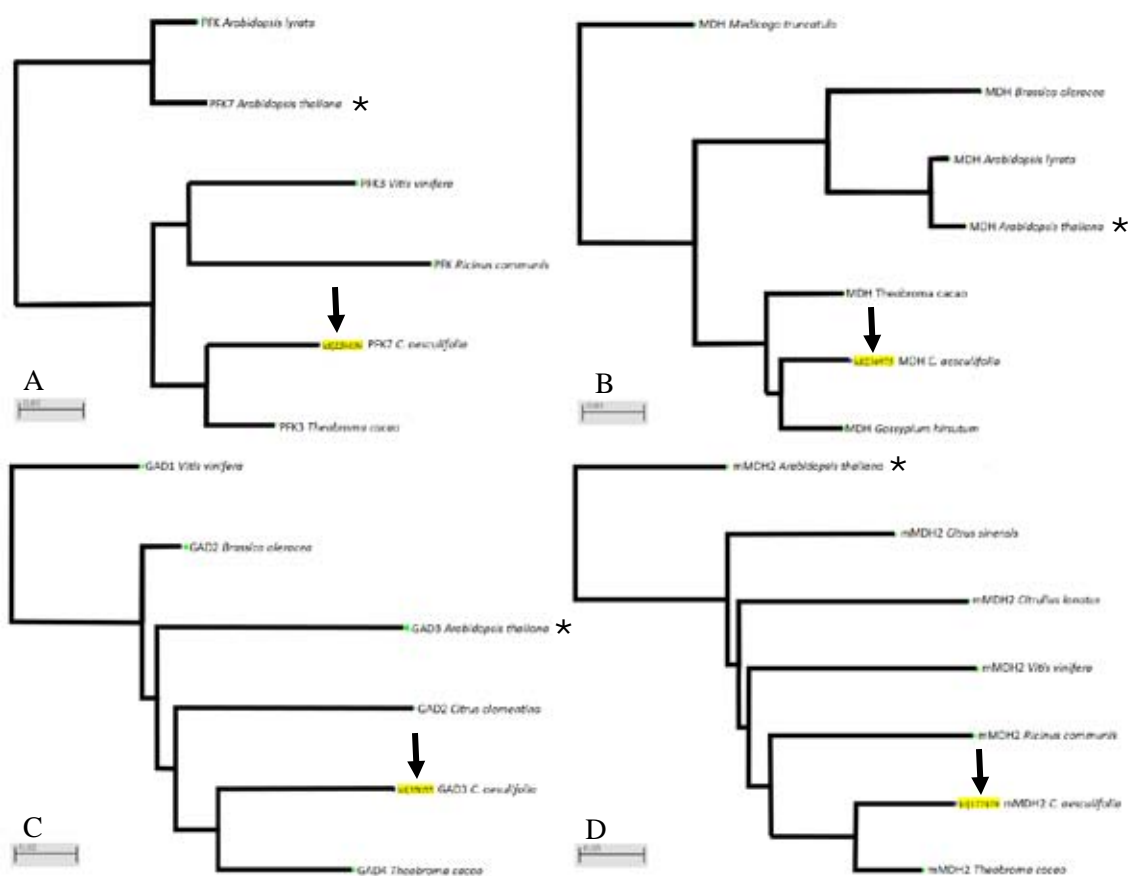


Figura 15. Agrupamiento de las secuencias de los genes de *C. aesculifolia* secuenciados para la validación del microarreglo. A) Fosfofructocinasa 7 (PFK7), B) Malato deshidrogenasa (MDH), C) Glutamato descarboxilasa 3 (GAD3) y D) Malato deshidrogenasa 2, mitocondrial (mMDH2). La flecha indica la posición de la secuencia aislada de *C. aesculifolia*, la cual está agrupada con la secuencia conocida en *T. cacao* (A, C y D) o *G. hirsutum* (B). Se indica con un * la posición de la secuencia de *A. thaliana* utilizada como referencia para el diseño de oligos degenerados.

✓ Validación del microarreglo

Se comprobó el nivel de expresión de los cuatro genes obtenidos por medio de PCR. El gen de la fosfructocinasa 7 (PFK7), así como el de la glutamato descarboxilasa (GAD3) y el de

la malato deshidrogenasa 2 mitocondrial (mMDH2) aumentaron su nivel de expresión en respuesta al acondicionamiento, mientras que el de la malato deshidrogenasa (MDH) bajó su expresión. Esto concuerda con los cambios en el nivel de transcritos detectados en el microarreglo. En la Figura 16 se muestra la presencia de la banda esperada para la PFK7, GAD3 y mMDH2 en las semillas tratadas, así como la presencia de la banda esperada para la MDH en las semillas control.

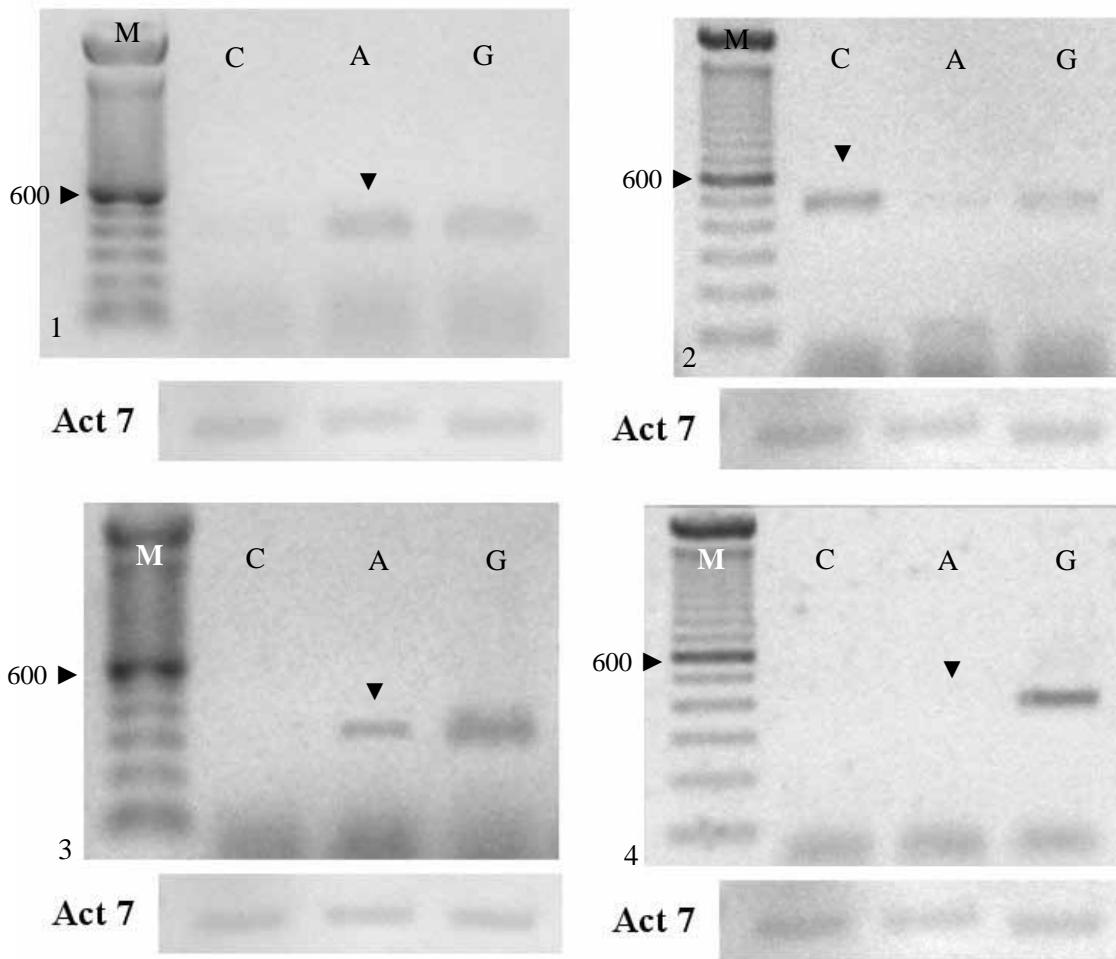


Figura 16. Validación del cambio en el nivel de expresión por PCR de punto final. 1) gen *At5g56630* (PFK7), tamaño de banda esperado: 378pb; 2) gen *At1g04410* (MDH), tamaño de banda esperado: 465pb; 3) gen *At3g15020* (mMDH2), tamaño de banda esperado: 300pb; 4) gen *At2g02000* (GAD3), tamaño de banda esperada: 380pb. M: marcador de peso molecular (100pb); C: control; A: acondicionamiento y G: control germinadas, como referencia de amplificación de la banda esperada. Act 7: expresión de actina 7 como control interno de la amplificación por PCR. Se indica con una ▼ la muestra de cDNA en la cual se esperaba la presencia de la banda.

6. DISCUSIÓN

Respuesta germinativa al acondicionamiento mátrico en las tres especies estudiadas.

Las semillas de tipo ortodoxo constituyen una etapa de pausa del ciclo de vida y de desarrollo parcial de la nueva planta, proveyendo a su vez de continuidad entre las generaciones sucesivas de las especies de plantas que utilizan a las semillas como estrategia de reproducción y dispersión (Moreira de Carvahlo y Nakagawa, 1988; Fenner y Thompson, 2005). El tiempo que las semillas pueden permanecer viables y generar plantas saludables varía dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales a las cuales se enfrenten (Bewley *et al.*, 2013). La capacidad de germinar que mostraron las semillas de *C. aesculifolia* que respondieron favorablemente al tratamiento de acondicionamiento, incluso después de tres años de haber sido almacenadas en condiciones subóptimas, podría representar una gran ventaja para la producción de plántulas útiles en programas de restauración de las zonas donde naturalmente se distribuye esta especie y que han sido perturbadas por la actividad humana. Una de las dificultades principales que impiden el desarrollo exitoso de los programas de restauración es la obtención y sobrevivencia de plántulas, dada la heterogeneidad de los lotes de semillas (Vázquez-Yanes y Batis, 1996; Landa *et al.*, 1997). Para el caso de *C. aesculifolia*, el tratamiento de acondicionamiento mátrico podría ser una alternativa viable, fácilmente reproducible en campo y de bajo costo para mejorar la capacidad germinativa de semillas tanto recién colectadas como almacenadas, tal como ha sido descrito para otras plantas silvestres (Alvarado-López, 2012; Becerra-Vázquez, 2013). Sin embargo, el período de almacenamiento en condiciones subóptimas durante el cual responden las semillas al tratamiento no puede ser estimado porque la tasa de deterioro parece ser específica para cada lote y posiblemente depende de las condiciones ambientales en las que se desarrolló el fruto (Hay y Probert, 2013).

Las diversas técnicas de acondicionamiento han sido ampliamente utilizadas para mejorar la capacidad germinativa de especies cultivadas como maíz, jitomate, betabel, frijol, entre otras (Bray, 1995; Varier *et al.*, 2010). Estos tratamientos en general tienen éxito, e incluso para varias especies se han vuelto un tratamiento rutinario antes de la siembra (Rajjou *et al.*, 2012). Para el caso de especies silvestres, no siempre se ha tenido éxito con los tratamientos de acondicionamiento debido en gran medida a la heterogeneidad de los lotes de semillas que se obtienen en cada colecta (Alvarado-López, 2012; Hay y Probert, 2013). En el presente estudio solamente *C. aesculifolia* respondió favorablemente al acondicionamiento mátrico a pesar de que las tres especies producen semillas de tipo ortodoxo (KEW, 2010) y pertenecen a estadios sucesionales tempranos en los ecosistemas que habitan. Esto sugiere que la germinación de las tres especies no responde únicamente al proceso de hidratación, sino a toda la combinación de señales ambientales que existen en cada uno de sus ecosistemas. Se requieren de estudios a profundidad con cada especie para

poder determinar los requerimientos de germinación y las estrategias de acondicionamiento adecuadas para cada una.

González-Zertuche (2005) reportó que las semillas de *B. cordata* tuvieron una respuesta diferencial a los tratamientos de acondicionamiento natural, osmótico e hídrico, dependiendo del sitio de origen de las semillas, lo cual es reflejo a su vez de la amplia variedad de microambientes en los que esta especie se puede establecer. Este polimorfismo fisiológico podría estar enmascarando la respuesta positiva al acondicionamiento de las semillas utilizadas en este estudio, independientemente de la edad del lote, ya que tanto para las semillas del 2006, 2009 y del 2012 no hubo diferencias significativas en la germinación (Fig. 11). Los resultados indican que las semillas de *B. cordata* no son un buen modelo para evaluar la revigorización de semillas por medio de tratamientos de acondicionamiento, ya que se requeriría de un análisis de los otros factores no emulados durante este estudio que pudieran estar influyendo en la germinación de las semillas de *B. cordata*.

