



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Efecto del Priming natural en la movilización de
carbohidratos en la germinación de semillas de
Dodonea viscosa: papel de las invertasas ácidas.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A:
SILVIA ARMENTA JAIME



MÉXICO

D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Dr. HOMERO HERNÁNDEZ MONTES
VOCAL	M. en C. LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMAN
SECRETARIO	Dra. SOBEIDA SANCHEZ NIETO
1er. SUPLENTE	Dra. CRISELDA MENDOZA MILLA
2do. SUPLENTE	Dr. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO 114, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, EN EL CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DE TESIS DE LA DRA. SOBEIDA SANCHEZ NIETO.

DRA. SOBEIDA SANCHEZ NIETO

SILVIA ARMENTA JAIME



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y hermanos, a quienes quiero tanto, por el apoyo, paciencia y cariño que siempre me han brindado. Gracias por enseñarme que es posible lograr lo que nos proponemos, simplemente hay que hacerlo con esfuerzo y dedicación.

A mis amigos porque han sido lo que he deseado siempre, demostrando confianza, afecto y solidaridad y sé que siempre he de contar con su apoyo. En especial quiero nombrar y mis amigas de toda la vida Dolores Adriana, Marisol, Angeles Beleguixaiba, Ana, Gaby, Rosalia y Jessy, gracias por compartir sus sueños y tiempo conmigo, han sido pieza clave en mi formación personal y profesional, siempre las tendré en mi pensamiento.

Agradezco en especial a mi asesora la Doctora Sobeida Sánchez Nieto por ser una un ejemplo a seguir y apoyarme en todo momento durante mi estancia en el laboratorio además por ser una gran amiga, quien me ha enseñado que no importa lo que deseemos hacer, siempre y cuando nos haga feliz, gracias por sus ánimos y paciencia.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio con los cuales más que amistad tenemos un lazo familiar, gracias por compartir su tiempo aprendizajes y metas; Marisol, Jorge, Aída, Alejandra y todos aquellos con los que compartí el mismo espacio, además de un partido de fútbol.

Agradezco a la UNAM, a esta institución que ha albergado a muchos estudiantes con un sólo propósito, llegar a convertirnos en los mejores, ya que únicamente de esta manera podremos retribuir a la mejor universidad de Ibero América y de la cual me siento muy orgullosa de pertenecer.



El presente trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto CONACYT 47859-Q y por la Facultad de Química de la UNAM, PAIP 6290-12.

Agradezco el apoyo económico recibido para la realización de mi tesis, por parte del programa de becas 127 "Formación básica en investigación", Facultad de Química, UNAM.

Se agradece a las Doctoras Alma Orozco Segovia y Rocío Cruz Ortega su apertura con el grupo de la Dra. Sobeida Sánchez en el proyecto, así como por la discusión y crítica al trabajo.

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

CONTENIDO

ABREVIATURAS	7
1. RESUMEN	8
2. ANTECEDENTES	9
2.1. <i>Dodonea viscosa</i>	9
2.1.1. Patrón de estructura básica.	9
2.2. La germinación de semillas	10
2.2.1. Fase I.	11
2.2.2. Fase II.	12
2.2.3. Latencia.	15
2.2.4. Movilización de reservas durante la germinación y el periodo germinativo temprano.	16
2.3. Priming	17
2.4. Invertasas	22
2.4.1. El papel de las invertasas en la fisiología de la planta.	26
2.4.2. Regulación de la Actividad de Invertasas en plantas.	27
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	30
4.1. Objetivo General	30
4.2. Objetivos particulares	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1. Material Biológico	31
5.2. Germinación	31
5.3. Cuantificación de carbohidratos solubles	32
5.3.1. Extracción de carbohidratos solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.	32
5.3.2. Cuantificación de azúcares solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.	32
5.4. Medición de la actividad de invertasas ácidas	33
5.4.1. Obtención del extracto de invertasas ácidas.	33
5.4.2. Determinación de proteína.	34
5.4.3. Determinación de actividad de las invertasas ácidas.	34
5.5. Cuantificación de Lípidos	35
5.6. Análisis estadístico	36

6. RESULTADOS	37
6.1. Perfil de germinación de semillas de <i>Dodonea viscosa</i> (L.) sometidas a dos tratamientos de priming natural	37
6.2. Efecto del priming natural en el contenido de carbohidratos solubles, almidón y lípidos en las semillas de <i>Dodonea viscosa</i>	38
6.3. Efecto del priming natural en el perfil del contenido de carbohidratos y lípidos durante la germinación de las semillas de <i>Dodonea viscosa</i>	39
6.4. Efecto del priming natural en la actividad de las Invertasas en las semillas secas y en la germinación de las semillas de <i>Dodonea viscosa</i>	43
7. DISCUSIÓN	47
7.1. Efecto del priming natural en la germinación de las semillas de <i>Dodonea viscosa</i> (L.)	47
7.2. Efecto del priming natural en la movilización de reservas de semillas de <i>Dodonea viscosa</i> (L.)	48
7.3. Efecto del priming en el catabolismo de la sacarosa	52
8. CONCLUSIONES	59
9. PERSPECTIVAS	60
10. BIBLIOGRAFIA	61



ABREVIATURAS

ABA	Ácido Abscísico
ATP	Adenosin Trifosfato
GA	Ácido Giberélico
G6PDH	Glucosa 6-P deshidrogenasa
Inv- N	Invertasa Neutra
Inv- CW	Invertasa de Pared Celular
Inv- V	Invertasa Vacuolar
NADH	Nicotidamina adenina dinucleótido reducido
NADPH	Fosfato de nicotidamina adenina dinucleótido reducido
TH	Transportador de Hexosas
TS	Transportador de Sacarosa
UDP	Uridin difosfato
UDP-Glucosa	Uridin difosfato glucosa



1. RESUMEN

El “priming” es un tratamiento de hidratación-deshidratación controlada en la semilla, que induce los procesos metabólicos propios de la germinación y favorece que una población de semillas germine antes, de manera más sincrónica, e incrementando las posibilidades de establecimiento de la plántula y la resistencia de éstas a diferentes factores de estrés. En condiciones naturales una semilla transita por al menos un evento de hidratación-deshidratación, condición que posiblemente favorezca y seleccione las especies que permanecerán en ciertos ambientes. Pocos procesos moleculares que se inducen con el priming natural se conocen y su estudio es importante, ya que ayudaría a entender las bases moleculares de la germinación de una semilla y también, cómo el priming favorece y prolonga la vida de la semilla.

En este trabajo se examinó el efecto del “priming natural” en la movilización de reservas en semillas de *Dodonea viscosa* (L.) Jacq., planta considerada con potencial restaurador de ecosistemas perturbados. Se analizó el perfil de algunos metabolitos de reserva durante el proceso germinativo, cuantificando el contenido de carbohidratos (sacarosa, glucosa, fructosa y almidón) y lípidos; también se examinó la actividad de las invertasas ácidas, vacuolar y de pared celular, las cuales se conoce están involucradas en atraer metabolitos hacia los tejidos demanda, es decir ayuda al reparto de carbono, por lo que también propicia los procesos de desarrollo.

Durante el proceso germinativo se observó que la sacarosa se moviliza como fuente inicial de nutrimentos, ya que decrece su contenido conforme avanza el periodo germinativo, además que este decremento es mayor y diferente al que presentan las semillas que no fueron sometidas al tratamiento de priming. Al medir la actividad de las invertasas ácidas se encontró que la invertasa vacuolar de los lotes de semillas sometidas al priming natural aumentaron en actividad a las 12h, aunque el lote de semillas claro presentó la mayor actividad, lo que indica un mayor consumo inicial de la sacarosa almacenada en la vacuola. Por otra parte, la invertasa de la pared celular presentó la mayor actividad a partir de las 24h y continuó aumentando conforme avanzó el tiempo de germinación, aunque en este caso el mayor aumento lo presentó el lote de semillas bosque, sugiriendo que la sacarosa que está hidrolizando proviene de una fuente externa al embrión de la semilla. En resumen podemos concluir que el priming natural produce una modificación en el reparto de carbono de las semillas estudiadas y que las invertasas ácidas podrían ser un factor importante en la germinación de la semilla, al aumentar la velocidad de uso de la sacarosa en la semilla.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1.- Antecedentes Históricos.

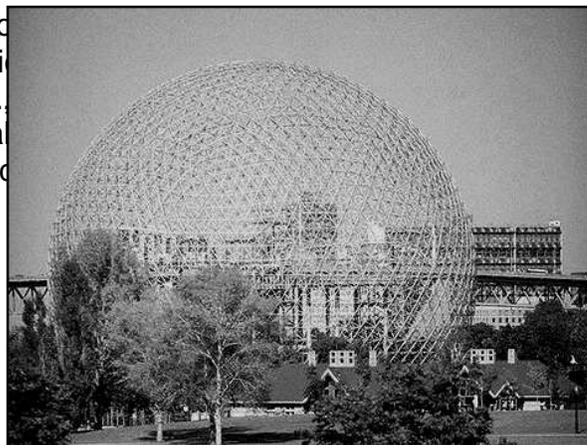
El adjetivo “geodésica” fue empleado por primera vez por Hertz, el descubridor de las ondas electromagnéticas. Einstein y Ryman emplearon el concepto matemático de geodésica como la distancia mas corta entre dos puntos sobre cualquier superficie. El inventor norteamericano R. Buckminster Fuller definió la geodésica como la relación más económica entre una pluralidad de puntos o sucesos”, refiriéndose a las estructuras cuya geometría se genera mediante la subdivisión geométrica de un poliedro, proyectando sus aristas hacia la esfera imaginaria que lo circunscribe, donde generalmente se utiliza el icosaedro, para obtener un icosaedro esférico. Las barras y los nudos mediante los cuales se articulan, conforman los dos componentes principales de estas estructuras.

La primera cúpula geodésica se construyó en 1922 por Walter Bauersfeld en la azotea de los talleres Carl Zeiss en Jena, Alemania. El partió del icosaedro subdividiendo cada una de sus aristas en 16 partes (frecuencia 16), la estructura constó de 3480 barras y se cubrió con ferrocemento, en su interior se desarrolló un planetario conocido como “la maravilla de Jena”.

Posteriormente, las cúpulas geodésicas fueron diseñadas por Buckminster Fuller, nacido en 1895, quien inició su trabajo a gran escala en 1953, cuando la Ford Motor Co. encargó una cúpula geodésica de 28.3m de diámetro, hecha de aluminio, que pesaba 160Ton de peso, contra las 160Ton que hubiera pesad

Buckminster Fuller diseñó estas cúpulas para el ejército de los EEUU debido a que las carpas eran lentas para armar y no satisfacían las necesidades de la Marina.

Fueron 47 tipos de refugio que iban desde una cúpula de 110m de diámetro para aviones, hasta un refugio de cartón de 4.26 m de diámetro, desechable apodado “Kleenex”. En 1954, una cúpula de cartón ondulado Kraft, en donde figuraban impresas las instrucciones para su armado, obtuvo el primer premio en la Trienal de Milán. Tenía 10.9m de diámetro. Posteriormente se experimentó con estructuras para soportar vientos de

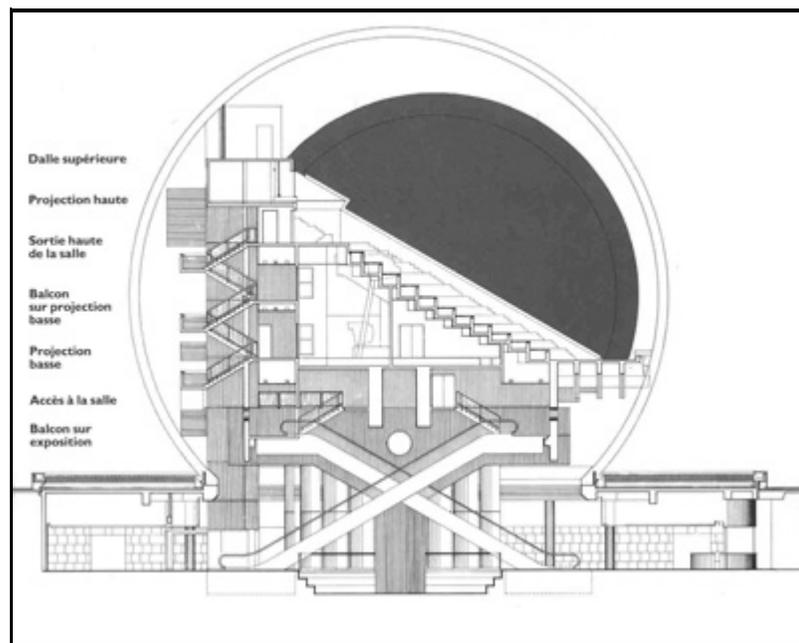


Domo de 72 m de diámetro para la Expo.1967 En Montreal Canadá. Construido con acero y acrílico. B. Fuller.

250Km/h, temperaturas bajo cero y que fueron transportadas al Círculo Polar Ártico. En la década de los 60s. Las cúpulas se difundieron destacando en grandes proyectos como la cúpula de la feria de Kabul con sus 30m de diámetro, fabricada en 6 semanas y armada en 48 horas, o la construida en Moscú por los EE.UU. en 1959 con 60m de diámetro. Es así que hasta la década del 70 se construyeron más de 2000 cúpulas geodésicas en 40 países del mundo, desde las más pequeñas de 6m de diámetro hasta grandes complejos estructurales de 115m de diámetro.

A finales de los 60, se experimentó con muchos materiales industriales y fabricación en serie. Estas estructuras tuvieron gran difusión en las comunidades hippies norteamericanas. Los hippies asociaron estas estructuras a la contra cultura, a la vida en comunidad, a hacer más con menos y por supuesto a la ecología; en lugar de pensar en una construcción industrializada y con elementos estructurales seriados, las adaptaron con material de desecho o reciclado y construyeron grandes hogares multifamiliares, en donde el gran espacio que brinda la forma semiesférica acogía a un gran núcleo familiar.

Podemos citar La Géode de la Cité des Sciences et de l'Industrie en París diseñada por Fuller, la cual alberga un cine Omnimax, que proyecta una imagen a 180 grados (sobrepasando el campo de visión humano de 120 grados).



Corte lateral de La Géode. Cine Omnimax
Madec Philippe, Hiéblot James
La Cité des Sciences et de L'Industrie

Este ejemplo de altísima tecnología está compuesta por 2 capas, la primera formada por una trama estructural de 1600 triángulos y la segunda por 6433 placas triangulares curvas de acero, perfectamente pulidas y producidas con una exactitud del orden de décimos de milímetro. Con sus 36m de diámetro alberga a 370 espectadores.

En México tenemos construidas estas estructuras como la gran cúpula invernadero hecha con aluminio, de 60m de diámetro, ubicada en el centro vacacional de Oaxtepec Morelos, diseñada por B. Fuller. Actualmente, empresas trasnacionales como Trimetika, Triodetic, construyen este tipo de edificios a través de patentes y marcas.

Aunque en nuestro país no ha sido desarrollada esta tecnología, tenemos en nuestras universidades antecedentes escritos sobresalientes, como los excelentes trabajos de Pablo Raeder y Campos Newman (1982) en su libro "Geodésicas" (trazo básico), que sientan las bases para la generación de poliedros geodésicos modelados gráficamente con geometría descriptiva, estableciendo las bases para el modelado matemático y virtual en AutoCAD. La ampliación de ese mismo estudio por Campos Newman (1989) en su libro "Redes y mallas de estructuras geodésicas", que continúa desde la geometría descriptiva, ensayando nuevas formas de partición de poliedros arquimedianos para generar poliedros geodésicos.

Luis Beristain (1976) en su "Análítica de los poliedros", obtiene longitudes y ángulos de poliedros geodésicos subdividiendo los ángulos centrales que subtienden las aristas del Icosaedro, mediante proyecciones ortogonales donde luego relaciona algebraicamente los elementos geométricos que están en verdadera forma y magnitud. Este trabajo merece ser completado y llevado al diseño y construcción de elementos estructurales.

Otras aportaciones como la tesis de Jorge Nañez M. (1998) "Construcción, geometría y esfuerzos de cubiertas esféricas" de la UNAM, quien obtiene las coordenadas de los puntos de un poliedro geodésico mediante trigonometría esférica y coordenadas polares, analizando los esfuerzos en segmentos mediante software compatibles con autocad. Los trabajos de Magnus J. Wenninger (1979), en su "Spherical Models", con el mismo enfoque de trigonometría esférica, destaca notablemente todas las posibilidades de particiones de la esfera con círculos máximos (ecuador) y sus variantes, con un extraordinario énfasis en la construcción de modelos físicos para facilitar la comprensión de la geometría esférica.

Los inevitables textos clásicos de B. Fuller, Synergetics 1 y 2 que muestran la peculiar manera en que Fuller reflexiona la geometría, donde deriva el sistema tensegrity en el que trasciende la visión tecnológica mecanicista clásica, aportando una óptica integradora desde la física de las partículas, la filosofía y la poesía.

En Internet podemos consultar más de 1,000,000 de citas sobre "Geodesic Structures": Libros, empresas con licencia de patentes, artículos y productos en venta, que generalmente omiten detalles específicos significativos para el análisis pero que nos permiten identificar todos los componentes necesarios para elaborar los métodos de desarrollo práctico de estas estructuras.

Bajo los criterios de los antecedentes revisados, establecimos los siguientes objetivos e hipótesis:

<http://www.usmp.edu.pe/publicaciones/boletin/fia/info39/arquitectura.html>

1.2.- Objetivo general

Desarrollar una metodología sobre el procedimiento de diseño y construcción de una estructura geodésica, basado en un procedimiento teórico-experimental, por medio de modelos físicos, gráficos y matemáticos, con la finalidad de que dicha metodología permita establecer las bases para el análisis y cálculo estructural y abordar otras investigaciones de mayor complejidad, aplicados a construir espacios arquitectónicos.

1.3.- Hipótesis

Partimos de la hipótesis de que el diseño y construcción de las estructuras geodésicas, se determina mediante modelos matemáticos apoyados en modelos gráficos y físicos que nos permitan obtener la precisión requerida para la geometría del conjunto y de cada una de sus partes, ya que mediante este procedimiento, es posible controlar todas sus variables (posición de los nodos, longitudes y ángulos de las barras y paneles de recubrimiento, cimentación etc.), verificados con un prototipo experimental a escala real.

En el planteamiento anterior, suponemos que en los diversos métodos de generación de las geodésicas, podemos obtener todo tipo de longitudes y ángulos mediante relaciones algebraicas en los cortes planos de los poliedros básicos, donde aparezcan en verdadera forma y magnitud los segmentos y ángulos de nuestro interés, *utilizando únicamente trigonometría elemental*.

Como complemento de la hipótesis, en el aspecto constructivo, supusimos que los elementos constructivos de la estructura se pueden prefabricar y estandarizar, *utilizando únicamente la herramienta y maquinaria comunes de nuestros talleres populares de carpintería y herrería no especializados*, sistematizando su construcción, mediante un proceso controlado por moldes y escantillones, ponderando los errores de medición y de fabricación, mediante tolerancias entre los materiales; ya que no contamos con los procesos industrializados y automatizados de los países desarrollados.

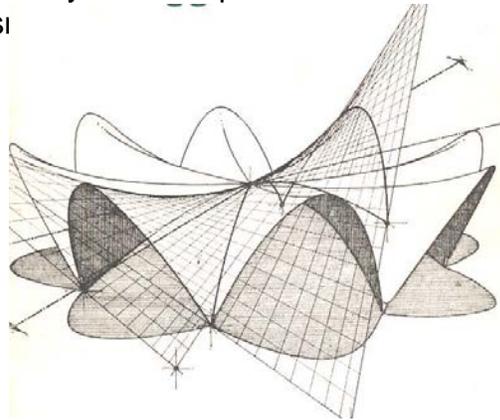
1.4.- Marco teórico.

La postura teórica y metodológica de esta investigación se basó en la revisión de experiencias y reflexiones filosóficas sobre teoría de la tecnología de filósofos como Mario Bunge y Ortega y Gasset, quienes definen una metodología homologando la Investigación Científica con la investigación tecnológica, así como en las posturas teóricas de ingenieros y arquitectos como Félix Candela, Pier Luigi Nervi, y Frei Otto en el campo de las estructuras, en quienes encontramos convergencias teórico-metodológicas para la investigación estructural y sus implicaciones en la enseñanza de las estructuras. Convergencias que parecen inducirnos a la idea de que las estructuras se enseñen de la misma manera en que se investigan.

Para la investigación tecnológica, Bunge destaca como punto de partida fundamental el problema gnoseológico en la teoría del conocimiento, (como conocemos).

El tecnólogo dice Bunge, debe hacer filosofía y no ser oportunista de la filosofía, que mezcla el realismo crítico con el pragmatismo y que no busca la verdad en si misma desde el punto de vista científico y filosófico.

Bunge homologa la filosofía de la ciencia con la filosofía de la tecnología y en el mismo sentido podemos hacerlo con la filosofía de las estructuras, reconociendo su similitud metodológica, su estructuración a partir de hipótesis para crear y construir teorías, que serán verificadas experimentalmente y que nos remiten a ensayos de laboratorio o de campo.



Restaurante en Xochimilco México D.F. (Félix Candela), fotografía tomada para fines didácticos, de los cuadernos de Arquitectura, Bellas Artes, 1964).

Para Bunge, la similitud metodológica entre la investigación científica y tecnológica corresponde al hecho de que en ambas: *debemos discernir el problema y tratar de resolverlo exacta o aproximadamente con el conocimiento teórico o empírico disponible, o en su defecto inventar técnicas o hipótesis que lo resuelvan, haciendo pruebas comprobatorias de laboratorio o de campo y corrigiendo en lo necesario las hipótesis y técnicas empleadas; o bien corrigiendo la formulación misma del problema.* (Reyna, 2003).

En el campo de las estructuras arquitectónicas, este punto de vista lo comparten, Félix Candela, P. Luigi Nervi y Frei Otto. Mostrando la misma tendencia de pensamiento que Bunge.

Candela, expresa que el análisis estructural es como una ciencia “aunque tosca y grosera”. Sugiere que el técnico, si no es investigador, por lo menos tenga una cierta dosis de preocupación por los principios fundamentales en que su técnica esta basada, *inclusive los filosóficos.* (Candela 1962).

En su libro “hacia una filosofía de las estructuras”, Candela define el análisis estructural como: *“una ciencia exacta que, basándose en hipótesis deliberadamente falsas, pretende determinar, de modo único para cada sistema de cargas, los esfuerzos a que esta sometida una estructura cualquiera”.* (Candela, 1962)

Poniendo en relieve las limitaciones de la teoría elástica en cuanto a su utilidad práctica y sobre todo, la falta de reflexión crítica de sus usuarios, los Ingenieros.

Enfatizando también la necesidad de revisar la utilidad y pertinencia de la matemática como herramienta para la investigación estructural. De ahí que en su postura filosófica Candela considere la importancia de la probabilidad y la estadística, tomando en cuenta las características de las variables, la complejidad y su carácter experimental.

Candela sugiere la reformulación misma del problema estructural. Destacando que el problema gnoseológico subyace en el fondo de la investigación estructural, coincidiendo con Bunge en la necesidad de hacer una revisión filosófica de la tecnología.

Candela cita a Ortega y Gasset cuando dice : *"cuando se investiga o se comprueba algo, se hace con miras a ratificar una cierta idea preconcebida sobre la causa del fenómeno que investigamos; por lo mismo dice Ortega es imposible conocer directamente la plenitud de lo real, no tenemos mas remedio que construir arbitrariamente una realidad, suponer que las cosas son de cierta manera y esto nos proporciona un esquema, es decir un concepto o enrejado de conceptos como una cuadrícula a través de la cual miramos luego la realidad, consiguiendo una visión aproximada de ella. En esto consiste el método científico, mas aun, en esto consiste todo uso del intelecto."*(Candela, 1962). Señalando así, la necesidad de crear siempre nuevos modelos de interpretación de la realidad con el cuidado de no tomar las teorías existentes como dogmas.

Candela concluye su ensayo (Sep. 1951) con una cita de Ortega y Gasset: *"Pensar es, quiérase o no exagerar. Quien prefiera no exagerar tiene que callarse; más aun: tiene que ver la manera de paralizar su intelecto"* (Candela 1962). Señalando la necesidad de hacer siempre nuevos planteamientos y nuevas hipótesis.

La crítica e invitación de Candela es a desmitificar y repensar las teorías estructurales y los métodos de cálculo como medios de control únicos de los fenómenos estructurales, para abrirse dice Candela, *"a la posibilidad de sustituir los procedimientos habituales de análisis estructural, por otros mas adecuados, simples y lógicos."* Coincidiendo, continúa diciendo, con Van der Broeck que dice: *"Personalmente considero que el "superénfasis" en el análisis elástico de los últimos cincuenta años, es una aberración que presenta muestras de estar perdiendo su preponderancia "* (Candela 1962).

Finalmente Candela reafirma su postura teórico-filosófica recordando a Cross, *"lo que necesitamos es una estructura, no un análisis"*.