Para el caso de las semillas silvestres de *G. hirsutum* no se tienen antecedentes de acondicionamiento, aunque sí hay reportes relacionados utilizando semillas de algodón cultivado. Los estudios en algodón domesticado indican que el acondicionamiento hídrico sí sincroniza la germinación, pero disminuye el porcentaje final de germinación (Murungu *et al.*, 2004). Sin embargo, modificando el potencial hídrico del sustrato es posible potenciar los efectos del acondicionamiento hídrico, obteniendo incluso porcentajes más altos de germinación (Murungu *et al.*, 2003). En este estudio solamente las semillas de la variedad cultivada mostraron una respuesta positiva al acondicionamiento, que podría deberse al proceso de domesticación del algodón, en el cual se pudo haber seleccionado a las semillas que presentaran este comportamiento germinativo. Se requieren de más estudios con la especie silvestre para poder tener una estrategia de acondicionamiento adecuada para la misma.

Durante el acondicionamiento natural, las semillas quedan enterradas en el suelo y son sometidas a periodos de hidratación y deshidratación generados por las lluvias esporádicas que ocurren previas al establecimiento de la temporada de lluvias (Orozco-Segovia y Sánchez-Coronado, 2009). Para las semillas de *B. cordata* y *G. hirsutum* se podría realizar un tratamiento alternativo de acondicionamiento mátrico en el laboratorio, aplicando ciclos continuos de acondicionamiento, simulando el proceso de acondicionamiento natural (González-Zertuche *et al.*, 2001; Orozco-Segovia y Sánchez-Coronado, 2009; Long *et al.*, 2010).

Lípidos de reserva y su relación con la germinación

En la semilla de *C. aesculifolia*, el contenido de lípidos corresponde aproximadamente a un 30% del peso seco, siendo los ácidos grasos linoléico y oléico los más abundantes, seguidos del palmítico. Este orden de abundancia de ácidos grasos es similar al reportado para las semillas de *A. thaliana* y *Glycine max* (Jones *et al.*, 2013). La peroxidación de lípidos de membrana y de reserva está relacionada con la pérdida de vigor durante el tiempo en almacenamiento. Uno de los síntomas principales relacionado con la peroxidación de lípidos es el retraso en la protrusión de la radícula (Bewley *et al.*, 2013). En las semillas de *C. aesculifolia* con y sin respuesta al acondicionamiento, el inicio de germinación fue semejante, alrededor del día 3, lo cual podría indicar que el estado de los lípidos de reserva no ha alcanzado un grado de peroxidación que retrase la germinación. Así mismo, la proporción de ácidos grasos en las semillas con y sin respuesta se mantuvo independientemente del lote y la edad (Fig. 9), aunque en las semillas que sí respondieron al acondicionamiento se ve una leve disminución de los tres ácidos grasos más abundantes, en comparación a su control. Esto se podría deber a la movilización de lípidos observada (Fig. 5). Los ácidos grasos insaturados son más susceptibles a la peroxidación pero el desempeño germinativo y las proporciones de ácidos grasos no parecen indicar que haya ocurrido un proceso de peroxidación de éstos que evitara su movilización en las semillas sin respuesta al acondicionamiento (Fig. 9).

Cambios en la expresión génica en respuesta al acondicionamiento mátrico.

La germinación es un proceso dinámico donde hay grupos particulares de genes que pueden cambiar su patrón de expresión de manera progresiva o transitoria (Narsai *et al.*, 2011; Weitbrecht *et al.*, 2011; Dekkers *et al.*, 2013). El recambio de transcritos es estimulado desde las primeras horas de hidratación de las semillas, incluyendo el aumento en la expresión de ciertos genes, como son los relacionados con la reparación de mitocondrias, y la disminución de otros, en particular los relacionados con la maduración de la semilla (Howell *et al.*, 2009; Narsai *et al.*, 2011). En el presente estudio se hizo el análisis del cambio en la expresión génica inducido por el acondicionamiento, durante las etapas tempranas de la germinación (fase I y parte de la fase II). Se observó que la proporción de genes que aumentaron su expresión durante el acondicionamiento fue mayor que los genes que disminuyeron tanto en semillas con respuesta positiva como en semillas sin respuesta al acondicionamiento. Tanto en semillas con y sin respuesta al acondicionamiento mátrico disminuyeron genes relacionados con la maduración de la semilla, y la expresión de genes asociados con la transcripción aumentó, en particular genes ribosomales. Ambos procesos han sido descritos previamente como procesos de regulación importantes y que ocurren en etapas tempranas de la germinación (Narsai *et al.*, 2011; Dekkers *et al.*, 2013). El cambio observado en la expresión génica en ambos lotes de semillas coincide con los procesos

reportados previamente, indicando que las semillas de ambos lotes percibieron el estímulo hídrico y se inició el proceso de germinación (Narsai *et al.*, 2011; Dekkers *et al.*, 2013).

Sin embargo, al analizar otras vías genéticas, las semillas de *C. aesculifolia* de diferente edad y con diferente respuesta al tratamiento mátrico mostraron una respuesta contrastante. Por un lado, las semillas que respondieron de manera positiva al acondicionamiento muestran un adelanto de procesos metabólicos enfocados hacia la producción de energía, principalmente por la vía aeróbica de degradación de lípidos, así como en planes de desarrollo post-germinativos que podrían favorecer el establecimiento de las nuevas plántulas. En cambio, las semillas sin respuesta al acondicionamiento presentaron solo un aumento en la expresión de la vía de fermentación y se redujo notablemente la expresión de genes relacionados con el metabolismo aeróbico y la expresión de genes de respuesta a estrés aumentó considerablemente.

En general, el metabolismo es reactivado en el proceso de germinación por medio de las enzimas que fueron almacenadas durante la maduración de la semilla (Weitbrecht *et al.*, 2011). La comparación de diversos transcriptomas y proteomas indica que muchos de los transcritos y enzimas que se presentan en grandes cantidades dentro de la semilla seca se acumularon durante el proceso de maduración (Gallardo *et al.*, 2001; Weitbrecht *et al.*, 2011; Rajjou *et al.*, 2012). En algunos casos, estos transcritos disminuyen en las primeras horas de hidratación de la semilla, sin afectar la actividad enzimática. Un incremento en la abundancia de un transcrito no necesariamente implica un aumento en la actividad enzimática de la proteína para la que codifica dicho transcrito. Por otro lado, dado que la cantidad de proteínas detectadas en los proteomas es muy limitada, no es posible establecer una comparación global con los análisis de transcriptomas (Weitbrecht *et al.*, 2011). En este sentido, los resultados obtenidos en este estudio ofrecen un vistazo general del cambio a nivel de transcritos generado por el acondicionamiento mátrico, y que sugieren la inducción de un cambio dentro de las vías genéticas en las cuales intervienen. Sin embargo, estos cambios en los niveles de transcritos no deben confundirse con un cambio en la abundancia de los productos de esos transcritos, o del aumento/disminución de la actividad biológica de los mismos. Los resultados de los microarreglos ofrecen un panorama de cambios sobre los cuales es necesario profundizar y comprobar su relevancia para la respuesta al acondicionamiento. Dicha comprobación se puede realizar por medio de ensayos como son la medición de actividad enzimática de amilasas o de modificadores de la pared celular, movilización de proteínas y carbohidratos de reserva, incremento del contenido de metabolitos intermedios de las vías metabólicas estudiadas, entre otros.

La regulación de las vías de metabolismo de lípidos de reserva en semillas es principalmente a nivel transcripcional (Graham, 2008). Las semillas acondicionadas de *C. aesculifolia* que respondieron favorablemente presentan un aumento en la expresión de la vía de movilización de lípidos que se relaciona con la disminución del contenido de lípidos

totales detectado (Fig.5). En las semillas que no respondieron y que no movilizaron lípidos, los principales genes en la vía del metabolismo de lípidos presentan una disminución en su expresión. Estos resultados sugieren que el metabolismo de lípidos de reserva es un proceso fundamental en la respuesta positiva al acondicionamiento mátrico de las semillas de *C. aesculifolia*.

Las vías de la glucólisis, TCA, fermentación y el ciclo de las pentosas fosfato también se activan a nivel transcripcional en semillas de *A. thaliana*. Sin embargo, se ha demostrado que la regulación de estas vías es una combinación compleja de la actividad de proteínas y mRNAs previamente almacenados y de la síntesis *de novo* de mRNAs y proteínas tempranamente en la germinación (Weitbrecht *et al.*, 2011). En semillas de *O. sativa* se ha observado un incremento de algunos metabolitos intermediarios de estas vías en las primeras tres horas de hidratación, que es independiente de la abundancia de los transcritos. Sin embargo, conforme avanza el proceso de germinación, la acumulación de metabolitos es precedida por un incremento en la expresión génica (Howell *et al.*, 2009). En las semillas de *C. aesculifolia* que respondieron al acondicionamiento hay un incremento notable en la expresión de estas vías metabólicas, a excepción de la vía de fermentación. Si bien el análisis del transcriptoma no es suficiente para demostrar que estas vías se activaron en estas semillas, sí es un indicador de que el acondicionamiento favoreció la acumulación de estos transcritos con antelación y que éstos estuvieran disponibles en etapas tempranas de la germinación, permitiendo a su vez que se lleven a cabo procesos celulares posteriores. En cambio, en las semillas que no respondieron al acondicionamiento disminuye notablemente el metabolismo aeróbico, y aumenta la expresión de genes de la vía de fermentación, la cual aporta menos ATP y podría ser un indicador de que las semillas experimentaron una situación de hipoxia.

Durante el proceso de germinación, las semillas están recibiendo, percibiendo e interpretando las señales ambientales de manera constante. En las etapas tempranas de la germinación, estos estímulos influyen en el éxito germinativo y el establecimiento de la nueva plántula (Narsai *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2014). La hidratación controlada a la que se someten las semillas durante el acondicionamiento mátrico es uno de estos estímulos que inicia los procesos involucrados en la germinación temprana. Al finalizar el estímulo hídrico, se impide la protrusión de la radícula, pero persiste todo el recambio transcripcional y el adelanto metabólico que se generó mientras las semillas se hidrataron. En las semillas con respuesta positiva al acondicionamiento el conjunto de categorías funcionales que aumentaron y disminuyeron su expresión sugieren un ajuste fino de las vías para encausar el flujo de metabolitos hacia la producción de energía y posteriormente la preparación para el establecimiento de la plántula. En cambio, la modificación en los niveles de transcritos observada en las semillas sin respuesta al tratamiento podría indicar que la semilla está respondiendo a una condición de estrés, que podría a su vez estar frenando los procesos que favorecen la germinación. Estas semillas mostraron un aumento

en la expresión de genes relacionados con la síntesis y señalización por ABA, uno de los principales inhibidores de la germinación y regulador de la adquisición de la tolerancia a la desecación en semillas ortodoxas. La sensibilidad a ABA juega un papel crucial en la germinación ya que permite a la semilla “comprometerse” o no hacia la germinación de acuerdo a las condiciones ambientales prevalecientes durante este proceso (Rajjou *et al.*, 2012; Maia *et al.*, 2014). Así mismo, la movilización de lípidos en el embrión de *A. thaliana* es inhibida por ABA.

Dado que la respuesta de las semillas fue contrastante a pesar de que se sometieron al mismo estímulo, se podría inferir que las vías de señalización relacionadas con la imbibición y la movilización de lípidos fueron afectadas por el deterioro durante el almacenamiento. La percepción adecuada del estímulo hídrico que lleve hacia la movilización temprana de lípidos podría ser el punto de regulación más relevante para la respuesta positiva al acondicionamiento.

Validación del cambio en la abundancia de transcritos detectados en los microarreglos.

La amplificación de secuencias a partir de DNA y utilizando oligos degenerados no permitió la obtención de secuencias que correspondieran a los genes esperados (Anexo 6). Los oligos degenerados utilizados en este estudio son una mezcla de secuencias de 20 nucleótidos, de los cuales se cambiaron hasta nueve nucleótidos para generar combinaciones que pudieran ser complementarias con el gen blanco en *C. aesculifolia* (Anexo 6). Esta estrategia generó muchos apareamientos inespecíficos, por lo tanto, no se recomienda el uso de DNA genómico como templado para la amplificación de genes de *C. aesculifolia*. En cambio, se logró la amplificación a partir de cDNA de cuatro secuencias correspondientes a los genes que codifican para la PFK7, MDH, mMDH2, y GAD3. De los 13 genes restantes, hasta el momento no se ha logrado la amplificación de fragmentos de cDNA que puedan ser utilizados para diseñar oligos específicos del gen correspondiente en *C. aesculifolia*. Para lograr la amplificación de estos genes se diseñarán oligos degenerados anidados.

La amplificación por PCR punto final fue congruente con el cambio detectado en los microarreglos para la PFK7 (aumento en la expresión en las semillas acondicionadas), la MDH (disminución en la expresión en las semillas acondicionadas) y mMDH2 (aumento en la expresión en las semillas acondicionadas; Fig. 16). No se observó amplificación de la GAD3 tanto en las semillas control como en las semillas acondicionadas, pero sí se observó una banda en las semillas germinadas (Fig. 16). Este resultado podría indicar que la detección de la GAD3 en el microarreglo fue un falso positivo. En la realización de los microarreglos se hicieron réplicas técnicas para eliminar los falsos positivos, sin embargo la técnica no está exenta de este tipo de hibridaciones no específicas (Dr. Jorge Ramírez, comunicación personal). Este resultado refuerza la importancia de validar los cambios en la

expresión con la mayor cantidad de genes posible, para asegurar que los niveles de expresión detectados corresponden con un cambio verdadero en respuesta al tratamiento de acondicionamiento. Así mismo, el valor de expresión asignado para cada gen en los microarreglos es relativo. Es necesario hacer un análisis por PCR cuantitativo para poder conocer el cambio de expresión concreto para cada gen analizado.

7. CONCLUSIONES

- Las semillas almacenadas de *C. aesculifolia* con capacidad de movilizar una fracción de los lípidos también responden de manera favorable al acondicionamiento, recuperando parte de su capacidad germinativa inicial.
- Las semillas almacenadas de *C. aesculifolia* que perdieron la capacidad de movilizar lípidos tampoco responden de manera favorable al acondicionamiento mátrico.
- La respuesta germinativa de las semillas silvestres *G. hirsutum* al acondicionamiento mátrico no fue favorable, a diferencia de la variedad cultivada, la cual presentó un porcentaje más elevado de germinación con el tratamiento.
- Las semillas de *B. cordata* no respondieron favorablemente al tratamiento de acondicionamiento mátrico de dos días, independientemente del lote o de la edad de las semillas.
- El acondicionamiento mátrico promueve la activación de programas de desarrollo post-germinativo, los cuales podrían preparar a la semilla para el establecimiento de la plántula desde antes que la semilla germine.
- El acondicionamiento mátrico reduce la expresión génica de diversos genes involucrados en procesos de maduración de la semilla, así como en vías metabólicas. La disminución de la expresión de estos genes sugiere un ajuste fino de esas vías para encausar los intermediarios metabólicos hacia la producción de energía.
- El acondicionamiento mátrico promueve la activación del metabolismo primario, en particular las vías aeróbicas, las cuales tienen un aporte energético mucho más elevado que la vía anaeróbica.
- La promoción de la capacidad germinativa, el incremento en la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de lípidos y la movilización de lípidos sugiere que estos procesos corresponden a una única vía de respuesta de las semillas de *Ceiba aesculifolia* al acondicionamiento mátrico.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Angelovici, R., G. Galili, A.R. Fernie y A. Fait. 2010. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in plant science*. 15(4): 211-218.
- Becerra-Vázquez, A.G. 2013. Efecto del acondicionamiento hídrico y natural en dos especies de la selva tropical: *Cupania glabra* Swartz y *Cymbopetalum baillonii* Fries. Tesis de maestría. Instituto de Ecología, UNAM. 127p.
- Benítez-Rodríguez, J. L. 2005. Estudio ecofisiológico de germinación y crecimiento de *Dodonaea viscosa* (L) Jacq. con fines de restauración en zonas perturbadas del valle de México. Tesis de maestría (Maestría en Ciencias Biológicas con orientación en Restauración Ecológica). Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bewley, J.D., K.J. Bradford, H.W.M. Hillhorst y H. Nonogaki. 2013. *Seeds, physiology of development, germination and dormancy*. 3^oed. Springer Science+Business Media LLC, Londres. 392p.
- Butler, L.H., F.R. Hay, R.H. Ellis, R.D. Smith y T.B. Murray. 2009. Priming and re-drying improve the survival of mature seeds of *Digitalis purpurea* during storage. *Annals of botany*. 103: 1261-1270.
- Campos, F., F. Cruz, A. Torres, M. Sánchez, J. Colmenero, C. Smith, A.A. Covarrubias y J.M. Vázquez. 2002. Expresión de genes codificantes para proteína, abundantes en embriogénesis tardía (LEA), durante el osmoacondicionamiento de semillas de maíz y frijol. *Agrociencia*. 36(4): 461-470.
- Catusse, J., J. Meinhard, C. Job, J.M. Strub, U. Fischer, E. Pestsova, P. Westhoff, A.V. Dorsselaer y D. Job. 2011. Proteomics reveal potential biomarkers of seed vigor in sugarbeet. *Proteomics*. 11: 1569-1580.
- Chaudhary, B., R. Hovav, L. Flagel, R. Mittler y J.F. Wendel. 2009. Parallel expression evolution of oxidative stress-related genes in fiber from wild and domesticated diploid and polyploidy cotton (*Gossypium*). *BMC genomics*. 10: doi:10.1186/1471-2164-10-378.
- Chee, P., X. Draye, C.X. Jiang, L. Decanini, T.A. Delmonte, R. Bredhauer, C.W. Smith y A.H. Paterson. 2005. Molecular dissection of interspecific variation between *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* (cotton) by a backcross-self approach: I. Fiber elongation. *Theoretical and applied genetics*. 111: 757-763.
- CONABIO. 2012. Sitio Oficial de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Consultado 05/05/12. <http://www.conabio.gob.mx>
- Dekkers, B.J.W., S. Pearce, R.P. van Volderen-Veldkamp, Marschall, P. Widera, J. Gilbert, H-G. Drost, G.W. Bassel, K. Müller, J.R. King, A.T.A. Wood, I. Grosse, M.

- Quint, N. Krasnogor, G. Leubner-Metzger, M.J. Holdsworth y L. Bentsink. 2013. Transcriptional dynamics of two compartments with opposing roles in *Arabidopsis* seed germination. *Plant physiology*. 163: 205-215.
- Don, R. 2006. *ISTA handbook on seedling evaluation*. 3° edición. International Seed Testing Association (ISTA). Holanda. 232pp.
 - Fait, A., R. Angelovici, H. Less, I. Ohad, E. Urbanczyk-Wochniak, A.R. Fernie y G. Galili. 2006. *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant physiology*. 142: 839–854.
 - Fatland, B.L., J. Ke, M.D. Anderson, W.I. Mentzen, L.W. Cui, C.C. Allred, J.L. Johnston, B.J. Nikolau y E.S. Wurtele. 2002. Molecular characterization of a heteromeric ATP-citrate lyase that generates cytosolic acetyl-Coenzyme A in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 130:740-756.
 - Fenner, M. y K. Thompson. 2005. *The ecology of seeds*. Cambridge University Press. 260p.
 - Gallardo, K., C. Job, S.P.C. Groot, M. Puype, H. Demol, J. Vandekerckhove y D. Job. 2001. Proteomic Analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant physiology*, 126:835–848.
 - Gamboa-deBuen A., R. Cruz-Ortega, E. Martínez-Barajas, M.E. Sánchez-Coronado, A. Orozco-Segovia. 2006. Natural priming as an important metabolic event in the history life of *Wigandia urens* (hydrophyllaceae) seed. *Physiologia plantarum*. 128: 520-530.
 - Garza-Caligaris, L.E., A.O. Avendaño-Vázquez, S. Alvarado-López, E. Zúñiga-Sánchez, A. Orozco-Segovia, R.V. Pérez-Ruíz y A. Gamboa-deBuen. 2012. *At3g08030* transcript: a molecular marker of seed ageing. *Annals of botany*. 110: 1253-1260.
 - González-Zertuche 2005. Tratamiento de endurecimiento en semillas de *Buddleja cordata* (Loganiaceae) y *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae), dos especies útiles para reforestar o restaurar áreas perturbadas. Tesis doctorado. Instituto de Ecología, UNAM. 146p.
 - González-Zertuche L, Vázquez-Yanes C, Gamboa A, Sánchez-Coronado ME, Aguilera P, Orozco-Segovia A. 2001. Natural priming of *Wigandia urens* seeds during burial: effects on germination, growth and protein expression. *Seed science research*. 11: 27-34.
 - Hartmann, H.T. y D.E. Kester. 1997. *Propagación de plantas, principios y prácticas*. 2°ed. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., México. 760p.
 - Hay F.R. y R.J. Probert. 2013. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. *Conservation physiology* 1: doi:10.1093/conphys/cot030.
 - Howell K.A., R. Narsai, A. Carroll, A. Ivanova, M. Lohse, B. Usadel, A.H. Millar y J. Whelan. 2009. Mapping metabolic and transcript temporal switches during germination in rice highlights specific transcription factors and the role of RNA instability in the germination process. *Plant physiology*. 149: 961-980.

- Jones, R., H. Ougham, H. Thomas y S. Waaland. 2013. *The molecular life of plants*. Wiley-Blackwell. 790p.
- KEW. 2010. Portal del Royal Botanical Gardens, KEW. Fecha de consulta: 13/07/13 <http://www.kew.org>
- Kimura, M. y E. Nambara. 2010. Stored and neosynthesized mRNA in *Arabidopsis* seeds: effects of cicloheximide and controlled deterioration treatment on the resumption of transcription during imbibitions. *Plant molecular biology*. 73:119-129.
- Kozłowski, T. T. 1972. *Seed biology*. Academic, Nueva York.
- Landa, R., J. Meave y J. Carabias. 1997. Environmental deterioration in rural México: an examination of the concept. *Ecological applications*. 7:316-329.
- Li Z. y Trick H. 2005. Rapid method for high-quality RNA isolation from seed endosperm containing high levels of starch. *BioTechniques*. 38:872-876.
- Maia, J., B.J.W. Dekkers, M.J. Dolle, W. Ligerink y H.W.M. Hilhorst. 2014. Abscisic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis* seeds. *New phytologist*. doi: 10.1111/nph.12785.
- Maia, J., B.J.W. Dekkers, N.J. Provart, W. Ligterink, H.W.M. Hilhorst. 2011. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. *Plos one*. 6: e29123.
- Mendoza, P. 2003. El Tepozán. *Revista Ciencias*. Universidad Nacional Autónoma de México. 70: 32-33.
- Moreira de Carvahlo, N. y J. Nakagawa. 1988. *Semillas ciencia, tecnología y producción*. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S. R. L., Uruguay. 406pp.
- Murungu F.S., C. Chiduzza, P. Nyamugafata, L. J. Clark y W. R. Whalley. 2004. Effect of onfarm seed priming on emergence, growth and yield of cotton and maize in a semiarid area of Zimbabwe. *Experimental Agriculture*. 40: 2336 doi:10.1017/S0014479703001509
- Murungu, F.S., P. Nyamugafata, C. Chiduzza, L.J. Clark y W.R. Whalley. 2003. Effects of seed priming, aggregate size and soil matric potential on emergence of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and maize (*Zea mays* L.). *Soil & tillage research*. 74: 161–168.
- Nakabayashi K., M. Okamoto, T. Koshiba, Y. Kamiya y E. Nambara. 2005. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant journal*. 41:697–709.
- Narsai, R. S.R. Law, C. Carrie, L. Xu y J. Whelan. 2011. In-depth temporal transcriptome profiling reveals a crucial developmental switch with roles for RNA processing and organelle metabolism that are essential for germination in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 157: 1342-1362.
- Nelson, D.L. y M.M. Cox. 2005. *Lehninger, principles of biochemistry* 4^{ed}. W.H. Freeman and Company. Nueva York. 1119p.

- Nicasio-Arzeta, S., M. E. Sánchez-Coronado, A. Orozco-Segovia y A. Gamboa-de Buen. 2011. Efecto del preacondicionamiento y el sustrato salino en la germinación y crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays*) raza chalqueño. *Agrociencia*. 45: 195-205.
- Niembro, A. M. Vázquez y O. Sánchez. 2010. *Árboles de Veracruz: 100 especies para la reforestación estratégica*. Xalapa, Ver. : Comisión Organizadora del Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave para la Conmemoración del Bicentenario de la Independencia Nacional y del Centenario de la Revolución Mexicana. 253pp.
- Nonogaki, H., G.W. Bassel y J.D. Bewley. 2010. Germination-still a mystery. *Plant science*. 179: 574-581.
- Olvera-Carrillo, Y. 2001. Estudio ecofisiológico de la germinación, sobrevivencia y crecimiento de *Opuntia tomentosa* S. D. en la Reserva del Pedregal de San Ángel. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 95p.
- Pennington, T. D. y J. Sarukhán. 1998. *Árboles tropicales de México, manual para la identificación de las principales especies*. 2° ed. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica. 542pp.
- Pritchard, S.L., W.L. Charlton, A. Baker y I.A. Graham. 2002. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *The plant journal*. 31:639-647.
- Rajjou, L., K. Gallardo, I. Debeaujon, L. Vandekerckhove, C. Job y D. Job. 2004. The effect of α -amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant physiology*. 134: 1598-1613.
- Rajjou, L., M. Duval, K. Gallardo, J. Catusse, J. Bally, C. Job y D. Job. 2012 Seed germination and vigor. *Annual reviews of plant biology*. 63:507-533.
- Ramírez, J., L. Chávez, J.L Santillán y S. Guzmán. 2003. Microarreglos de DNA. en: Flores O., H. Riveros, A. Sosa y E. Vázquez (eds). *Mensaje Bioquímico, Vol XXVII*. Depto Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Saranga, Y., C.X. Jiang, R.J. Wright, D. Yakir y A.H. Paterson. 2004. Genetic dissection of cotton physiological responses to arid conditions and their inter-relationships with productivity. *Plant, cell and environment*. 27: 263-277.
- Soeda, Y., M.C.J.M. Konings, O. Vorst, A.M.M.M. van Houwelingen, G.M. Stoop, C.A. Maliepaard, J. Kodde, R.J. Bino, S.P.C. Groot y H.M. van der Geest. 2005. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant physiology*. 137: 354-368.
- Taiz L. y E. Zeiger. 2002. *Plant physiology* 3°ed. Sinauer Associates, Inc. E.U.A. 690p.
- Taylor, A.G., D.E. Klein y T.H. Whitlow. 1988. SMP: solid matrix priming of seeds. *Scientia horticulturae*. 37: 1-11.
- Theodoulou, F.L. y P. Eastmond. 2012. Seed storage oil catabolism: a story of give and take. *Current opinion in plant biology*. 15:322-328.