Pier Luigi Nervi, expresa de manera implícita su postura gnoseológica similar a la de Bunge. Para Nervi el conocimiento estructural y en general el tecnológico suceden de manera simultánea entre la reflexión del conocimiento teórico existente, y su experimentación en la realidad, analizando los principios fundamentales actuales que rigen a las estructuras, así como la voluntad de solución estética, económica y funcional, que como gran constructor sintetiza en sus obras.

Dice Nervi: *“El Arquitecto no debe ser un especialista de ramo alguno de la técnica, sino que debe tener ideas generales y conceptos mas claros que los especialistas, sus colaboradores.”*

La enseñanza técnica de la Arquitectura tiene que ser fundamentalmente de conceptos, las nociones particulares se olvidan con facilidad y pronto son superadas por el progreso técnico.”

Para Nervi, el Arquitecto es esencialmente un constructor, como el mismo expresa: “ninguna forma, ninguna idea, ninguna distribución funcional tiene valor en arquitectura, si no puede realizarse dentro de los límites de la técnica de ese momento y con el empleo de tiempo y de dinero compatible y proporcionando a las finalidades que la obra pretende alcanzar”. (Rivera 1963).

Nervi expresa sus convicciones pedagógicas en base a su manera de investigar y de hacer su práctica profesional, sugiere desarrollar la intuición estática y estética en el Arquitecto:

- a.- estudiando la historia de la arquitectura a través del análisis mecánico de sus sistemas estructurales - constructivos y sus resultados estéticos.
- b.- realizando modelos de estructuras y de estática gráfica de los sistemas estudiados.
- c.- conociendo profundamente de las leyes físicas y económicas del problema estudiado.
- d.- desarrollando métodos de cálculo sintéticos y generales para predimensionar estructuras.

Como expresara el Arq. David Cimmet en el ciclo de conferencias sobre la obra de Nervi organizadas por Ruth Rivera en Bellas artes en 1963.

“Nervi nunca sustituyó sus ideas espontáneas con cálculos y procedimientos matemáticos y no porque los cálculos estuviesen equivocados, sino porque las



Nervi en su despacho con sus modelos.

Fotografía tomada de los cuadernos de Arquitectura Bellas Artes 1964., para fines didácticos.

condiciones reales están alejadas por su misma complejidad e indeterminación de las idealizaciones simplificadoras de la teoría estructural., negando así no solo el carácter creativo al cálculo, sino que le ha negado también el carácter de verificación real “ (Cimet,1963). Coincidiendo así con Candela y Bunge en la necesidad de hacer un planteamiento conceptual y su verificación experimental.

Para Nervi toda proposición estructural es una hipótesis, y las hipótesis no se prueban con otras hipótesis sino con el laboratorio o la realidad. Nervi como heredero y seguidor de Brunelleschi utilizaba ya por 1935 la maqueta o el modelo reducido de una estructura para analizar su comportamiento, buscando así la parte empírica, que también presentaba ciertas limitaciones pero permitía ver la totalidad y unicidad de la estructura.

Los enunciados metodológicos de Bunge en donde son similares investigación científica y tecnológica muestran un coincidente paralelismo con las posturas metodológicas de Candela y Nervi.

Aunque Bunge no aborda de manera explícita el desarrollo de la intuición estática y estética que para Nervi es fundamental, lo implica en la metodología antes mencionada, cuando habla de manera general de los valores en la tecnología.

Nervi no se interesa en la intuición mística, sino que él habla de la intuición estática y estética, que las considera espontáneas y subconscientes pero nutridas necesariamente de una larga y esforzada búsqueda, con mucho trabajo previo, sistemático, rectificado y depurado, verificado con el método experimental.

En las propias palabras de Nervi con respecto al estadio de Florencia de 1929 se percibe como él concilia en sus estructuras, las consideraciones estáticas y estéticas:
“Las variaciones en la sección de las vigas principales están dictadas por la ley que gobierna la variación de momentos. La leve curva de la cubierta y el arqueo de los nervios fueron inspirados por consideraciones puramente estéticas.”

“Me parece-dice- que el sentido estático puede definirse como la síntesis hecha por la mente humana o la <humanización> de las leyes naturales que rigen los equilibrios de las fuerzas y de sus reacciones. Es precisamente de este sentido estático de donde nace la <intuición estética> que sugiere para cada esquema, el esquema estructural apropiado, esquema que será tanto mas expresivo, cuanto mas se ajuste al orden natural de las acciones y resistencias”.

“Hay que sentir donde corren las fuerzas dentro de una estructura, hay que sentir como reacciona una estructura y como tiende a deformarse bajo los esfuerzos, hay que sentir como vive, para poderla concebir y dibujar correctamente; y cuando una estructura corresponde en la forma mas lógica y mas proporcionada al curso de las fuerzas, siempre es también bella”. (Rivera, 1963)

Aunque Félix Candela no conoció personalmente a Nervi, también considera que el acto creativo no proviene de la simple inspiración, sino que es el resultado del trabajo

continuo y esforzado, fruto de muchos años de dedicación y esfuerzo mental para educar la inteligencia. Que la inspiración constructiva es el resultado del trabajo del subconsciente, cuando la mente conciente se ha ocupado antes de resolver un problema determinado durante cierto tiempo.

Candela y Nervi tienen coincidencias esenciales en sus posturas para la investigación tecnológica de las estructuras, y convergen con otro estructurista destacado en el campo de las cubiertas ligeras: Frei Otto, quien durante la segunda guerra, desarrolló invaluable aportaciones al desarrollo de la construcción ligera enfrentando serias limitaciones, en una ocasión expresó: *“A mi me basta con saber que una cosa se puede hacer; hacerla pueden ya otros”*, (Roland, 1965). Sintetizando así su postura gnoseológica. F. Otto continúa diciendo: *“la base de todo desarrollo consiste en el adecuado planteamiento de los problemas a resolver, su determinación y formulación se basa en la exacta observación de los procesos de la naturaleza desde un punto de vista general y el problema específico contiene en si mismo la clave para solucionarlo. Considerando que entre el problema y su solución existen infinitos procesos.*

La ampliación de los conocimientos del hombre se basan en la apertura de nuevos caminos en campos científicos todavía desconocidos.

Todos los caminos abiertos hacia lo desconocido difícilmente serán los más correctos, aunque habrá excepciones.

El trabajo científico de investigación se basa en el valor de afrontar con responsabilidad los errores, en la verificación constante de la posible aplicación de los resultados obtenidos y en la continua predisposición a la corrección”.

Mientras Bunge en la última parte de su metodología señala que habrá que inventar nuevas técnicas o hipótesis y corregir en su caso el planteamiento del problema. Frei Otto expresa que: *“Cuando falla un camino de investigación, se buscan otros”* (Roland 1965).

F. Otto como visionario plantea que mientras el reciente pasado ha sido la era de la investigación empírica, el futuro será la era de los nuevos planteamientos.

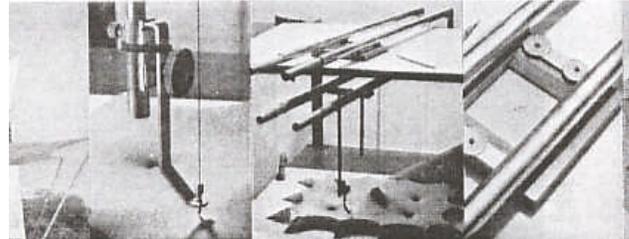
Mientras Bunge expresa lo ilimitado de la investigación científica y tecnológica así como de sus metodologías, Frei Otto señala las ilimitadas posturas que el hombre puede adoptar ante la ciencia, la tecnología y sus metodologías insistiendo en que surgirán innovadores y distintos caminos que habrá que asumir, avances simultáneos en los que habrá periodos de transición y posibles regresiones en algunos campos de la cultura, antes de que se produzca una nueva orientación general.

Se comprende así el trabajo inventivo de F. Otto abierto a nuevos puntos de vista, resolviendo siempre nuevas estructuras creadas por el y adoptando siempre nuevos métodos para resolver nuevos problemas.

Una de las características de Frei Otto es su ilimitada amplitud como pensador utopista y creador intuitivo que ha abierto nuevos caminos inexplorados de la ciencia y la tecnología.

La utopía no es para Otto lo inalcanzable, sino la única manera de orientar y darle sentido al trabajo creativo y sistemático, organizado con todo el rigor científico.

Otra característica fundamental de su metodología de trabajo como investigador, es que construye el conocimiento y controla las variables posibles de un fenómeno, a través de modelos.



Modelos de mediciones de cubiertas ligeras en el centro de investigaciones de Stuttgart Alemania dirigido por Frei Otto.

Los modelos entendidos como marcos conceptuales que delimitan las variables que nos interesan de un problema y especifican las relaciones entre ellas.

F. Otto empleo los modelos físicos para la concepción de ideas, para predecir comportamientos, para realizar mediciones y para el control de las mismas, además realizo modelos para la enseñanza.

Algunas de las convicciones de la postura gnoseológica de Frei Otto, las expresó de la siguiente manera:

Mis primeras conjeturas fueron impulsadas por amigos de diversos países, que a veces aplicaron las soluciones para un caso, en otro diferente y tuvieron éxito.

Conociendo la máxima amplitud existente en la investigación, cuanto mas limitemos nuestro campo de acción mejores serán las soluciones obtenidas. Pero cuanto mas sea reducido nuestro campo de visión, más difícil será ordenar las soluciones en el campo general del conocimiento.

A mayor especialización, mayor necesidad de interrelacionarse con los fenómenos de la naturaleza que parecen resistir todo intento de análisis y de investigación por el hombre, pero que pueden desarrollarse si se hace un adecuado planteamiento del problema a resolver, basado en la exacta observación de todos los procesos naturales desde un punto de vista general.

La potencia física y técnica del hombre es limitada, la inteligencia y el espíritu son ilimitados. El hombre, además de crear objetos, crea problemas e investiga su significado, que no conoce de antemano.

No hay prioridad alguna entre el problema y su solución, unas soluciones modifican a otras previas, la solución final no coincide con el problema inicial, a partir de los resultados obtenidos se plantean nuevos problemas que requieren nuevas soluciones.

La planificación a corto plazo permite un análisis detallado del problema de manera eficaz. Con este sistema de trabajo se avanza progresivamente a través de acciones meditadas con detenimiento.

La planificación a largo plazo así como su ejecución ofrecen nuevas perspectivas a un gran número de personas. Y que solamente los expertos podrán actuar rectamente en su campo científico y tecnológico.

Para ampliar el conocimiento hay que abrir nuevos caminos en campos científicos desconocidos, en el que habrá errores.

El trabajo del investigador científico se basará en el valor para afrontar los errores, en la continua predisposición a la corrección y a la verificación

Mientras que el reciente pasado fue la edad de la investigación empírica, el futuro será la era de los nuevos planteamientos, con otras formas de pensar, para descubrir otros planteamientos de los problemas.

Las características metodológicas que abstraemos de este análisis nos ubican en la investigación a partir de modelos de análisis y su verificación experimental, con una búsqueda abierta hacia nuevos enfoques y nuevos planteamientos que nos permitan dilucidar caminos para precisar soluciones tecnológicas basadas en principios científicos. Buscando organizar el proceso de investigación y sus resultados de manera sistemática para su aplicación a los problemas del Diseño.

En la ingeniería actual se emplea el *enfoque sistémico* para organizar y sistematizar el proceso de solución de problemas complejos, así como sus resultados y aplicaciones, por lo que se adopta este enfoque para la estructuración general de este trabajo.

1.4.1.- El enfoque sistémico.

En los antecedentes del enfoque sistémico, la literatura registra que este fue desarrollado por el Departamento de Defensa de los Estados Unidos para ayudar a sus comandantes y dirigentes militares y civiles a lograr un máximo de eficacia con un mínimo de recursos.

Posteriormente, cuando surgió la necesidad de abordar los problemas de la nueva ciencia espacial, se puso en práctica nuevamente el método del Análisis de Sistemas. La precisión con la que fueron enviados los hombres a la luna y regresados a la tierra en forma indemne, es una prueba de la eficacia de ese enfoque.

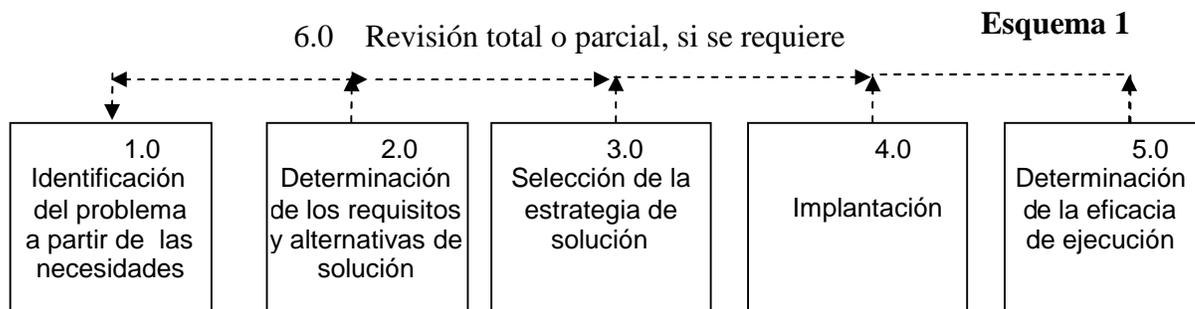
A partir de entonces, en varios países del mundo, este enfoque ha tenido una gran difusión al ser aplicado tanto en la administración pública como en la administración de proyectos de desarrollo tecnológico.

En el lenguaje tecnológico el tratamiento de un problema mediante un enfoque de sistemas, significa que para analizar y resolver problemas de cierta magnitud es recomendable:

- 1.- Dividir el problema en partes.
- 2.- Analizar y resolver por separado cada una de las partes como si se tratara de problemas independientes, de tal manera que el objetivo o función que desempeña cada parte, es congruente con el objetivo general o la función del conjunto, cuando se haya analizado y resuelto cada parte.
- 3.- Se integran y relacionan las partes en el conjunto que conforma el todo.

En ingeniería y administración este principio ha sido adoptado como una metodología de trabajo llamada enfoque de sistemas. La estrategia general para la planificación de proyectos en el enfoque sistémico, consiste en las siguientes 6 etapas:

Planificación con enfoque de sistemas



Etapa 1.- Identificación de problemas.

La primera etapa de la metodología consiste en definir el problema en base a las necesidades. Las necesidades son definidas como discrepancias medibles entre una situación actual y otra deseada o requerida, esto significa que dentro del diagnóstico que se realiza para determinar el estado en que se encuentra el sistema, se deben cuantificar los parámetros más significativos, de acuerdo al estado inicial del sistema y compararlos con lo que se desea o se requiere. Es decir, la necesidad es la medida entre lo que se tiene y lo que se requiere.

Una vez que se ha planteado el problema en base a las necesidades documentadas, se establece el objetivo general y los objetivos particulares. El objetivo general es una misión de trabajo a cumplir, un producto que se quiere obtener, un servicio completo o un cambio en las condiciones de algo que debe realizarse, entonces, un objetivo de misión es una declaración precisa, expresada en términos de ejecución, que describe el resultado esperado de una misión.

Posteriormente, se realiza el análisis del sistema para la solución del problema planteado dividiéndolo en pequeños subsistemas, atribuyendo a cada uno de ellos misiones específicas.

Etapas 2.- Determinar los requisitos de la solución y sus alternativas.

En esta etapa, se considera que la determinación de necesidades ya se ha realizado y ha proporcionado los requisitos generales que sirven para establecer el objetivo de misión y los requisitos de su realización.

En esta etapa no se decide cómo resolver los problemas, sino que en lugar de ello se determina que debe hacerse y de que alternativas se dispone para llenar los requisitos de solución. La selección de los modos de hacerlo, se llevan a cabo en la siguiente etapa del análisis.

Para determinar los requisitos de realización se efectúa el análisis por niveles para ir desglosando las misiones hasta llegar a los detalles más simples que nos indicaran la viabilidad o impedimento para realizar cada misión. Esta situación es comparable con el análisis a través de un microscopio de una colonia de bacterias en donde a medida que se usan lentes de mas alta resolución, se detectan mas los detalles de la muestra.

Los elementos o medios de que consta el análisis de sistemas son:

- 1.- Análisis de misiones
- 2.- Análisis de funciones
- 3.- Análisis de tareas
- 4.- Análisis de métodos y medios

Estos elementos constituyen un proceso para determinar tanto los requisitos del sistema como la factibilidad para realizarlos.

Etapas 3.- Seleccionar estrategias de solución entre las alternativas.

Se realiza el análisis para la selección de las alternativas de solución y se elaboran los programas correspondientes.

Etapas 4.- Implantar las estrategias de solución entre las alternativas.

Se lleva a cabo la ejecución de las alternativas seleccionadas bajo la conducción de un programa.

Etapas 5.- Determinar la eficiencia de la realización.

Se definen los parámetros o indicadores que midan la eficacia de las acciones y se realiza el análisis correspondiente.

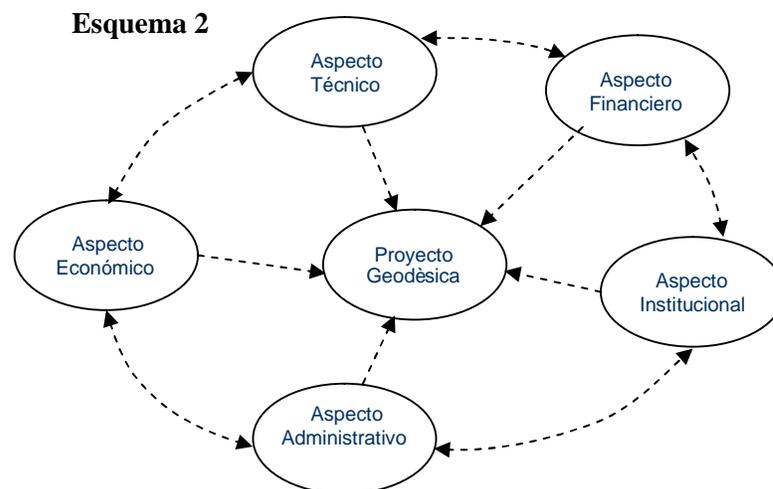
Etapas 6.- Revisión cuando sea necesario.

La sexta etapa está marcada con líneas punteadas y flechas, corresponde a la revisión total del proceso o de cualquiera de sus etapas, esta revisión se realiza solamente si se requiere.

Aspectos a considerar en el proyecto.

Una vez analizados todos los aspectos generales de la metodología, es conveniente describir los aspectos interdependientes del contenido aplicados a un proyecto específico.

Los principales aspectos que se estudian de un proyecto son los problemas técnicos, económicos, financieros, administrativos e institucionales, son cinco aspectos que aunque pueden analizarse por separado, son interdependientes pues debe existir entre ellos una constante reciprocidad de apoyo sobre todo en la información. Dicha interdependencia se ilustra en el siguiente esquema.



Aspecto técnico.- Este aspecto consiste generar y aplicar los conocimientos técnicos para resolver el proyecto. El análisis se realiza de manera simple, contestando las siguientes preguntas: ¿Que se va a hacer?, ¿Cómo se va a hacer?, ¿Con qué se va a hacer? y ¿Cuál es el resultado esperado?

La primera pregunta consiste en definir con precisión el problema.

La segunda pregunta corresponde al proceso que se sigue para lograr el objetivo y en nuestro caso es justamente la metodología seleccionada.

La tercera pregunta se refiere a los recursos materiales, humanos y legislación que se encuentran disponibles para la realización del proyecto.

En cuanto al resultado, se refiere a la contrastación de las hipótesis de esta investigación y en caso de que el producto se construya y comercialice, el resultado esperado es el beneficio que se obtiene de la relación entre insumos y productos y a la medición de la productividad de los factores empleados.

Aspecto financiero.- Se refiere a los recursos necesarios para cubrir los gastos del proyecto.

Aspecto económico.- Corresponde al estudio de factibilidad que señala la viabilidad y la rentabilidad del proyecto.

Aspecto administrativo.- El plano administrativo tiene dos aspectos, uno jurídico legal y otro estrictamente funcional o técnico.

Aspecto institucional.- Se refiere a las políticas de la empresa que pueden interferir en la concepción y desarrollo del proyecto, como serían las posibilidades de seleccionar técnicas, oportunidades de comercialización y el aprovechamiento de las economías externas para fines de importación y exportación.

1.5.- Metodología de trabajo.

Como parte de la metodología antes descrita en esta tesis, hemos considerado resolver únicamente el aspecto técnico del proyecto mostrado en el esquema 2, al cual le aplicamos nuevamente el enfoque sistémico del esquema 1 como metodología de trabajo, para resolver el problema teórico-práctico de diseño y construcción de una estructura geodésica.

Podemos entonces decir que este trabajo es un método teórico-experimental basado en un enfoque sistémico que se describe mediante modelos matemáticos, gráficos y físicos. Modelos que se verificaron independientemente y posteriormente se integraron en la construcción de un prototipo que permitió el diseño de elementos constructivos a escala real, donde se precisaron sus propiedades geométricas, y se verificaron los datos numéricos calculados, de acuerdo a los materiales propuestos.

Los modelos son utilizados aquí como idealizaciones que nos permiten destacar aspectos de nuestro interés y se expresan de manera particular. Un modelo matemático, un modelo físico y un modelo virtual, pueden representar diferentes características de un mismo objeto, son grupos acotados de variables del gran número de variables que constituyen un fenómeno, que nos permiten estudiarlo por partes y reducir su complejidad a dimensiones manejables para comprenderlas con claridad, para luego integrar esas visiones parciales en una visión total e integradora.

Cada tipo de modelo es una aproximación diferente al fenómeno con que tratamos, que nos especifica las partes esenciales de nuestro objeto de estudio.

Por ejemplo, el modelo matemático de una estructura describe las relaciones métricas esenciales y precisas de su geometría, como se describe en este trabajo.

Un modelo físico nos permite resolver detalles constructivos y verificar su funcionalidad, observar y evaluar el comportamiento mecánico de una estructura, reproduciendo a escala las condiciones mecánicas a que estarán sometidos sus elementos estructurales en la realidad, en nuestro caso, este estudio queda fuera del alcance de esta tesis.

Un modelo gráfico nos permite visualizar, relacionar, organizar las partes y hacer mediciones aproximadas entre otros.

La ciencia y la ingeniería emplean modelos físicos, matemáticos, gráficos, esquemáticos y de simulación (analógica, física y digital), con diversas finalidades: para el cálculo, la predicción, la comunicación, la instrucción, el control, y para la concepción de ideas. Los modelos son una herramienta del método experimental.

1.5.1.- Aplicación de la Metodología.

De esta manera, la metodología antes referida en el esquema 1, queda descrita por medio de los siguientes pasos:

- 1.0 Identificación del problema a partir de las necesidades
- 2.0 Determinación de los requisitos y alternativas de solución
- 3.0 Selección de la estrategia de solución
- 4.0 Implantación
- 5.0 Determinación de la eficacia de ejecución
- 6.0 Revisión total o parcial, si se requiere

Los pasos 1-2, se interpretan como el acopio de la información sobre los diferentes métodos para generar poliedros geodésicos, a partir de poliedros regulares. Y delimitación de los alcances y deficiencias de la información compilada para cumplir los objetivos.

El paso 3, corresponde a la selección del método de generación por partición de aristas por ser el más adecuado para incluir y simplificar a los demás métodos y la elección de la frecuencia 3 del icosaedro por partición de aristas como base de generación de la geodésica por ser la frecuencia básica impar, de mayor complejidad que la frecuencia básica par.

El paso 4, es el estudio geométrico de la frecuencia 3 del icosaedro.

4.1.- Partición de las caras del icosaedro en la frecuencia 3

4.2.- Proyección de las caras resultantes de la partición, sobre la esfera circunscrita al icosaedro.

- 4.3.- Establecimiento de las relaciones matemáticas que describen la longitud de las aristas del la frecuencia 3 del icosaedro en función de los ángulos y de la posición de los nodos en el espacio tridimensional.
- 4.4.- Codificación de las formulas y elaboración del programa en lenguaje C++
- 4.5.- Verificación parcial de los resultados, utilizando el programa del apartado (d)
- 4.6.- Verificación parcial y total de los resultados mediante un dibujo a escala en AutoCad
- 4.7.- Adecuación del cálculo geométrico de aristas y ángulos de la frecuencia 3 del icosaedro a los elementos constructivos de una estructura de 4m de radio considerando las dimensiones de los materiales, construida con barras de madera y conectores metálicos.
- 4.8.- Análisis y obtención de la geometría de elementos estructurales.

Paso 5.- Construcción del prototipo. (Módulo de pruebas a escala real)

- 5.1.-Selección y preparación de los materiales.
- 5.2.-Construcción de moldes y escantillones para fabricar los conectores
- 5.3.-Construcción de escantillones y topes para fabricación de barras.
- 5.4.-Fabricación de conectores.
- 5.5.-Fabricación de barras de madera.
- 5.6.-Estrategia de ensamble de la estructura mediante un código de colores para el armado de la estructura.
- 5.7.- Evaluación del proceso de construcción y registro de errores y nuevos ajustes.