- Varier A., A. Kuriakose Vari y M. Dadlani. 2010. The subcellular basis of seed priming. *Current science*. 99: 450-457.
- Vázquez-Yanes, C. y M.A.I. Batis. 1996. La restauración de la vegetación, árboles exóticos vs árboles nativos. *Ciencias*. 43: 16-23.
- Weitbrecht, K., K. Müller y G. Leubner-Metzger. 2011. First off the mark: early seed germination. *Journal of experimental botany*. 62: 3289–3309.
- Yacoubi, R., C. Job, M. Belghazi, W. Chaibi y D. Job. 2011. Toward characterizing seed vigor in alfalfa through proteomic analysis of germination and priming. *Journal of proteome research*. 10: 3891–3903.
- Orozco-Segovia, A. y M.E. Sánchez-Coronado. 2009. Functional diversity in sedes and its implications for ecosystem functionality and restoration ecology. (pp: 175-216). *En: Gamboa deBuen, G., Orozco-Segovia, A. y Cruz-García, F. (eds.). Functional diversity of plant reproduction. Research Signpost, Canada.*
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8): 911-917
- Mayer, A.M. 1982. *The germination of seeds*. Pergamon Press. Oxford, Reino Unido. 211p.
- Priestley, D.A. 1986. *Seed aging: Implications for seed storage and persistence in the soil*. New York: Cornell University Press.
- Bray, C.M. 1995. Biochemical processes during the osmopriming of seeds, *en: Kigel, J. y G. Galili (Eds.) Seed Development and Germination*. M. Dekker, New York, pp 767-789.
- Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *The plant cell*. 9:1055-1066.
- Graham, I.A. 2008. Seed storage oil mobilization. *Annual reviews in plant biology*. 59: 115-142.
- Oñate-Sánchez L. y Vicente-Carbajosa J. 2008. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research notes*. 1: 93.
- Alvarado-López, S. 2009. Movilización de las proteínas de reserva en respuesta al osmoacondicionamiento natural en las semillas de plantas de la reserva del pedregal. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 76p.
- Alvarado-López, S. 2012. Respuesta al acondicionamiento natural de las semillas de plantas del estado de Veracruz. Tesis maestría. Instituto de Ecología, UNAM. 64p.
- Jann, R.C. y R.D. Amen. 1977. What is germination? (pp: 7-25). *En: Khan (ed). The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. Elsevier North Holland Biomedical Press.

9. ANEXOS

Anexo 1

Técnica de Bligh y Dyer (1959) para extracción de lípidos totales

Ø Para 100mg de muestra:

- 1) Agregar 1 ml de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:2) a la muestra de tejido y 0.27 ml de H_2O , agitar vigorosamente durante 5min.
- 2) Agregar 0.0.33 ml de CHCl_3 y agitar por un minuto.
- 3) Agregar 0.3 ml de H_2O y agitar por un minuto.
- 4) Centrifugar 1 min a 2000 rpm para separar las fases.
- 5) Los lípidos se encuentra en la fase orgánica (inferior). Transferir la fase orgánica a un tubo nuevo y dejar que se evapore cualquier rastro del solvente.

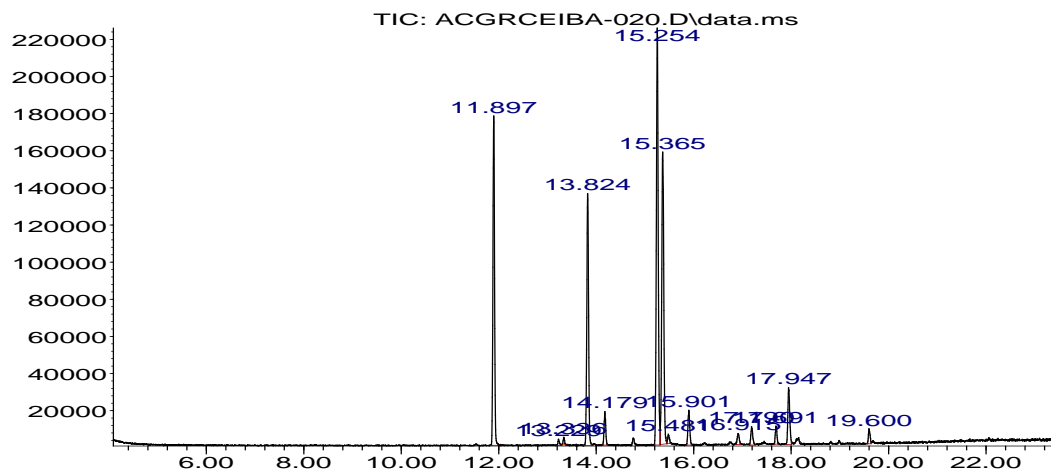
Método de Priestly (1985) para transesterificación de lípidos

- 1) Macerar semillas en mortero a 4 °C.
- 2) Pesar 20 mg de muestra y colocarlas en tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- 3) Agregar 1 ml de CHCl_3 :Metanol (2:1), mezclar y agitar en vórtex durante 5 min.
- 4) Lavar muestra con 200 μl de NaCl al 0.9% (separar fases). Centrifugar 5 min a 14,000 rpm.
- 5) Tomar una alícuota de 300 μl de la fase orgánica (fondo del tubo) y pasarla a un frasco de vidrio. Agregar 100 μl de ácido heptadecanoico ($1\mu\text{g}/\text{ml}$). Evaporar con aire comprimido.
- 6) Adicionar BF_3 al 12% (380 μl de metanol y 120 μl de BF_3). Cerrar frascos herméticamente y dejar en ebullición durante 20 min.
- 7) Dejar enfriar la muestra y agregar 500 μl de hexano y 1 ml de H_2O destilada. Tomar 2 μl de la fase en hexano para analizar por cromatografía de gas

Continuación Anexo 1: Cromatogramas de cada muestra analizada de las semillas de *C. aesculifolia* (tres réplicas por muestra):

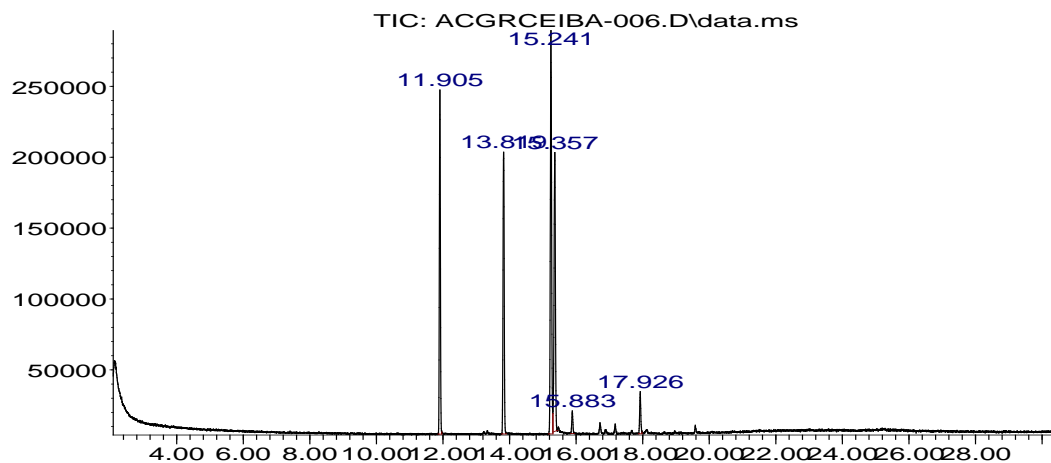
- Semillas recién colectadas

Abundance



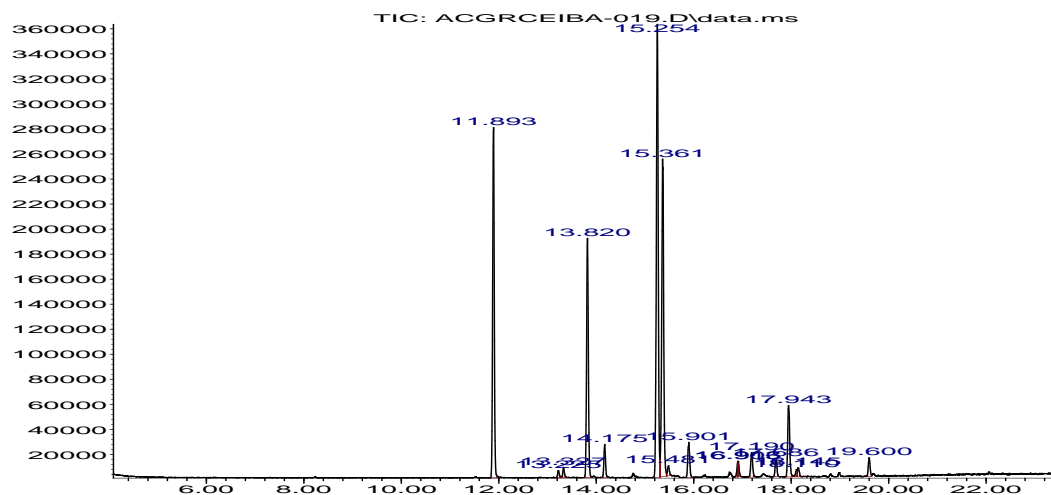
Time-->

Abundance



Time-->

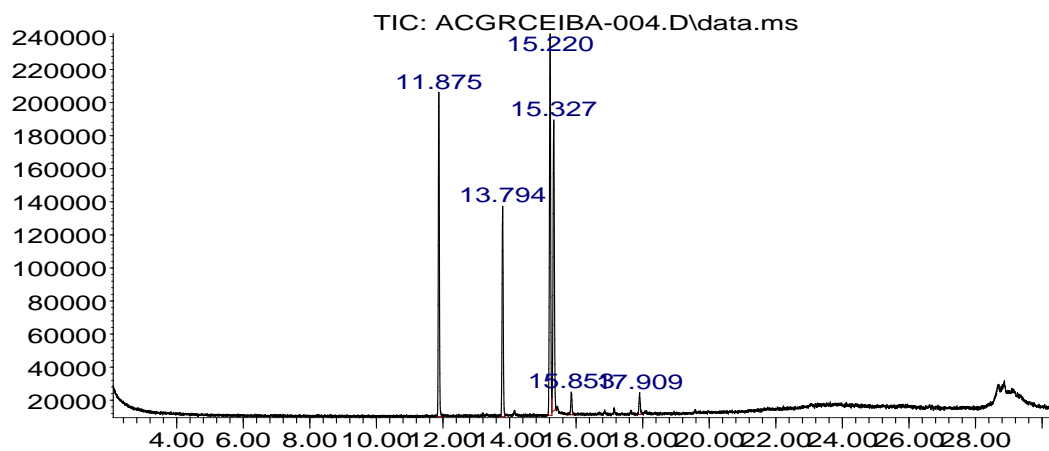
Abundance



Time-->

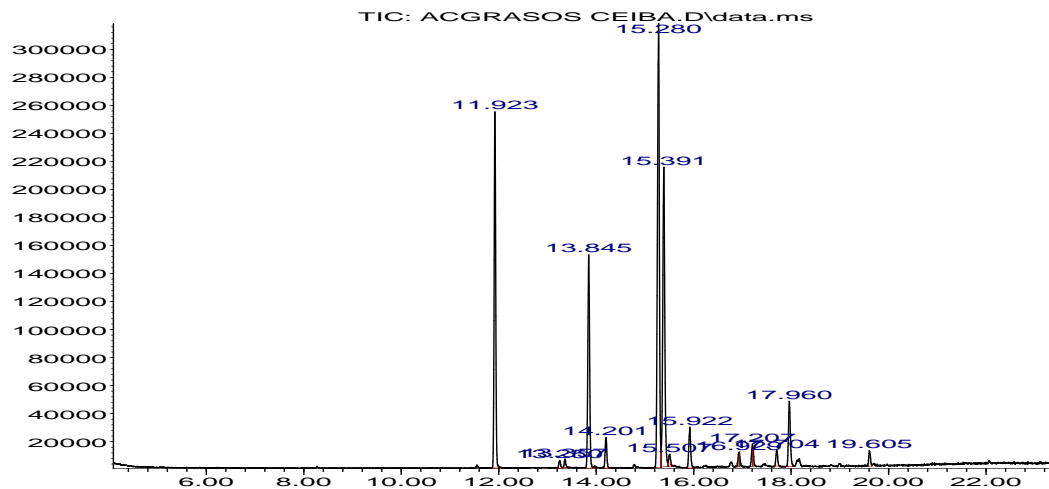
- Semillas de *C. aesculifolia* con respuesta positiva al acondicionamiento (Control)