Paso 6.- Verificación total de o parcial de una o varias de las etapas de la metodología.



3. HIPÓTESIS

El “priming natural” en semillas de *Dodonea viscosa* (L.) acelerará el reparto de carbono en la semilla, preparando o activando a las enzimas del metabolismo germinativo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto del priming natural en la movilización de carbohidratos en semillas de *Dodonea viscosa* (L.) durante la fase germinativa.

4.2. Objetivos particulares

- Obtener los perfiles de carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa y almidón) y lípidos durante la germinación de semillas de *D. viscosa* que fueron sometidas a dos tratamientos de priming natural.
- Determinar los niveles de actividad de las invertasas ácidas, la vacuolar y la de pared celular, en la germinación de semillas de *Dodonea viscosa* sometidas al priming natural.
- Comparar y analizar si el reparto de carbohidratos, medido como contenido de carbohidratos y la actividad de las invertasas ácidas, se afectó por el tratamiento de priming natural.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material Biológico

Las semillas utilizadas para el desarrollo experimental fueron proporcionadas por el Instituto de Ecología, colectadas directamente de los árboles de *Dodonea viscosa* (L), Jacq. (*Sapindaceae*), que crecen tanto en la parte alta como en la baja del Pedregal (Lomas del seminario y Reserva del Pedregal de San Ángel en Ciudad Universitaria; respectivamente).

Las semillas de *Dodonea viscosa* presentan testa impermeable (semillas testa-dormantes), por lo tanto antes de someter las semillas al tratamiento de priming natural, y llevar a cambios en la hidratación de las semillas, éstas fueron previamente sometidas a un tratamiento denominado de escarificación, el cual consiste en sumergir a las semillas por 2 min. en H₂SO₄ concentrado. Las semillas se enjuagaron y se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se realizó el tratamiento de priming natural.

Para llevar a cabo el priming natural, las semillas se colocaron en telas de organza, y a su vez en jaulas metálicas, las cuales se enterraron superficialmente bajo la sombra de árboles y que se le denominará en adelante tratamiento en bosque. Otro lote se enterró en una zona donde escaseaba la vegetación y entonces este tratamiento le llamamos priming en claro. El tiempo del priming fue de 2 meses.

5.2. Germinación

El lote control fue sometido al tratamiento de escarificación previamente descrito. Posteriormente, tanto las semillas del lote control como las que fueron sometidas a los tratamientos de priming natural, se calentaron en agua a 72°C, se esperó hasta que la temperatura bajará a 42°C, y se secaron cuidadosamente sobre papel Whatman,



posteriormente la germinación de las semillas se llevó a cabo en Agar al 1%, a 29-30°C por distintos tiempos que incluyen 12, 24, 48 y 72 horas. Se registró la población de semillas que germinaron en cada lote.

5.3. Cuantificación de carbohidratos solubles

5.3.1. Extracción de carbohidratos solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.

Se molieron en N₂ líquido las semillas hasta obtener un polvo fino. Se pesaron 100 mg de tejido y se extrajeron los carbohidratos con 1 mL de etanol (80% v/v) a temperatura de ebullición, la mezcla alcohólica se trasvasó a un tubo de ensaye. Al remanente del mortero se le agregó 1 mL de agua a temperatura de ebullición tratando de moler perfectamente, este extracto se mezcló con el del extracto alcohólico.

Posteriormente la mezcla alcohólica se centrifugó en tubos Microfuga por 10 minutos a 2,500 rpm. El sobrenadante se separó y se colocó en un tubo de ensaye que se calentó a 70°C en un bloque de calentamiento, la pastilla obtenida se resuspendió en un volumen de 100 a 200 µl de agua destilada. El extracto se guardó a -20°C hasta su utilización.

5.3.2. Cuantificación de azúcares solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.

La cuantificación de glucosa y fructosa se llevó a cabo a través de un método enzimático, según se describe en Ramírez, 2007. Brevemente, 10µl de la muestra problema se hicieron reaccionar por 20 min a temperatura ambiente, con 200 µl de una mezcla enzimática que contenía 1.0 U/ml de hexocinasa y 1.0 U/ml de glucosa-6P deshidrogenasa (G6PDH). La glucosa como la fructosa se fosforilan, y sólo la Glucosa-6P es usada por la G6PDH, se produce una cantidad equimolar de NADPH y se lee a 340nm, la absorbencia obtenida fue directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.



Después de la primera lectura, se le añadió al mismo pozo de reacción 1.2 U/ml glucosa-6P isomerasa, la cual cataliza la conversión de la fructosa-6P en glucosa-6P (que no reaccionó en el paso anterior) y entonces la G6PDH ya puede usar este sustrato, se hizo una segunda lectura y ahora el incremento en absorbencia a 340nm corresponde a la sumatoria de la glucosa de la primera determinación, más la concentración de fructosa.

Para la determinación de sacarosa se realizó una hidrólisis en medio ácido de la sacarosa de la muestra (12µL máximo), adicionando invertasa de levadura de SIGMA (4µL de una solución de 80 mg/mL de invertasa disuelta en acetato de magnesio 100mM a pH 4.5), se incubó por 2h a 37°C y posteriormente se determinó el contenido de glucosa y fructosa de acuerdo a lo antes establecido.

EL contenido de glucosa se calculó de la siguiente manera:

$$Glucosa = \frac{(Abs_m - Abs_b) * 0.00614F * Vol.}{Vol_{susp} * g_{tejido}} = mg / g_{tejido}$$

Abs : absorbancia _{λ_{340nm}}

F : factor de dilución

Vol : volumen de alicuota

Vol_{susp} : volumen de resuspensión

5.4. Medición de la actividad de invertasas ácidas

5.4.1. Obtención del extracto de invertasas ácidas.

Los extractos se obtuvieron según se describe en Pelleschi *et al.*, 1997. Brevemente, 500 mg de tejido se molieron en mortero con N₂ líquido. Después al polvo, se le añadieron 3 mL de amortiguador de extracción (HEPES/KOH pH 7.5, 5mM MgCl₂, 1mM Na₂EDTA, 2.6mM Ditiotritol, 0.02% Tritón X-100) y se homogenizó perfectamente. Posteriormente se centrifugó a



12000 rpm por 5 min a 4°C, el botón contenía a la invertasa de pared celular, mientras que en el sobrenadante se encontraban las invertasas solubles. El sobrenadante se desaló y concentró usando tubos Amicon Ultra-4 marca Millipore (No. de catalogo UFC801096). El extracto, que contenía a las invertasas solubles se guardó a -70°C hasta su utilización.

La invertasa de la pared celular se obtuvo a partir del botón obtenido en la primera centrifugación, el cual se resuspendió en 1mL de agua, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 5 min, el botón se volvió a lavar dos veces más con agua. Al botón final se le añadió 1.5 mL de amortiguador de extracción adicionado con NaCl 1M y se homogenizó perfectamente, se dejó incubando a 4°C en agitación rotatoria durante toda la noche y se centrifugó nuevamente según se describió, ahora el sobrenadante contuvo a la invertasa de la pared celular. Se desaló como se describió anteriormente y se guardó de igual forma a -70°C hasta su uso.

5.4.2. Determinación de proteína.

El contenido de proteína en la muestra se determinó mediante el método de Bradford. En un tubo de microfuga, se agregó 200 µL de reactivo de Bradford (no. de catálogo: 500-0006, BioRad) y de 1 a 20 µL de muestra, se adicionó también agua destilada c.b.p. 800 µL. Posteriormente se agitó el tubo por 15 segundos y se observó la formación de un complejo de color azul el cual absorbe a una longitud de onda de 595 nm. Se utilizó una curva estándar de albúmina de suero bovino.

5.4.3. Determinación de actividad de las invertasas ácidas.

La actividad de invertasas ácidas se determinó según Bergmeyer y Bernt, 1974. En el caso de las invertasas vacuolares, se acidificaron 25µL del extracto desalado adicionando 25µL de acetato de sodio 200mM (pH 4.8). La reacción enzimática se realizó al añadir 10 µl de sacarosa



600mM, y se incubó a 30°C por 90 min. Para la invertasa de pared celular se acidificaron 40µL de extracto desalado con 12.5 µL de acetato de sodio 400mM a pH 4.8. La reacción enzimática se llevó a cabo al adicionar 7.5 µL de sacarosa 1M, e incubarse a 30°C por 90 min. En ambos casos se detuvo la reacción al adicionar 50 µL de NaH₂PO₄ 0.5mM a pH 7.0 y su posterior ebullición por 5 min. La glucosa y la fructosa formadas se cuantificaron enzimáticamente, al adicionar, a la mezcla anterior, 750 µL del medio de reacción que contiene HEPES/KOH 50mM a pH 7.0, 2 mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM ATP, 1.5 U de fosfoglucosa-isomerasa, 2 U de glucosa-6 fosfato-deshidrogenasa, 2 U de hexocinasa y 0.5mM NADP⁺. Se incubó por 20 min a 30°C y por último se centrifugó a 12000 rpm por 5 min, el NADPH formado se midió a 340nm.

El cálculo de actividad de las invertasa se llevó a cabo mediante la siguiente fórmula:

$$Actividad = \left(\frac{Abs_{\lambda 340nm}}{6220 * t_{min} * mg_{proteína}} \right) * 10^6 = \frac{nmolGlu}{min mg}$$

5.5. Cuantificación de Lípidos

En un mortero se molieron 100mg de tejido adicionando 5mL de una solución de cloroformo-metanol (2:1) por 5 min, posteriormente en un tubo de ensaye se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, el sobrenadante obtenido se trasvasó a un tubo de ensaye rotulado y a peso constante, el botón se homogenizó adicionando 2.5 mL de la misma solución y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, y el sobrenadante obtenido se mezcló con el primero. El tubo se calentó a 70° C en un bloque de calentamiento hasta que los solventes fueron eliminados. Finalmente el contenido de lípidos se calculó respecto a la diferencia de peso.



5.6. Análisis estadístico

Se llevó a cabo en todos los casos un análisis de varianza de dos vías con un nivel de probabilidad $P \leq 0.01$, utilizando un programa estadístico (Statistica, versión 6.1. StatSoft, Inc. 1984-1998 Tulsa, Ok. U. S. A.). En los casos donde se presenta diferencia significativa entre tratamientos, se realizó un análisis de comparaciones múltiples por el método de Tukey-Kramer. Indicando el valor del parámetro F respecto a los valores de grados de libertad, comparándolo con el valor de probabilidad (p) que proporciona el programa utilizado.



RESULTADOS

6.1. Perfil de germinación de semillas de *Dodonea viscosa* (L.) sometidas a dos tratamientos de priming natural

Para corroborar que el priming natural produce un aumento en la germinación de las semillas, se llevó a cabo el perfil germinativo de las semillas sometidas a los dos tratamientos de priming natural, el enterramiento en claro y en bosque, y se comparó con el perfil de las semillas que no fueron sometidas al tratamiento (Figura 8).

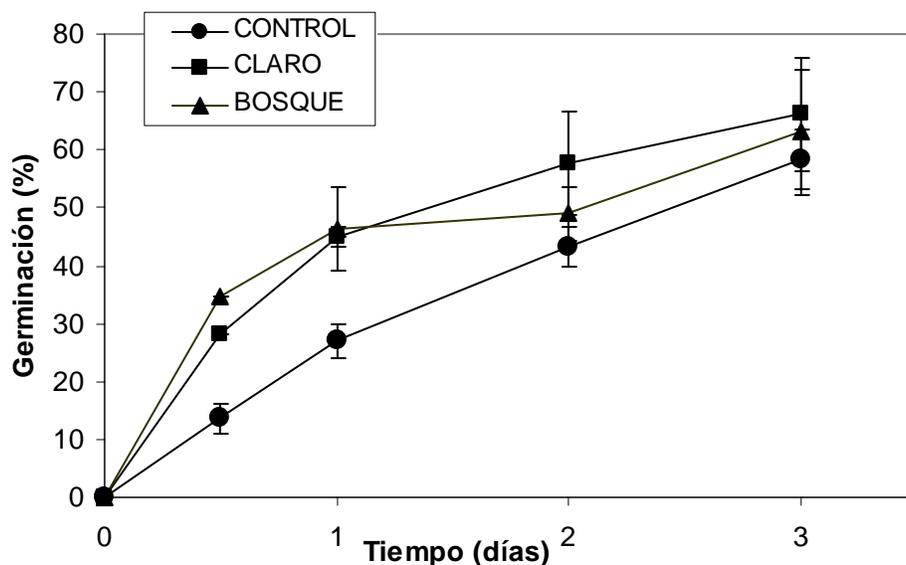


Figura 8. Curva de germinación de semillas de *Dodonea viscosa* que fueron sometidas a dos diferentes tratamientos de priming natural (Claro y Bosque). Datos expresados en medias \pm error estándar.

Se encontró que la capacidad germinativa de las semillas no presenta diferencia significativa entre tratamientos ($F(8,15) = 1.03$; $p = 1.4536$), sin embargo el número de semillas germinadas fue mayor en las semillas que fueron sometidas al tratamiento pre-germinativo, ya que éstas tuvieron entre un 29 a un 35% de germinación a las 12 horas, mientras que las semillas control presentaron el 11% de germinación. Sin embargo, conforme avanza el tiempo de germinación las semillas control alcanzan porcentajes similares a los obtenidos en las semillas tratadas.



6.2. Efecto del priming natural en el contenido de carbohidratos solubles, almidón y lípidos en las semillas de *Dodonea viscosa*

Para determinar si hubo un adelanto en los procesos metabólicos de la semilla, se determinó la movilización de reservas de carbohidratos y lípidos en las semillas sin hidratar, y como primera aproximación a estos cambios se midieron los contenidos de algunos carbohidratos y de lípidos totales en la semilla seca (Figura 9).

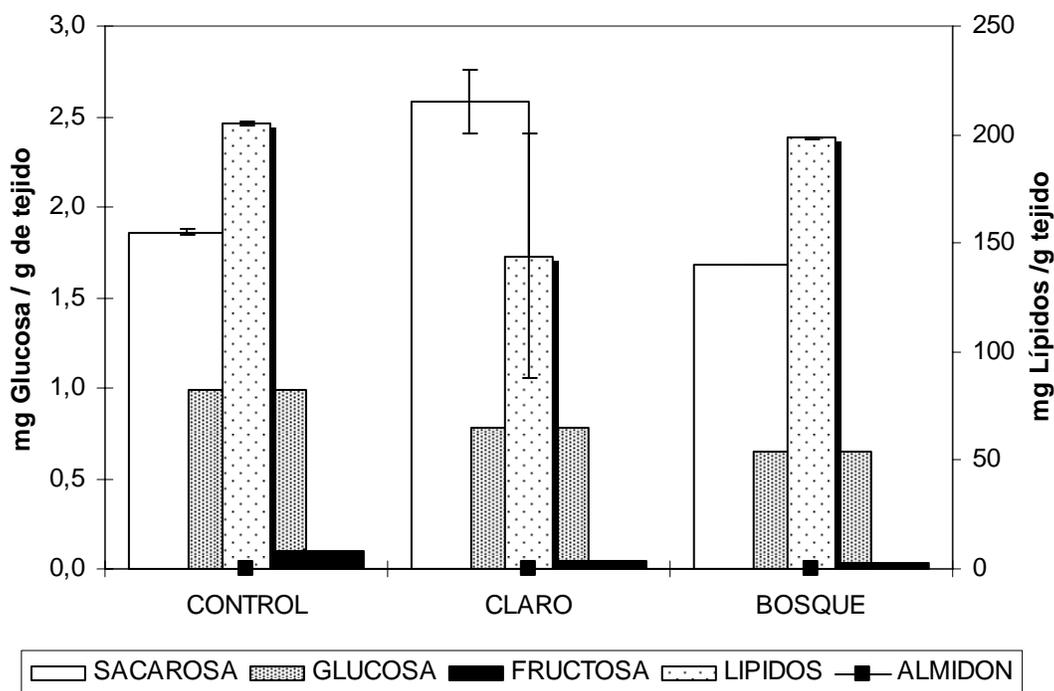


Figura 9. Contenido de carbohidratos y lípidos en semillas secas de *Dodonea viscosa*. Las semillas fueron colectadas y guardadas en el laboratorio o bien enterradas en claro o bosque. Datos expresados en medias \pm error estándar.

El contenido de sacarosa es significativamente mayor en todos los lotes de semillas, en comparación con el resto de los carbohidratos medidos, lo que sugiere que éste podría ser el principal carbohidrato de reserva de *Dodonea* y que será la fuente inicial de carbono para llevar a cabo su desarrollo, principalmente durante el inicio de la germinación (fases I y II). Los niveles de glucosa y fructosa en las semillas secas son distintos entre los diferentes lotes de semillas,



aunque no de manera significativa ($F(4,9)=6.32$; $p =6.5105$). Debido a que la cantidad de almidón es escasa en estas semillas y no presentó cambios significativos entre tratamientos con respecto al control, solo se determinaron las variaciones de los otros tres carbohidratos solubles a diferentes tiempos de la germinación.

Respecto al contenido de lípidos se encontró que fue hasta 100 veces mayor que el contenido de sacarosa, lo que sugiere que esta semilla principalmente almacena lípidos, por lo que se decidió determinar el perfil de lípidos durante la germinación de las semillas.

6.3. Efecto del priming natural en el perfil del contenido de carbohidratos y lípidos durante la germinación de las semillas de *Dodonea viscosa*

La movilización de los carbohidratos solubles durante la germinación se presenta en la Figura 10. Se encontró que el contenido de glucosa varió de manera significativa entre tratamientos ($F(2,89) = 12.84$; $p < 0.0001$) y como se puede observar en la figura 10A, hubo una disminución rápida de este carbohidrato durante el inicio del periodo germinativo, en las primeras 12 h, excepto en el lote tratado en claro, la glucosa se utilizó en las semillas control alrededor de un 42.5% y para el lote tratado en bosque en un 36.4%, mientras que en el caso del lote de claro se observó un incremento significativo de 23% ($F(8,89)=18.09$; $p < 0.0001$) y una subsiguiente disminución a valores muy semejantes a los presentados por el lote control. Posteriormente a las 24h los contenidos de glucosa no variaron para los lotes control y tratados en claro y hubo un aumento significativo en el caso del lote de bosque. Es probable que contenidos menores de glucosa, no sean compatibles con la vida por lo que las semillas mantienen un contenido constante.

La curva de cambio en el contenido de fructosa es similar en forma para los lotes de semillas sometidas al priming natural, sin embargo si se encontró diferencias significativas entre los



distintos tratamientos ($F(8,80)=98.73$; $p<0.0001$). Se puede observar, que la fructosa va aumentando de manera gradual hasta los 3 días de germinación. Pero el lote control presenta un perfil de fructosa diferente, ya que no se observan cambios importantes en el contenido de la misma a lo largo del periodo germinativo, manteniéndose aproximadamente en 0.13 mg de fructosa por g de tejido (Figura 10B). El aumento en fructosa podría indicar un aumento en el uso de la sacarosa.

Las curvas de contenido de sacarosa durante la germinación de los tres lotes de semillas tuvieron un comportamiento similar, ya que en todos los casos hubo un decremento en el contenido de este carbohidrato, sin embargo si hubo diferencia significativa entre tratamientos ($F(2,74)=16.99$; $p<0.0001$), presentando diferente velocidad de degradación entre sí, como se puede observar en la Figura 10C, distinguiéndose dos pendientes para cada caso, primero en la disminución de este carbohidrato durante las primera 12h y la segunda a partir de este tiempo hasta las 72h de germinación. La velocidad de degradación en las semillas control es mayor en las primeras 12h de germinación, 0.872 mg sacarosa / g tejido día, ya que a partir de este tiempo la velocidad disminuyó a 0.144 mg sacarosa / g tejido día manteniéndose prácticamente constante. En cuanto a las semillas pre-tratadas, un comportamiento similar fue observado en las semillas claro, aunque la velocidad de degradación en este lote fue 2.4 veces mayor que en las semillas control y después de este tiempo se mantiene prácticamente constante, ya que la velocidad de degradación disminuyó hasta 0.04 mg sacarosa / g tejido día, por lo que podemos decir que la movilización de sacarosa fue mas rápida en las semillas claro que el resto de los tratamientos, ya que en el caso de las semillas de bosque hubo una degradación gradual a una velocidad de 0.335 mg sacarosa / g tejido día, manteniendo el contenido de sacarosa por arriba del que presentaron las semillas del claro durante todo el tratamiento germinativo.

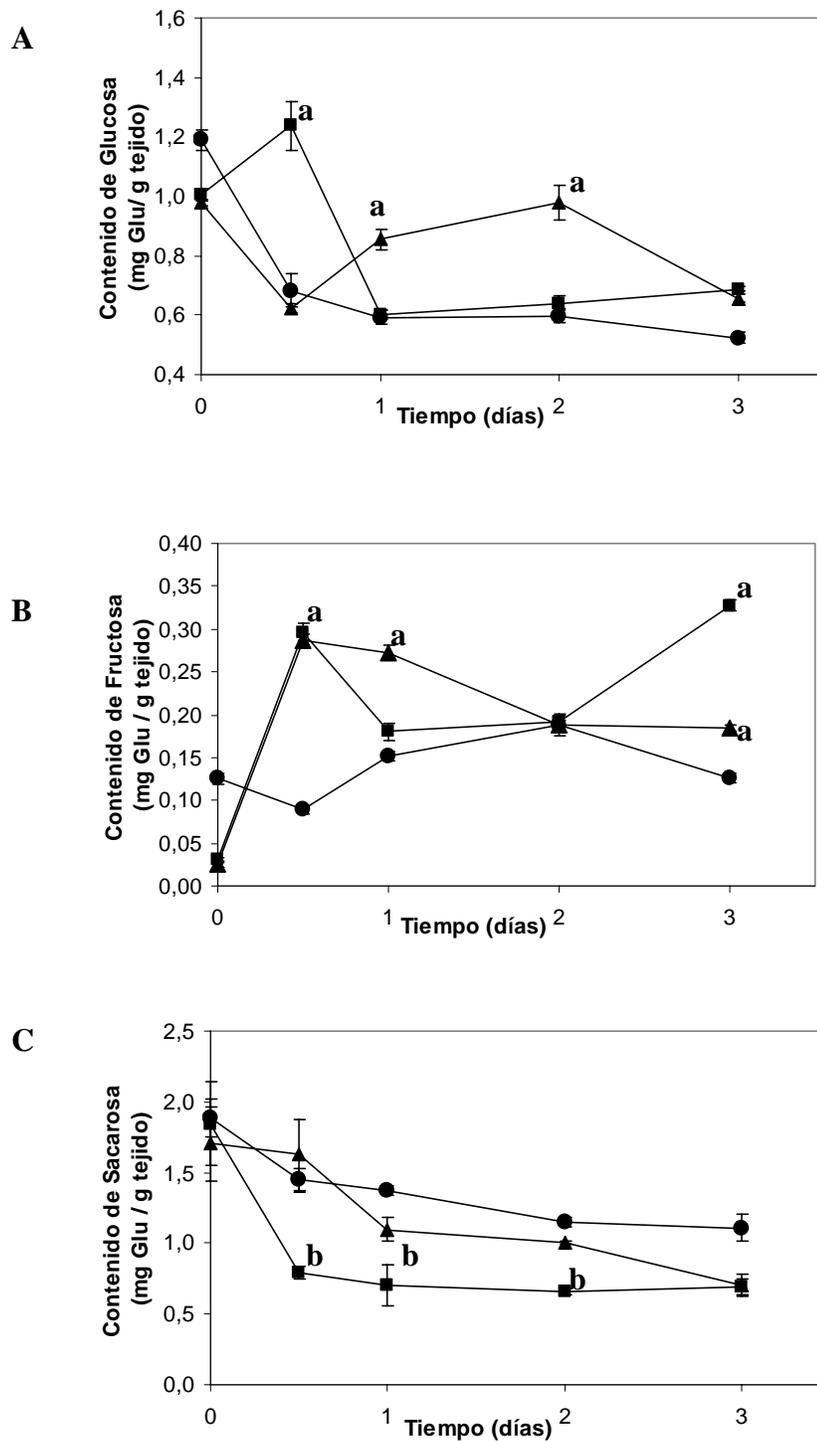


Figura 10. Perfil del contenido de carbohidratos durante la germinación de semillas de *Dodonea viscosa* sometidas a distintos tratamientos de priming. (A) contenido de glucosa, (B) contenido de fructosa y (C) contenido de sacarosa. ● Control, ■ Claro, y ▲ Bosque. Cada punto corresponde a la media \pm error estándar (a: puntos donde hay diferencia significativa con $p < 0.0001$ respecto al lote control, b: puntos donde se presenta diferencia significativa con una $p < 0.0585$ respecto al lote control).