Abundance



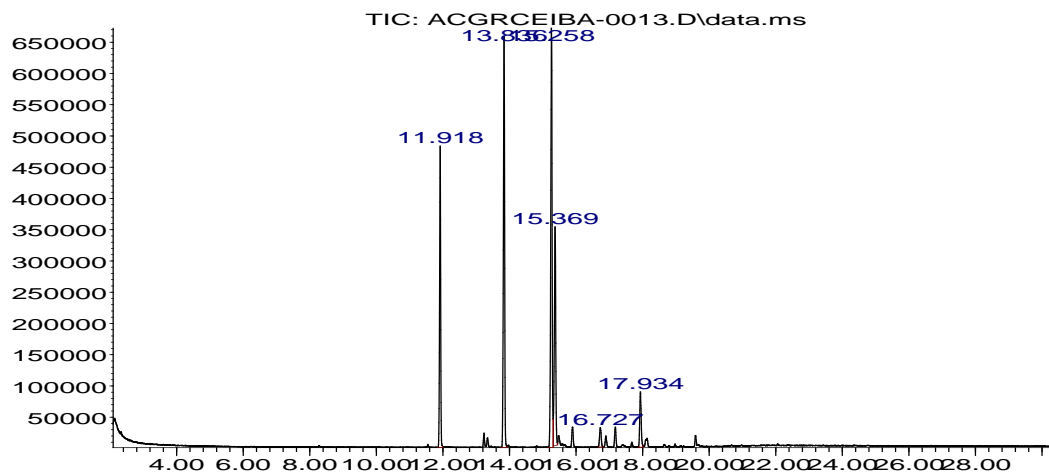
Time-->

Abundance



Time-->

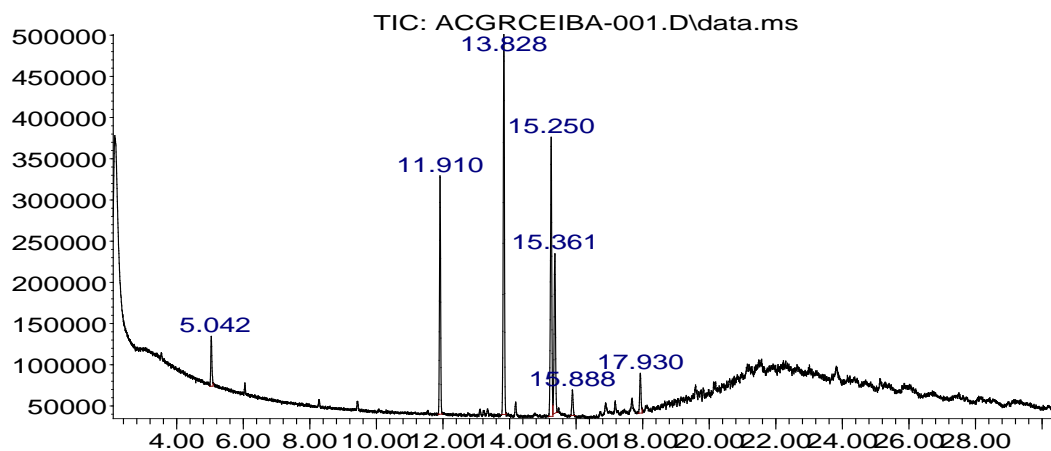
Abundance



Time-->

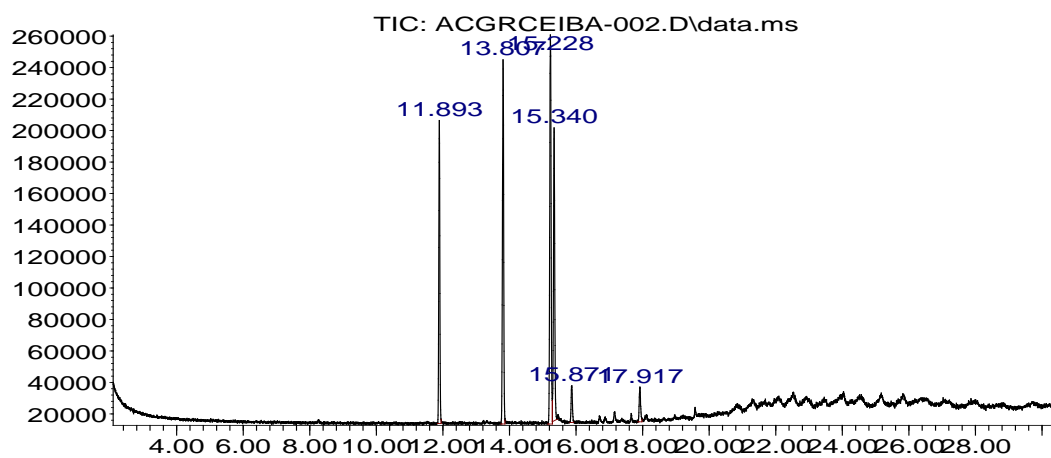
- Semillas de *C. aesculifolia* con respuesta positiva al acondicionamiento (Acondicionamiento).

Abundance



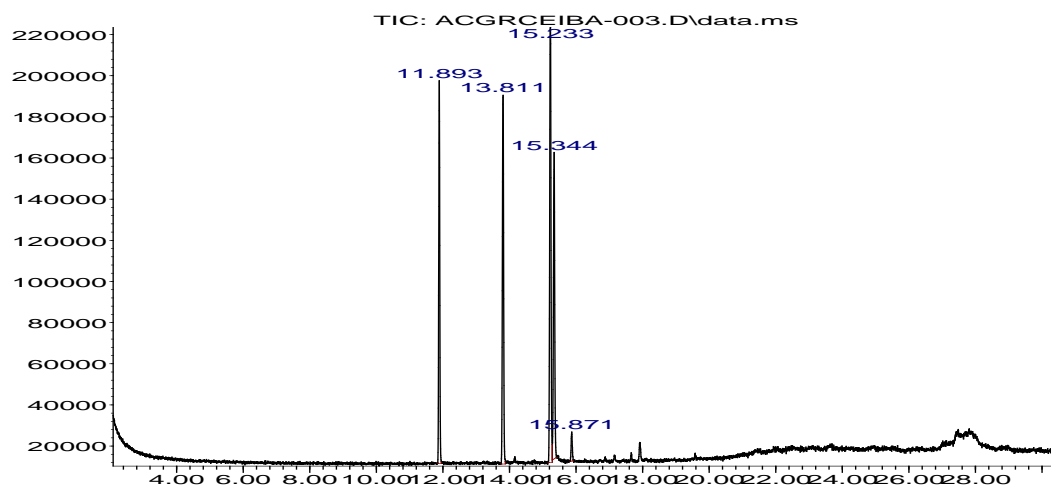
Time-->

Abundance



Time-->

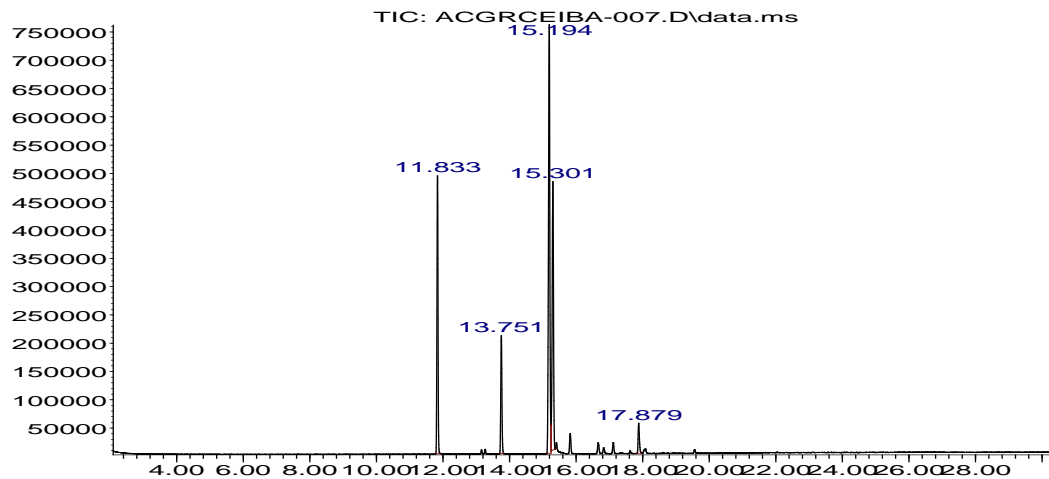
Abundance



Time-->

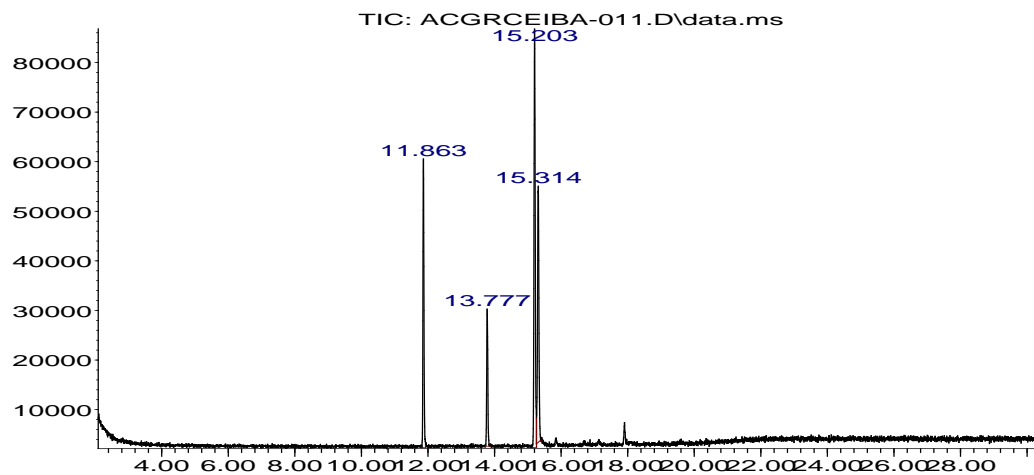
- Semillas de *C. aesculifolia* sin respuesta al acondicionamiento (Control).

Abundance



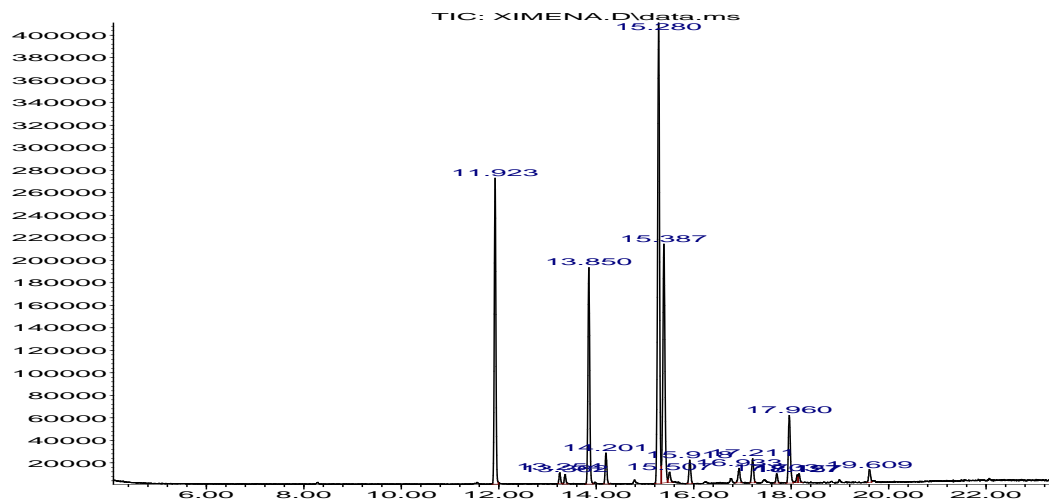
Time-->

Abundance



Time-->

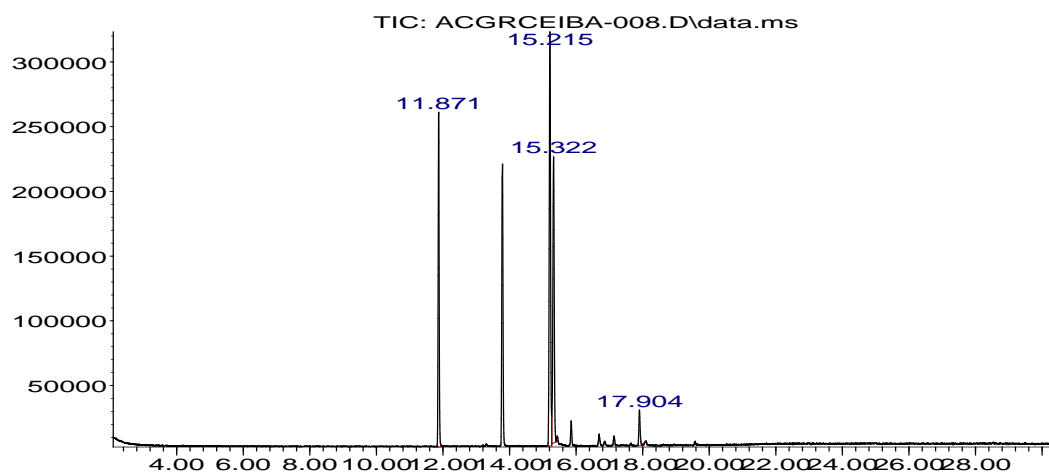
Abundance



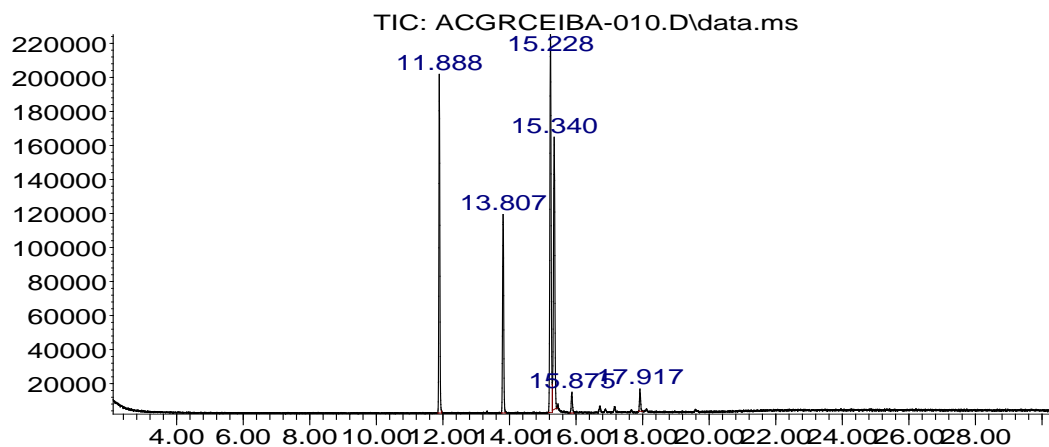
Time-->

- Semillas de *C. aesculifolia* sin respuesta al acondicionamiento (Acondicionamiento).

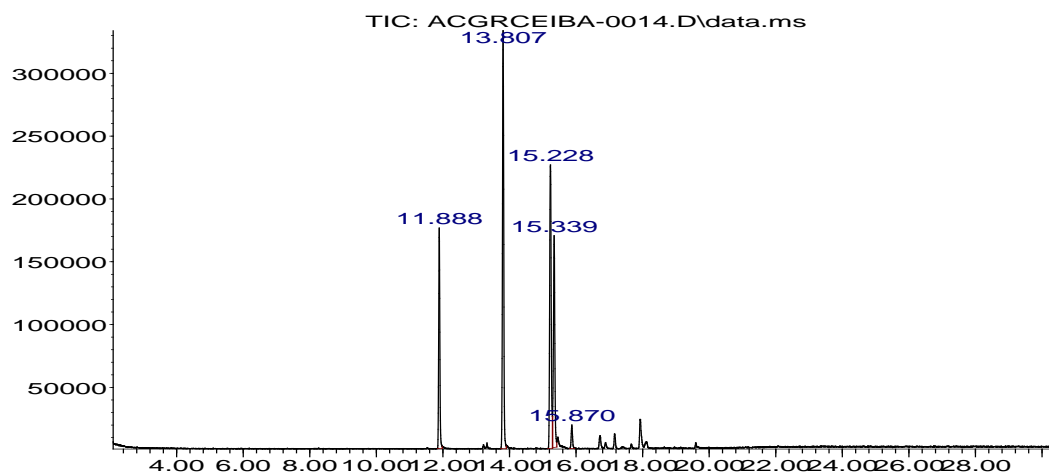
Abundance



Time-->
Abundance



Time-->
Abundance



Time-->

Anexo 2

Parámetros utilizados en el ajuste de los datos de germinación a la curva sigmoide con función $y=a/(1+b^{-cx})$.

$$Y= A0/(1+A1*(exp(-A2+X)))$$

Donde:

A0 mínimo: -1E+25, empieza en Ymax, máximo 1E+25

A1 mínimo: -1E+25, empieza en 392633, máximo 1E+25

A2 mínimo: -1E+25, empieza en 0.604444, máximo 1E+25

Anexo 3

Protocolo de extracción de RNA a partir de semillas (modificado de Li y Trick, 2005)

Buffer 1 100 mM Tris pH 8.0
150 mM LiCl, 50 mM EDTA
1.5% Dodecil sulfato de sodio (SDS)
1.5% 2-mercapto-etanol

Buffer 2 0.91 M citrato de sodio
2.4 M acetato de sodio
10% Laurylsarcosine
pH 4.0-5.0

1. Macerar la muestra en mortero con nitrógeno líquido y transferir a un tubo de 1.5 ml (libre de RNAsas) para microcentrífuga. La cantidad de polvo no debe rebasar la marca de 250 μ l.
2. Agregar 400 μ l de buffer 1 y mezclar perfectamente con una punta de micropipeta o por vórtex.
3. Agregar 250 μ l de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) pH 8.0; mezclar por inversión y centrifugar a 11,700 rpm durante 15 min a 4°C.
4. Transferir con cuidado la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5 ml y agregar 250 μ l de buffer 2; mezclar por inversión e incubar 10 min a temperatura ambiente.
5. Agregar 1ml de TRIZOL, mezclar por inversión e incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Centrifugar la muestra a 11,700 rpm 15 min a 4°C.
6. Transferir la fase acuosa transparente a un tubo nuevo de 1.5 ml y agregar 1/5 del volumen de cloroformo. Centrifugar la muestra a 11,700 rpm 15 min a 4°C.
7. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 1/3 de volumen de isopropanol, mezclar por inversión y agregar 1/10 de volumen (del sobrenadante) de NaAc 3M pH 5.2. Incubar en hielo por 15 min.
8. Centrifugar la muestra a 11,700 rpm por 15 min a 4°C.
9. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con etanol al 70% .

10. Secar el pellet y resuspender en 50 μl de H_2O libre de RNAsas.
11. Almacenar el RNA a -70°C hasta su utilización.

Anexo 4

Protocolo de extracción de DNA genómico (modificado de protocolo para maíz)

Buffer de extracción:

20 ml Tris-HCl 1M, pH 7.5

5 ml NaCl 5M

5 ml EDTA 0.5M, pH 8.0

5 ml SDS 10%

65 ml H_2O di-destilada

Recomendación: utilizar hojas jóvenes ya que éstas tienen un contenido de carbohidratos más bajos que las hojas maduras.

1. Cortar y congelar (inmediatamente) en nitrógeno líquido 100 mg de material en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Triturar tejido con pistilo rápidamente. Evitar que se descongele.
3. Sin sacar el pistilo del tubo, agregar 500 μl de buffer de extracción. Esperar a que se descongele la muestra con el buffer para retirar el pistilo.
4. Agregar 500 μl de fenol-cloroformo isoamil alcohol y mezclar por inversión. Centrifugar 10 min a 13,000 rpm a 4°C .
5. Repetir el paso 4 para eliminar la mayor cantidad de carbohidratos.
6. Transferir sobrenadante a un tubo nuevo. Agregar 1/10 de acetato de sodio 3M.
7. Agregar 350 μl de isopropanol frío, mezclar por inversión. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar 10 min a 13,000 rpm a 4°C . Descartar sobrenadante.
9. Lavar pellet con 150 μl de EtOH 70%, centrifugar 5 min a 13,000 rpm a 4°C . Repetir este paso.
10. Dejar secar y resuspender en H_2O libre de nucleasas. Se recomienda hacer alícuotas para evitar descongelar la muestra continuamente.

Anexo 5

Protocolo para cDNA por medio de Superscript II Reverse Transcriptase

Mezcla inicial:

- 1 μl de Oligo dt [500 $\mu\text{g}/\text{ml}$]
- 1 μl de RNA [100-1000 ng]
- 1 μl dNTPs
- 9 μl de H_2O para completar 12 μl

- Incubar mezcla inicial a 65°C por 5 min. Pasar a hielo.
- Agregar:
 - 4 µl buffer 5x first strand
 - 2 µl de DTT 0.1M
 - 1 µl de RNase out (si se tiene menos de 50 ng de RNA, si no, agregar 1 µl de H₂O)
- Incubar a 42°C, 2 min (incubar a 25°C, 2 min si se usan random primers en lugar de Oligo dt).
- Agregar 1 µl de Superscript II RT y mezclar. Incubar a 42°C, 50 min.
- Calentar a 70°C, 15 min para detener la reacción.

Anexo 6

Diseño de oligos degenerados para el aislamiento de algunos de los genes relevantes del metabolismo primario.

Gen	Oligo (5' - 3')	Oligo degenerado	
<i>At2g33150</i>	Sentido	GCGCAGAATTGTCTTCTTCC	GVCARRAYTGTCTTCTYCC
	Antisentido	GACCTTGCCTTCAACTTTC	GRCCWTGYGMTTCMRSTYKC
<i>At3g05970</i>	Sentido	TACCCTCGCTTCCCTCATCA	TRCCHTCDCTTCCVBCAWCM
	Antisentido	TTTTTAGACGTCTCCCGGC	TYTTTAGRCGWCTCCMGGY
<i>At3g15020</i>	Sentido	TGATATCGCCAACACTCCCG	YGATATCGYYRRMACHCCCG
	Antisentido	CCACTCCGTTCTTTCCAGT	CCACTCCGTTCTTDCCCAGT
<i>At4g26970</i>	Sentido	GGATTCGAAATTGTCGGCTA	GGATTYSAWATTGTYGGCTA
	Antisentido	CGGAATGTGAACAGTGTGG	YGGAATGTGAAYWGTSTTKG
<i>At1g60810</i>	Sentido	GGAGGAATTGACATCGAGGA	GGAGGWATTGAMATYGARGA
	Antisentido	TAGCAGCAACATCGGTGAAG	TAGCAGCAACRTCRGTRAAG
<i>At5g08300</i>	Sentido	ACCGAGCTCCGCTGAATTTT	ACYRAGCTCCGCTGAATTTT
	Antisentido	ACCCACTGCAGTTGTTTGGA	ACCRACTGCAGTTGTTTGGA
<i>At5g56630</i>	Sentido	CTGGTCCACGTCAAAAGGTT	CYGGDCCHCGTCAAAAGGTK
	Antisentido	CTTCTCCACAGCAGTGTCA	CYTCYTHACMGCWGTGTCA
<i>At1g04410</i>	Sentido	CGCTCCTAACTGCAAGGTTT	MGCTSCWAAYTGCAAGGTTY
	Antisentido	GTCACGGATGTGGTCACAAG	RTCACGGATRTGRTCACAWG

<i>AT5g48230</i>	Sentido	TTGCAGCTGCTTTGAAGAGA	TTGMAGCYGCTYTKAARAGR
	Antisentido	CTCCGCTCACTAGGACAAGG	YTCCRCTYACYARRACWAKK
<i>AT5G48230</i>	Sentido	TTGCAGCTGCTTTGAAGAGA	TTGMAGCYGCTYTKAARAGR
	Antisentido	CTCCGCTCACTAGGACAAGG	YTCCRCTYACYARRACWAKK
<i>AT1G09830</i>	Sentido	AGTTCCGGAGATGCCACTTG	ARKTCMGGAGAYGCYRCTTG
	Antisentido	GCTTGTGGTCCTGAGCAGAT	KYTTGTGGTCCTGAGCAGAT
<i>AT2G02000</i>	Sentido	GCCAGAATGTGACAAGCTCA	GCCWGARTGYGAYAAGCTYA
	Antisentido	AGCAATAAACCCACCACTCG	WGCAATRAAYCCACCACTHG
<i>AT2G05140</i>	Sentido	GGGTTTCAGACACGGATCTTC	GGGYTCWGAYWCRGATCTTC
	Antisentido	CCCAACATCCGGACTGCAAG	CCCARCATYCKKAYWGCMAG
<i>AT2G13360</i>	Sentido	CCAGGGAGACACCATCTGTT	CCAGGRASRMAYCATCTSTT
	Antisentido	CCATGCCCTTCTCACAATCT	CCAYGCCCTYYTSACRATCT
<i>AT2G16370</i>	Sentido	CTCGTTCTGGTGGGTTTGAT	CTCGTTCYGGWRGKTTTGAY
	Antisentido	CCATATCTGCTGAACGCTGA	YCATRTCHGCWGAWCGCTGR
<i>AT2G39970</i>	Sentido	AGCTGGTGGTGGGATCATTG	AGCYGGHGGYGGRATCATYG
	Antisentido	ACTGTAGCTCCGAGTTTCGC	ACTGTWGCTCCRAGTTMGC
<i>AT4G02120</i>	Sentido	CCTGATTCACGTGAGCTTGA	CCTSATTCAYGTGAGCYTKA
	Antisentido	CACCTCGTAACGGTGCCTAT	CACCTCRTAWCKRTGYCKAT
<i>AT4G38880</i>	Sentido	GGCCAAGAAGGAGCAGGAAT	GGCCARGAAGGMGCMGGRAT
	Antisentido	ATCTCACCGGGACACACTTC	AYYTCNCCBGGAYACACTTC

Clave de sustituciones de nucleótidos para la generación de los oligos degenerados.