Contrario a los cambios observados en el contenido de carbohidratos entre semillas sometidas al priming natural y control, el contenido de lípidos (Figura 11) a pesar de que se presenta una tendencia a disminuir gradualmente durante el periodo germinativo, no presenta cambios significativos entre el control y los tratamientos en cuanto a la velocidad de degradación ($F(8,15)= 0.4268$; $p=0.8871$), sin embargo cabe destacar que el contenido de los mismos en los lotes de semillas que fueron sometidas al priming natural, permaneció por debajo del contenido de lípidos en las semillas control a lo largo de la germinación.

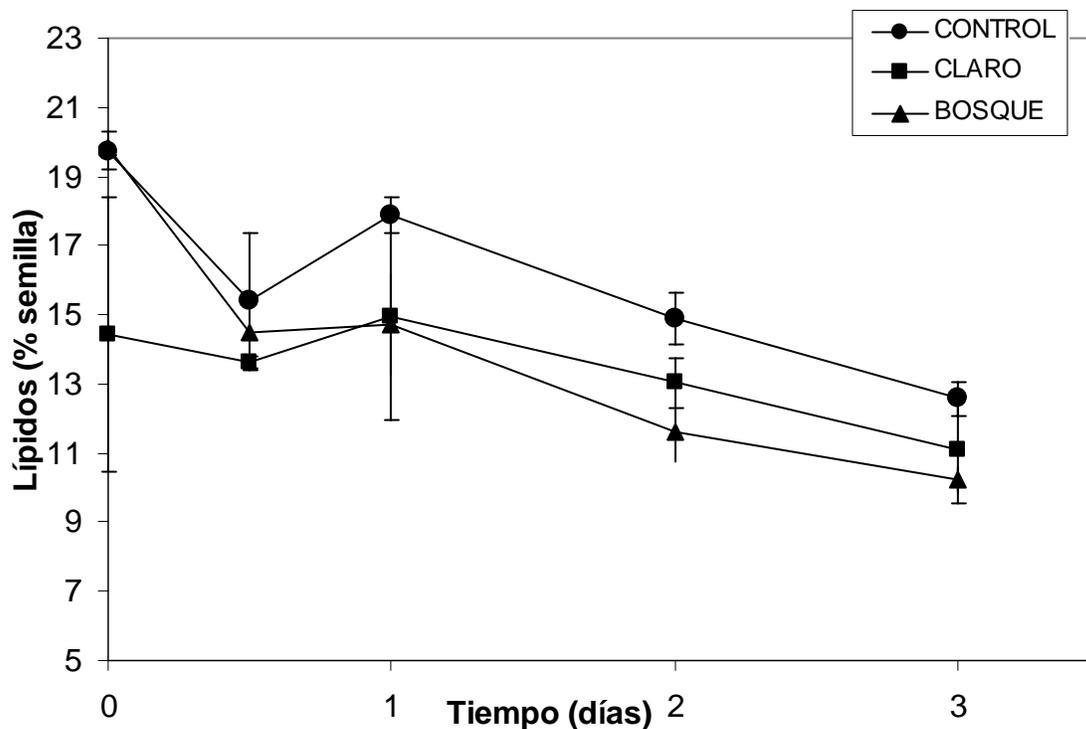


Figura 11. Perfil del contenido de lípidos durante la germinación de semillas de *Dodonea viscosa* sometidas a distintos tratamientos de priming. Datos expresados en media \pm error estándar.



6.4. Efecto del priming natural en la actividad de las Invertasas en las semillas secas y en la germinación de las semillas de *Dodonea viscosa*

En base a que la movilización de sacarosa, glucosa y fructosa es importante para establecer tanto el metabolismo glucolítico para la síntesis de ATP, el inicio del ciclo de pentosas para la producción de ribosas y NADPH, la síntesis de nuevos componentes de la pared celular entre otros; se determinó la actividad de las invertasas ácidas, enzimas importantes en el uso de la sacarosa y el establecimiento de gradientes tanto de sacarosa como de sus hexosas constituyentes.

Tomando en cuenta que en la célula se encuentran presentes tres tipos de invertasas (neutra, vacuolar y de pared celular) se determinó primero la actividad de cada una de éstas en semillas sin germinar.

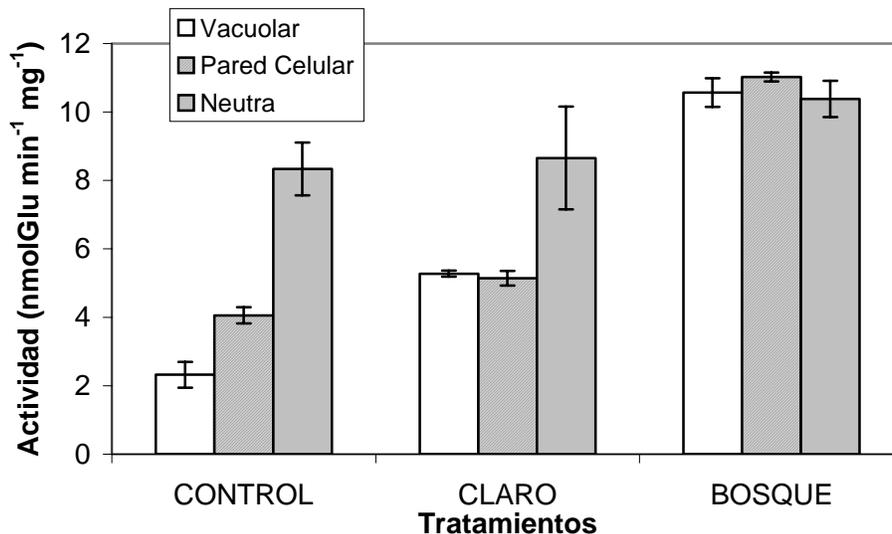


Figura 12. Actividad de las tres invertasas celulares en semillas secas de *Dodonea Viscosa* que fueron o no sometidas a tratamientos de priming. Datos expresados en medias \pm error estándar.

Como se muestra en la Figura 12 la invertasa neutra, entre los tres lotes de semillas, no presentó diferencia significativa ($F(4,9)=4.75$; $p=5.6005$), mientras que la actividad de las invertasas ácidas aumentaron por el tratamiento pregerminativo significativamente respecto al



control, más en el tratamiento en bosque que en el claro. Las invertasas vacuolares aumentan de 2.3 y 4.6 veces y las de pared celular de 1.3 y 2.7 con respecto al control en el lote de semillas enterradas en claro y bosque, respectivamente (Figura 12). Por lo anterior se decidió medir la actividad de las invertasas ácidas, que son las que mostraron cambio en las semillas secas que fueron sometidas al tratamiento y no continuamos midiendo a la invertasa neutra durante la germinación de las semillas, no sólo porque no cambió su actividad en las semillas tratadas, sino también por que en la literatura se menciona que pierde fácilmente la actividad durante la extracción (Roitsch, 2004), y si esto ocurría podríamos estar concluyendo sobre resultados poco reproducibles.

El perfil de la actividad de las invertasas ácidas durante la germinación de los tres lotes de semillas se muestra en la Figura 13, se encontró diferencia significativa entre tratamientos tanto en la invertasa vacuolar ($F(8,74)=12.69$; $p<0.0001$) como en la invertasa de pared celular ($F(8,89)=6.91$; $p<0.0001$). El perfil de actividad de la invertasa vacuolar en el control mostró pocos cambios, un aumento de 4.1 veces de 0 a 12h y posteriormente mantuvo su actividad hasta las 72h de la germinación. Mientras que, en las semillas con priming se observó que la actividad es mayor, con respecto al control, a todos los tiempos determinados, pero con diferencias entre ambos patrones. La actividad de invertasa vacuolar de las semillas tratadas con priming en bosque aumenta su actividad de manera constante conforme avanza la germinación, siendo entre 1.7-2.9 veces mayor que la curva de las semillas control. En cuanto a las semillas que fueron sometidas a priming en claro presentaron un máximo de actividad en las primeras 12 h de la germinación que es 5.1 veces mayor al valor presentado por las semillas control y posteriormente reduce su actividad a valores ligeramente mayores, aunque no significativos al control (Figura 13A).

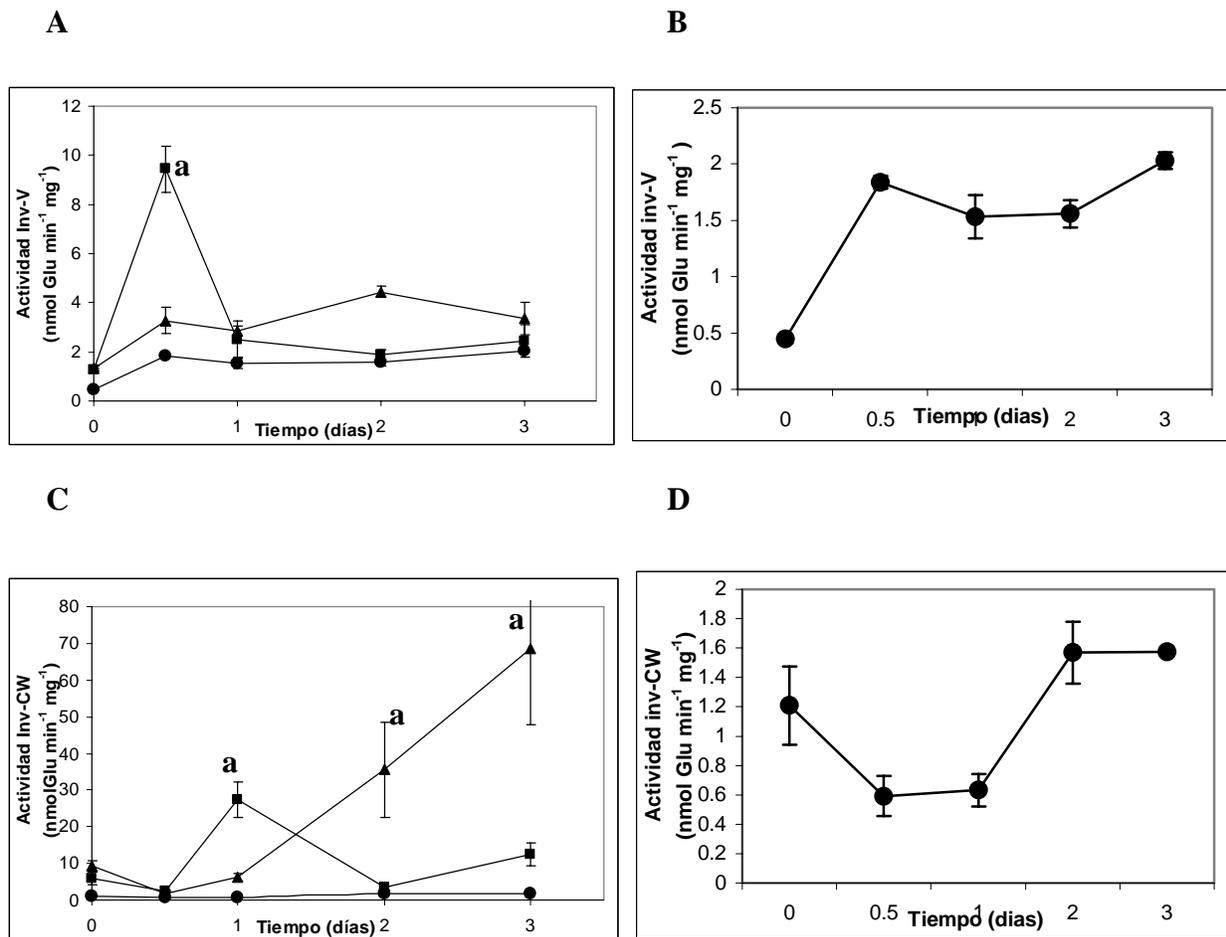


Figura 13. Efecto del Priming natural en la actividad de invertasas ácidas durante la germinación de semillas de *Dodonea viscosa*. (A) perfil de actividad de la invertasa vacuolar; (B) perfil de actividad de la invertasa vacuolar en el lote control, (C) perfil de actividad de la invertasa de la pared celular y (D) perfil de actividad de la invertasa de la pared celular en el lote control. ● Control, ■ Claro y ▲ Bosque. Cada punto corresponde a la media \pm error estándar (a: puntos donde hay diferencia significativa con $p < 0.0001$ respecto al lote control).

Al determinar la actividad de la invertasa ácida de la pared celular encontramos que es mayor que la que se encuentra en la vacuola en un intervalo que comprende de 2.9 hasta 7.3 veces para el caso de las semillas sometidas a priming (Figura 13B), ya que en el caso de las semillas control la actividad de invertasa de la pared celular fue menor 0.5-2 veces que la actividad en la vacuola.