Clave	Intercambio de bases	Clave	Intercambio de bases	Clave	Intercambio de bases
R	A, G	H	A, C, T	V	G, C, A
Y	C, T	B	G, T, C	D	G, A, T
M	A, C	S	G, C	N	A, C, G, T
K	G, T	W	A, T		

Anexo 7

Parámetros utilizados para la amplificación de secuencias por medio de PCR.

Cuadro 1. Mezcla estándar de PCR y modificaciones empleadas en caso de no obtener bandas en condiciones estándar de reacción.

Mezcla de PCR	Cantidades estándar	Cantidades modificadas
Buffer de PCR 10x sin Mg	5 µl	-
Magnesio (50mM)	3 µl	6 µl
dNTPs (10nM)	0.5, 0.7 y 1 µl (tamaño del fragmento)	-
Oligos (F y R, 50 µM)	1 µl (x2)	2 µl
DNA genómico o cDNA	1 µl	-
Taq DNApol (50 u/µl)	0.25 µl	-
Agua libre de nucleasas	Δ µl para llevar a volumen final de 50 µl	-

Cuadro 2. Programa de PCR utilizado. Se seleccionó una temperatura de alineamiento más baja para favorecer el alineamiento de los oligos degenerados.

Programa	Parámetros	
Desnaturalización inicial	94°C, 5 min.	
Desnaturalización	94°C, 30 s.	
Alineación	47°C, 25 s. (DNA) 50°C, 25 s (cDNA)	35 ciclos
Extensión	72°C, 30 s. - 1 min.	
Extensión final	72°C, 5 min.	

Cuadro 3. Programa de PCR utilizado para la validación del microarreglo. Se utilizó cDNA y los oligos específicos para cada secuencia obtenida de *C. aesculifolia*.

Programa	Parámetros	
Desnaturalización inicial	94°C, 5 min.	
Desnaturalización	94°C, 30 s.	
Alineación	60°C ó 62°C 25 s.	40 ciclos
Extensión	72°C, 30 s.	
Extensión final	72°C, 5 min.	

Purificación de DNA a partir de geles de agarosa por el método de “hilo” (Siliconized glass wool, SGW):

1. Introducir el SGW en un tubo de 0.5 ml hasta que abarque una tercera parte del tubo.
2. Hacer un agujero en el tubo por la parte inferior con ayuda de una aguja de insulina.
3. Cortar la banda deseada del gel de acrilamida y colocarla en el tubo de 0.5 ml.
4. Colocar el tubo de 0.5 ml dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml y centrifugar 10 min a 6,000 rpm.
5. Agregar 1/10 de acetato de sodio 3M ($C_2H_3O_2Na$) y 2.5 volúmenes (del volumen inicial) de EtOH al 100% .
6. Incubar en hielo durante 10 min.
7. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min.
8. Quitar el sobrenadante con pippeta, con mucho cuidado de no romper o desprender el pellet.
9. Lavar con 200 μ l de EtOH 70%.
10. Centrifugar a 13,000 rpm durante 3 min.
11. Eliminar el sobrenadante y dejar secar.
12. Resuspender en 3-10 μ l de H_2O libre de nucleasas.

Ligación de fragmentos purificados de DNA en vector pGEM-T easy (Promega, 2000).

1. Preparar mezcla de ligación en un tubo de 0.5 μ l:
 - a. 5 μ l de buffer de ligación 2x.
 - b. 1 μ l de vector pGEM-T easy.
 - c. 3 μ l de DNA (inserto).
 - d. 1 μ l de ligasa pGEM-T.
2. Dejar la mezcla de ligación a 4°C toda la noche (al menos 12h).

Anexo 8

Protocolo de transformación de células competentes de *E. coli*.

- Hielo
 - Medio LB estéril
 - Placas con medio LB + ampicilina
 - Baño seco a 42°C
 - Agitador a 37°C a 200-250 rpm
1. Descongelar una alícuota de 100 μ l de células, en hielo.
 2. Agregar 1 μ l de vector de DNA en campana y mechero.
 3. Incubar en hielo durante 20 min.

4. Dar un pulso de temperatura a 42°C durante 40 seg.
5. Incubar en hielo 1 o 2 min.
6. Agregar al tubo 1 ml de medio LB e incubar de 1 a 3 horas a 37°C en agitación constante (se recomienda incubar durante 1h y media).
7. Centrifugar 10 min a 6,000 rpm.
8. Eliminar sobrenadante (decentar) hasta dejar una gota de medio LB de 100 µl. Resuspender pellet.
9. Inocular una placa de LB + ampicilina, a la cual previamente se le agregó X-Gal (40 µl) e IPTG (20 µl) en toda la superficie. Esparcir uniformemente con varilla de vidrio.

Dejar crecer las colonias a 37°C toda la noche (al menos 12 h).

- Protocolo de purificación de plásmidos por el método de lisis alcalina “boiling miniprep”
 1. Transferir 1.5ml de medio de cultivo con células transformadas a un tubo Eppendorf de 1.5ml (en presencia de mechero).
 2. Centrifugar 10 min a 6,000 rpm. Eliminar sobrenadante.
 3. Resuspender pellet en 150 µl de buffer STET (usar vórtex o punta).
 4. Añadir 1µl de lisozima (10 mg/ml), agitar e incubar durante 40 seg en agua en ebullición.
 5. Centrifugar 10 min a 12,500 rpm. Quitar pellet con un palillo limpio.
 6. Añadir 150 µl de isopropanol frío, mezclar bien e incubar 30 min a -20°C.
 7. Centrifugar 15 min a 12,500 rpm a 4°C. Eliminar sobrenadante.
 8. Lavar pellet con 100 µl de EtOH al 70%. Despegar pellet de la pared del tubo.
 9. Centrifugar 5 min a 12,500 rpm. Quitar sobrenadante y dejar secar el pellet. Resuspender en 20 µl de H₂O libre de nucleasas.
 10. Agregar 1 µl de RNAsa (10mg/ml) e incubar 30 min a 37°C.

- Purificación de plásmido con kit Spin miniprep de Qiagen

Nota: antes de empezar asegurarse que el buffer P1 contiene RNAsa y que el buffer PE contiene etanol.

1. Tomar 1.5 ml de cultivo y centrifugar a 8,000 rpm, 3min a temperatura ambiente.
2. Resuspender pellet en 250 µl de buffer P1.
3. Agregar 250 µl de buffer P2 y mezclar completamente por inversión (4-6 veces). Este paso no debe exceder los 5 min.
4. Agregar 350 µl de buffer N3 y mezclar inmediatamente por inversión (4-6 veces).

5. Centrifugar a 13,000 rpm 10 min.
6. Recuperar el sobrenadante en una columna. Centrifugar 60 s a 13,000 rpm. Eliminar líquido del tubo colector.
7. Lavar columna con 750 µl de buffer PE. Centrifugar 60 s a 13,000 rpm. Eliminar el líquido del tubo colector.
8. Centrifugar 60 s a 13,000 rpm para eliminar cualquier buffer residual.
9. Colocar la columna en un tubo de 1.5 ml, agregar 25 µl de H₂O libre de nucleasas (aplicar directamente al centro de la membrana). Dejar reposar 1 min y centrifugar 60 s a 13,000 rpm. Tomar los 25 µl del tubo y pasarlos nuevamente por la columna.

- Reacción de digestión de plásmido

Mezcla inicial para 10 reacciones:

7 µl dH₂O
 3 µl EcoR1-HF
 10 µl buffer 4

Reacción para “boiling miniprep”

5 µl plásmido
 3 µl H₂O
 2 µl mezcla inicial

Reacción para “spin miniprep”

3 µl plásmido
 5 µl H₂O
 2 µl mezcla inicial

La reacción se realiza a 37°C durante 3 horas.

Anexo 9

Oligos específicos de los genes aislados para validación del microarreglo

- PFK7 (*At5g56630*): 378pb
 - Forward - GGAAATCGTGTGTGGCCTTT Tm: 59.04 % GC: 50.00
 - Reverse - TCTACCGCTGTGTCAAACCA Tm: 59.86 %GC: 47.62
- MDH (*At1g04410*): 465pb
 - Forward - GGCTGGATCATAACAGGGCA Tm: 59.82 %GC: 55.00
 - Reverse - TGTGTGGAATTGTGAGCGGA Tm: 59.89 %GC: 50.00
- GAD3 (*At2g02000*): 380pb
 - Forward - ATGAATCCACCACTTGCTGC Tm: 58.82 %GC: 50.00
 - Reverse - GGGTCATCGGAGGCAATCAT Tm: 59.89 %GC: 55.00
- mMDH2 (*At3g15020*): 300pb.
 - Forward - ACCCTTGATGTGGTTAGGGC Tm: 59.67 %GC: 55.00
 - Reverse - AGGAACGCCATTCAATCCCT Tm: 59.37 %GC: 50.00

*At5g48230	Acetyl-CoA acetiltransferasa, citosólica 1	Glioxilato	-2.88493
At1g70580	Alanina-2-oxoglutarato aminotransferasa 2	Glioxilato/ metabolismo alanina	-1.68053
At4g35830	Aconitato hidratasa 1	Glioxilato/ TCA	-1.905456
*At4g26970	Aconitasa 2	Glioxilato/ TCA	-2.152033
*At1g60810	ATP-citrate lyase A-2	TCA	-1.734251
At1g65930	Isocitrato deshidrogenasa	TCA	1.720649
At2g47510	FUM1	TCA	3.430992
*At5g08300	Succinyl-CoA ligase	TCA	1.912685
At3g16950	Lipoamida deshidrogenasa 1 (LPD1)	TCA/ Glucólisis	-3.880072
At1g13440	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa GAPC2	Glucólisis	1.949433
At3g14940	Fosfoenolpiruvato carboxilasa 3 (PPC3)	Glucólisis	2.071141
At1g53310	Fosfoenolpiruvato carboxilasa 1 (PPC1)	Glucólisis	1.525622
At4g29130	Hexocinasa 1	Glucólisis	-1.568661
At1g74030	ENO1	Glucólisis/gluconeogénesis	2.936564
At3g50520	Fosfoglicerato mutasa	Glucólisis/gluconeogénesis	2.066843
At2g36460	Fructosa-bisfosfato aldolasa, clase I	Glucólisis/gluconeogénesis/ sintensis de sacarosa	2.320218
At4g29220	PFK1	Glucólisis/ pentosas fosfato	2.742252
At4g26270	PFK3	Glucólisis/ pentosas fosfato	1.655379
*At5g56630	PFK7	Glucólisis/ pentosas fosfato	1.662318
At1g70730	Fosfoglucomutasa (PGM)	Pentosas fosfato/ glucólisis	-1.960795
At3g60750	Transcetolasa	Pentosas fosfato	1.547706
At1g12230	Transaldolasa	Pentosas fosfato	-2.223342
At1g78050	Fosfoglicerato/bisfosfoglicerato mutasa	Pentosas fosfato	3.668263
At5g25880	NADP-ME3	Gluconeogénesis	-1.846998
At5g49190	Sacarosa sintasa 2 (SUS2)	Metabolismo de almidón	-1.733112
At2g44450	Beta glucosidasa 15	Metabolismo de almidón	-3.348278
At5g17330	Glutamato descarboxilasa (GAD1)	Degradación de glutamato/GABA	2.732423
*At2g02000	GAD3	Degradación de glutamato/GABA	2.41825
At2g02010	GAD4	Metabolismo Ala Asn Gln/GABA	2.667994
At1g79440	SSADH1	Metabolismo Ala Asn Gln/GABA	1.640012
At1g17290	AlaAT1	Metabolismo Ala Asn Gln	-2.111591
At5g12040	Omega-amidasa	Metabolismo Ala Asn Gln	-1.746064
*At2g13360	AGT Aminotransferasa	Metabolismo Ala Asn Gln/glioxilato	1.549877
At2g38400	AGT3	Metabolismo Ala Asn Gln	-2.291033
At1g70580	Alanina-2-oxoglutarato aminotransferasa 2	Metabolismo Ala Asn Gln	-1.68053
At4g34740	ASE2	Metabolismo Ala Asn Gln/ purinas	1.726508
At2g16570	Amidofosforibosiltransferasa	Metabolismo Ala Asn Gln/ purinas	-1.730545

<i>*At1g09830</i>	Glicinamida ribonucleótido sintasa	Purinas	1.609705
<i>At1g66520</i>	Metionil-tRNA formiltransferasa	Purinas	2.030581
<i>*At2g05140</i>	Fosforibosilaminoimidazol carboxilasa	Purinas	1.929214
<i>At3g21110</i>	PUR7	Purinas	1.790592
<i>At5g18860</i>	NSH3	Reciclado de adenine	-2.459861
<i>At2g35040</i>	IMP	Purinas	-2.885306
<i>At1g14240</i>	Apirasa GDA1/CD39	Pirimidinas	-2.565386
<i>*At2g16370</i>	Thimidilato sintetasa	Pirimidinas	1.577855
<i>*At4g02120</i>	CTP sintetasa	Pirimidinas	1.726383
<i>At5g26667</i>	PYR6	Interconversión de pirimidinas	2.311167
<i>At3g16150</i>	Asparaginasa	Síntesis aspartato/asparagina	-2.149206
<i>At3g26900</i>	Shikimato cinasa	Síntesis fenilalanina	-1.691957
<i>At1g07780</i>	PAI4	Síntesis Tyr, Phe y Trp	1.917323
<i>At3g54640</i>	TSA1	Síntesis Tyr, Phe y Trp	2.458844
<i>At5g14060</i>	Aspartato cinasa	Síntesis Lys. Thr. y Met.	1.758677
<i>At5g52100</i>	Dihidropicolinato reductasa 3, cloroplasto	Síntesis Lys. Thr. y Met.	2.437103
<i>At1g72810</i>	Treonina sintetasa 2	Síntesis de treonina	2.930973
<i>At4g23600</i>	Cistathionina beta-liasa	Síntesis de metionina	-1.659914
<i>At3g57050</i>	Cistathionina beta-liasa	Síntesis de metionina	-1.89073
<i>At5g24760</i>	Oxidoreductasa	Fermentación	1.962025

Cuadro 2. Genes relacionados con el metabolismo primario que cambiaron su expresión en semillas sin respuesta al acondicionamiento mátrico. A: aumento, D: disminución. *: genes seleccionados para validar los cambios en el nivel de expresión. ^: genes compartidos con las semillas que sí respondieron al tratamiento de acondicionamiento mátrico.

Gen	Nombre	Vía metabólica	Expresión
<i>At2g22480</i>	PFK 5	Glucólisis-gluconeogénesis/ Pentosas/ fructosa/ galactosa	3.21528
<i>At2g36460</i> [^]	Fructosa-bisfosfato aldolasa, clase I	Glucólisis-gluconeogénesis / Pentosas/ fructose	2.422231
<i>At4g32840</i>	PFK 6	Glucólisis-gluconeogénesis / Pentosas/ galactosa	2.016464
<i>At3g01260</i>	Tipo Aldosa-1 epimerasa	Glucólisis-gluconeogénesis	2.003802
<i>At2g36530</i>	Enolasa 2 bifuncional/ activador transcripcional	Glucólisis-gluconeogénesis / degradación de RNA	1.660524
<i>At5g24760</i>	Tipo Alcohol deshidrogenasa 6	Glucólisis-gluconeogénesis / degradación de ácidos grasos	1.537011
<i>At1g23190</i>	Fosfoglucomutasa 3	Glucólisis-gluconeogénesis / Pentosas/ galactosa/ almidón/ nucleótidos/ purinas	-1.871821
<i>At3g16950</i> [^]	Lipoamida deshidrogenasa 1 (LPD1)	Glucólisis-gluconeogénesis / TCA/ piruvato/metabolism de glicina, serina y treonina	-3.187408
<i>At3g52200</i>	Componente 1 del complejo de la piruvato deshidrogenasa LTA3	Glucólisis-gluconeogénesis / TCA/ piruvato	-2.456058

<i>At3g54050</i>	Fructosa 1-6 bifosfatasa	Glucólisis-gluconeogénesis / pentosas/ fructose	-1.508826
<i>At3g47520</i>	Malato deshidrogenasa dependiente de NAD (NAD- MDH)	TCA/ cisteína/ glioxilato/piruvato	2.353845
<i>At5g08300</i> [^]	Succinil-CoA ligasa, subunidad alfa-1	TCA	2.402829
<i>At5g14590</i>	Isocitrato deshidrogenasa	TCA/ síntesis fenilpropanoides	2.446372
<i>At1g10670</i>	ATP-citrato liasa A-1 (ACLA 1)	TCA/ alkaloides de ornitina, shikimato, purinas/ síntesis fenilpropanoides, hormonas, terpenos	-1.69979
<i>*At1g60810</i>	ATP-citrato liasa (ACLA 2)	TCA/ alkaloides de ornitina, shikimato, purinas/ síntesis fenilpropanoides, hormonas, terpenos	-1.77979
<i>At3g09810</i>	Isocitrato deshidrogenasa, subunidad catalítica 6	TCA	-1.730847
<i>At4g35830</i> [^]	Aconitato hidratasa 1	TCA/ glioxilato	-1.650057
<i>At5g24400</i>	6-Fosfoglucoactonasa	Pentosas	1.871517
<i>At2g45290</i>	Transcetolasa	Pentosas/ alkaloides de shikimato/ síntesis fenilpropanoides, hormonas	-2.19441
<i>At5g40760</i>	Glucosa 6-Fosfato deshidrogenasa 6	Pentosas/ glutatión	-1.566583
<i>At4g14070</i>	Ligasa de ácidos grasos de cadena larga (AEE15)	Degradación ácidos grasos	2.492303
<i>At1g64400</i>	Acil-CoA cadena larga sintetasa (LACS3)	Degradación ácidos grasos	-2.809832
<i>At5g27600</i>	Acil-CoA cadena larga sintetasa (LACS7)	Degradación ácidos grasos	-2.409103
<i>At1g02730</i>	Tipo celulosa sintetasa D5	Metabolismo de nucleótidos y aminoazúcares, almidón y sacarosa	1.847296
<i>At1g05610</i>	ADP-glucosa pirofosforilasa subunidad pequeña 2	Metabolismo de nucleótidos y aminoazúcares, almidón y sacarosa	1.506352
<i>At1g12780</i>	UDP-glucosa 4-epimerasa y UDP- xylosa 4-epimerasa 1 bifuncional	Metabolismo de nucleótidos y aminoazúcares, galactosa	1.935128
<i>At1g64440</i>	UDP-glucosa 4-epimerasa	Metabolismo de nucleótidos y aminoazúcares, galactosa	2.374551
<i>At1g66430</i>	Tipo pfkB carbohidrato cinasa	Metabolismo de nucleótidos y aminoazúcares, almidón y sacarosa/ fructosa	1.621038
<i>At1g17890</i>	GDP-L-fucosa sintetasa 2	Metabolismo de nucleótidos y aminoazúcares/ fructosa	-1.592158
<i>At3g54420</i>	Quitinasa clase IV	Metabolismo de nucleótidos y aminoazúcares	-2.266714
<i>At3g59480</i>	Probable Fructocinasa 4	Metabolismo de nucleótidos y aminoazúcares, almidón y sacarosa/ fructosa	-1.82632
<i>At4g16130</i>	Arabinosa cinasa 1	Metabolismo de nucleótidos y aminoazúcares	-1.717817
<i>At5g14470</i>	GHMP cinasa	Metabolismo de nucleótidos y aminoazúcares/ interconversión	-2.321156

		pentosa-glucuronato	
<i>At1g20620</i> [^]	Catalasa 3 (CAT 3)	Glioxilato/ metabolismo de metano, triptófano	1.501932
<i>At1g22020</i>	Hidroximetiltransferasa 6 de serina	Glioxilato/ metabolismo de metano, triptófano, folato, glicina, serina y treonina	1.522802
<i>At4g13930</i>	Serin-hidroximetiltransferasa 4	Glioxilato/ metabolismo de metano, triptófano, folato, glicina, serina y treonina	2.189936
<i>At4g35090</i>	CAT2	Glioxilato/ metabolismo de metano, triptófano	1.516669
<i>At1g70580</i> [^]	Alanina-2-oxoglutarato aminotransferasa 2	Glioxilato/ metabolismo de alanina, glicina/ alcaloides de ornitina	-1.790743
<i>At1g79870</i>	Glioxilato/hidroxipiruvato reductasa A HPR2	Glioxilato/ metabolismo de glicina, serina y treonina	-2.054429
<i>At5g55590</i>	Pectinesterasa QRT1	Metabolismo de almidón/ interconversión pentosa-glucuronato	2.995449
<i>At1g26560</i>	Beta glucosidasa 40 (BGLU40)	Metabolismo de almidón y sacarosa	-2.189863
<i>At1g68020</i>	Alfa-trehalosa-fosfato sintetasa 6	Metabolismo de almidón y sacarosa	-1.597851
<i>At3g18080</i>	BGLU 44	Metabolismo de almidón y sacarosa	-1.621809
<i>At3g59480</i>	Probable fructocinasa 4	Metabolismo de almidón y sacarosa	-1.82632
<i>At3g59850</i>	Tipo pectinliasa	Metabolismo de almidón/ interconversión pentosa-glucuronato	-1.882209
<i>At4g25000</i>	Alfa-amilasa 1	Metabolismo de almidón y sacarosa	-1.83982
<i>At4g39000</i>	Glicosil-hidrolasa 9B17	Metabolismo de almidón y sacarosa	-3.20022
<i>At4g39010</i>	Glicosil-hidrolasa 9B18	Metabolismo de almidón y sacarosa	-1.559152
<i>At5g10100</i>	Probable Trehalosa-fosfato fosfatasa 1	Metabolismo de almidón y sacarosa	-1.831889
<i>At5g49180</i>	Pectinesterasa/inhibidor de pectinesterasa 58	Metabolismo de almidón/ interconversión pentosa-glucuronato	-1.82461
<i>At5g49190</i> [^]	Sacarosa sintasa 2 (SUS2)	Metabolismo de almidón y sacarosa	-1.950503
<i>At1g11840</i>	Homólogo de glioxalasa 1 GLX1	Piruvato	1.500404
<i>At1g67280</i>	Lactoilglutación liasa	Piruvato	2.748516
<i>At5g58330</i>	Lactato/malato deshidrogenasa	Piruvato	1.942938
<i>At5g20980</i>	Metionina sintetasa 3 (MS3)	Metabolismo de cisteína y metionina/ síntesis de hormonas	2.007496
<i>At1g62380</i>	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa 2 (ACO2)	Metabolismo de cisteína y metionina/ síntesis de hormonas	-1.82787
<i>At1g62800</i>	Aspartato aminotransferasa 4	Metabolismo de cisteína y metionina, fenilalanina, alanina, glutamato	-1.61304
<i>At3g23810</i>	Adenosilhomocisteinasa 2	Metabolismo de cisteína y metionina	-2.346912
<i>At3g25900</i>	Homocisteína S-metiltransferasa 1	Metabolismo de cisteína y metionina	-2.040439
<i>At4g14716</i>	Acirreductona dioxigenasa 1 (ARD1)	Metabolismo de cisteína y metionina	-2.3283
<i>At4g28410</i>	Tirosina transaminasa	Metabolismo de cisteína y metionina, fenilalanina, fenilpropanoides	-1.976469
<i>At5g36160</i>	Tirosina aminotransferasa	Metabolismo de cisteína y metionina, fenilalanina, fenilpropanoides	-2.311981

<i>At1g12000</i>	Pirofosfato-fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa subunidad beta 1	Metabolismo de fructosa y manosa	1.549611
<i>At5g20250</i>	Galactinol-sacarosa galactosiltransferasa 6	Metabolismo de galactosa	3.266438
<i>At5g08370</i>	Alfa-galactosidasa 2 (AGAL2)	Metabolismo de galactosa y glicerolípidos	-1.761515
<i>At2g22330</i>	Triptofano N-monoxigenasa 2	Metabolismo de triptofano	1.597939
<i>At5g20960</i>	Aldehído oxidasa 1	Metabolismo de triptofano	1.580763
<i>At1g51470</i>	Myrosinasa 5	Metabolismo de triptofano	-1.94503
<i>At1g74100</i>	Desulfo-glucosinolato sulfotransferasa 16	Metabolismo de triptofano	-1.709186
<i>At1g63660</i>	GMP sintetasa / glutamine aminotransferasa	Metabolismo de purinas	1.503109
<i>At2g15400</i>	DNA-dirigida RNA pol II subunidad RPB3-B	Metabolismo de purinas y pirimidinas	1.516229
<i>At3g57080</i>	DNA-dirigida RNA pol V subunidad 5 ^a	Metabolismo de purinas y pirimidinas	1.70725
<i>At3g57550</i>	Guanilato cinasa	Metabolismo de purinas	1.921092
<i>At1g08260</i>	DNA pol ε subunidad A	Metabolismo de purinas y pirimidinas	-1.918609
<i>At1g61700</i>	Tipo DNA-dirigida RNA pol subunidad 10	Metabolismo de purinas y pirimidinas	-3.949806
<i>At2g26230</i>	Urato oxidasa	Metabolismo de purinas	-1.502131
<i>At2g41880</i>	Guanilato cinasa 1	Metabolismo de purinas	-1.66672
<i>At4g39940</i>	Adenosin-5'-fosfosulfato cinasa 2	Metabolismo de purinas	-1.7041
<i>At4g20320</i>	CTP sintetasa	Metabolismo de pirimidinas	2.106055
<i>At1g30820</i>	Tipo CTP sintetasa	Metabolismo de pirimidinas	-2.869326
<i>At5g10920</i>	Argininosuccinato liasa	Metabolismo de alanina, glutamate	-2.181125

Anexo 11

Germinación de semillas de *C. aesculifolia*

Semillas con respuesta positiva al acondicionamiento



Semillas sin respuesta positiva al acondicionamiento