La actividad de la invertasa de pared celular mostró diferencias significativas entre tratamientos ($F(8,87)=6.91$; $p<0.0001$), por una parte se obtuvo que la actividad en las semillas control se mantuvo constante a lo largo del periodo germinativo (0.21 – 1.58 nmol Glu /min mg) mientras que los lotes de semillas que fueron tratadas con priming mostraron siempre una actividad mayor al control, pero de diferente perfil entre los tratamientos. El perfil obtenido para las semillas con priming en claro presentó un máximo de actividad a las 24h (43.1 veces mayor que las semillas control) y disminuye a valores cercanos al del control. Mientras que en las semillas de bosque el incremento se observó hasta las 48 h de germinación y se mantuvo hasta las 72 h siendo éste de 43.4 y 5.5 veces mayor que en los lotes de semillas control y claro respectivamente.

Por lo que en conjunto el efecto del priming natural produjo un aumento en la actividad de las invertasas de la vacuola así como en las de pared celular, a cero horas ambas fueron mayores, pero durante la germinación es cuando se hace evidente el cambio. Además, el tipo de priming natural en claro o bosque sí produce diferencias en el patrón de actividad de las invertasas ácidas, siendo evidente que el priming en claro produce un aumento a tiempos discretos de la germinación, mientras que el priming en bosque aumenta gradualmente la actividad de las invertasas ácidas y lo mantiene por tiempos más prolongados.



7. DISCUSIÓN

7.1. Efecto del priming natural en la germinación de las semillas de *Dodonea viscosa* (L.)

Los efectos del priming de laboratorio se encuentran bien documentados, obteniendo una más rápida y uniforme germinación, así como la recuperación e incremento de la viabilidad, eliminación de la latencia, incrementos en los rendimientos y el establecimiento de las plántulas bajo condiciones de estrés de tipo biótico y abiótico, además permite almacenar las semillas por largos periodos de tiempo (González-Zertuche, 2001; Zheng *et. al.*, 1994). Con esto en mente en el presente trabajo evaluamos si las semillas que fueron sometidas por 2 meses a un tratamiento de enterramiento en dos zonas distintas, claro y bosque, presentaban un comportamiento diferente en la movilización del carbono disponible en la semilla. En el primero de los modelos experimentales, el priming o tratamiento de enterramiento en claro, la vegetación es escasa y entonces se produce una tasa mayor de evaporación de agua del suelo, una menor cantidad de organismos en el suelo y temperaturas más altas (con una media de 45°C), lo que provee un medio más agresivo, pero seco, en el que las semillas pueden permanecer por más tiempo sin iniciar su germinación, y una vez iniciada por la aparición de las lluvias, se seca más rápidamente el suelo y por tanto la semilla detiene el recién iniciado metabolismo germinativo. En el segundo caso, el tratamiento de priming en bosque, las semillas fueron enterradas bajo la cobertura de la vegetación, esto propicia una disminución de la luz que las semillas reciben, pero también una pérdida gradual del agua en el suelo, lo que favorece una mayor población de organismos en éste. En el caso de que se inicie la germinación por la aparición de las lluvias, el suelo permanecerá un tiempo mayor húmedo, comparado con el suelo en claro, por lo que podrían adelantarse los eventos germinativos por un tiempo mayor.

El tratamiento de priming natural ocasionó que la germinación de las semillas de *D. viscosa* se adelantara al del lote control (29-35% a las 12h), si bien tanto control como priming alcanzan al



final porcentajes similares de germinación. No hubo diferencias significativas entre los lotes con priming, aunque el priming en bosque presentó a las 24 y 48h un menor pero no significativo porcentaje de germinación respecto al lote de priming en claro. Benítez (2005) reportó resultados similares obtenidos en estudios ecofisiológicos con *Dodonea viscosa*, donde no hubo diferencia significativa en la germinación de semillas entre diferentes tratamientos de priming natural, sin embargo una vez que se desarrolla la plántula y ésta es transplantada para estudios de campo, donde son crecidas a diferentes condiciones de temperaturas o exposición a la luz, se encontró que las plántulas provenientes de semillas que fueron sometidas a priming natural presentaron una mayor sobrevivencia, de 98%, con respecto a las plántulas que provenían de semillas que no fueron sometidas a este tipo de tratamientos, donde el porcentaje que se obtuvo fue de 30%; los parámetros que se usaron para cuantificar la sobrevivencia fueron el número de hojas, longitud del tallo y área foliar de las plántulas. Con lo anterior, podemos sugerir que aunque no se ve modificado el porcentaje de germinación de las semillas de *Dodonea viscosa*, si se pueden estar modificando diversos procesos metabólicos que proporcionen las herramientas bioquímicas necesarias, para que las semillas estén más preparadas para resistir las condiciones ambientales y sobrevivan.

7.2. Efecto del priming natural en la movilización de reservas de semillas de *Dodonea viscosa* (L.)

La toma de agua por las semillas les permite iniciar los procesos metabólicos que habían sido detenidos, así en el priming el incremento en la toma de agua de la semilla, le permitirá iniciar los eventos de ajuste y reparación de macromoléculas y organelos para el adecuado funcionamiento de la célula y su preparación para la expansión y división celular (Bewley y Black, 1994). Dentro de los eventos metabólicos iniciados se encuentra la movilización de las reservas de corto alcance, que son aquellas que se encuentran en los tejidos embrionarios, como sacarosa, glucosa, fructosa y en algunas especies lípidos (Srivastava, 2002). En la



semilla de *Dodonea viscosa* los porcentajes de lípidos y sacarosa son de 20.1 y 0.25%, respectivamente y son las reservas que generalmente se encuentran disponibles en el embrión.

Los lípidos son una reserva importante en las semillas de *D. viscosa*, el perfil del contenido de lípidos durante la germinación nos mostró que tanto las semillas de los lotes tratamiento como el control se encuentran activas usando esta reserva desde las 12 h, aunque las semillas que pasaron por el priming natural lo hicieron más rápidamente. Después de las 24h, se observa que los tres lotes presentan velocidades similares de degradación pero siempre las semillas tratadas presentan ligeramente menos lípidos que las semillas control. La movilización de las reservas de lípidos puede comenzar en las primeras horas de la germinación, sin embargo se ha documentado que la degradación masiva de esta reserva ocurre principalmente después de la salida de la radícula y que los esqueletos carbonados son transformados a carbohidratos (Bewley y Black, 1994).

En las semillas de *Dodonea viscosa* observamos que el inicio de la germinación para al menos una población de ellas comienza a las 12 horas y a las 48h ya encontramos el 50% de las semillas germinadas en el lote control. Mientras que las semillas que fueron tratadas, a las 12h ya presentan el 30% de germinación y a las 24h el 50% de ellas ya germinó, el priming produce un adelanto aproximado de 1 día en la germinación, respecto al lote control. Este avance en la germinación podría explicarse por la ocurrencia de la movilización de la reservas durante el priming, que en el caso de los lípidos encontramos al menos en el lote tratado en claro, semillas que presentan de inicio menos lípidos (1.4 veces) que los lotes de semillas control y bosque. Aún cuando las semillas tratadas en bosque comienzan con un contenido de lípidos similar al del lote control, a las 12 h encontramos menos lípidos en las semillas tratadas con respecto al



control, así durante el priming comenzaron a movilizar las reservas, o bien se sintetizaron o activaron a las enzimas necesarias para que esto ocurra.

En *Arabidopsis thaliana*, se ha encontrado que al inicio de la germinación hay movilización de lípidos pero no hay una participación del ciclo del glioxilato, vía que es una forma modificada del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y que a través del uso de 2 moléculas de Acetil-CoA producirá una molécula de 4 carbonos, el succinato. Este último será el sustrato para los procesos biosintéticos y de respiración. El producto biosintético final de la degradación de lípidos en el estadio post-germinativo es la sacarosa, pero la movilización de lípidos en las etapas previas a la germinación se ha asociado con un aumento en la tasa respiratoria de las semillas (Eastmond y Graham, 2001). Así la movilización rápida al inicio de la germinación, podría llevar a la acetil-CoA hacia la respiración y reanudar la actividad de síntesis de ATP en la mitocondria, molécula necesaria para los procesos biosintéticos.

En plantas no se ha descrito como llegan los carbonos de la acetil-CoA a ser respirados antes de que se desarrolle totalmente el ciclo del glioxilato, sin embargo, en *S. cerevisiae* se ha encontrado que los productos de la degradación de los triacilglicerolos son bombeados a través del sistema carnitina/acilcarnitina, tanto en la mitocondria como en los peroxisomas. En plantas no se ha descrito la existencia del sistema de carnitina, lo que si se ha observado, por ejemplo en semillas de girasol y lechuga, es que los ácidos grasos son respirados durante la germinación, y que el ciclo del glioxilato no se encuentra funcional, ya que las dos enzimas clave del ciclo del glioxilato, la malato sintasa y la citrato liasa, aún no se han sintetizado (Raymond *et al.*, 1992, Salon *et al.*, 1988). Pero en *Sacharomyces cerevisiae*, el acetil-CoA producto de la β -oxidación en el peroxisoma se convierte a citrato y éste se transporta hacia la mitocondria.



En semillas mutantes de *Arabidopsis* denominadas icl-1 e icl-2, mutantes que son incapaces de sintetizar a la enzima isocitrato liasa, se encontró que las semillas presentan de 5 a 10 veces menos carbohidratos solubles, aumentan su tasa respiratoria, así como la cantidad de aminoácidos y ácidos orgánicos y se encuentran degradando activamente lípidos a una tasa mayor que las plantas silvestres, pero llegan a germinar y establecerse como plantas (Eastmond y Graham, 2001). Lo que prueba que el ciclo del glioxilato no es necesario para que la germinación ocurra, e incluso para que se establezca la planta como organismo autotrófico. Sin embargo, cuando las plantas mutantes son crecidas en oscuridad, las semillas germinan pero son incapaces de desarrollarse, ya que necesitan un aporte de carbono adicional, que en el caso de las plantas que estuvieron expuestas a la luz lo obtienen de la iniciada actividad fotosintética en las hojas.

Si consideramos entonces que los lípidos degradados son respirados, la otra reserva de carbono importante en la semilla de *D. viscosa*, que funcionará en la biosíntesis de los nuevos compuestos que necesita la semilla para llegar a germinar, son los carbohidratos y principalmente la sacarosa. Respecto a la movilización de sacarosa, encontramos que las semillas control movilizan la sacarosa a una velocidad de 0.872 mg glucosa/ g tejido día, mientras las semillas que fueron tratadas con priming mostraron nuevamente un adelanto en la movilización de las reservas durante la germinación, aunque partieron de contenidos similares de sacarosa, la velocidad de uso del carbohidrato fue mayor y más aun en las semillas del lote que pasó por el priming en claro (2.12 mg glucosa/ g tejido día , 12h), y se estabiliza entre las 24 y 72h en un contenido de sacarosa de 0.711 mg /g tejido. El lote que transcurrió por el priming de bosque degradó la sacarosa durante la germinación más lentamente que las semillas tratadas con priming en claro, pero alcanzó a las 72h un valor final de sacarosa similar y 1.57 veces menor que en el lote control. El aumento en la tasa de degradación de la sacarosa llevó a la semilla tratada con priming a presentar contenidos más elevados de fructosa y glucosa en



las primeras 24h de la germinación. Ninguna de las hexosas llegó a cero, lo cual es lógico si tomamos en cuenta, que estos carbohidratos además de ser fuente de carbono y energía, proporcionan la osmolaridad necesaria a la célula para mantener su turgencia.

En semillas de maíz se ha observado que la sacarosa se moviliza rápidamente en las primeras 8 horas de la germinación, con una disminución del 60% de la sacarosa que se encuentra en el eje embrionario, pero a las 24 horas comienza de nuevo a incrementarse, justo cuando la degradación de lípidos es máxima, lo anterior demuestra que la sacarosa es el carbohidrato que se utiliza en el metabolismo de la semilla posterior al periodo germinativo y que se mantiene a través de la reserva de lípidos (Martínez, 2007). En nuestras semillas de *D. viscosa*, sólo observamos la disminución de sacarosa, pero es probable que aún cuando no la veamos, la síntesis de sacarosa pueda estar ocurriendo de manera discreta, ya que el balance es negativo para la sacarosa, y es probable que si se realizara la medición de sacarosa a tiempos más prolongados podríamos observar que la sacarosa se incrementa.

7.3. Efecto del priming en el catabolismo de la sacarosa

En vista de que la degradación de la sacarosa es activa durante la germinación, determinamos la actividad de las enzimas que son más importantes en su movilización. La sacarosa se degrada a través de dos enzimas, la sacarosa sintetasa y la invertasa, la primera al producir fructosa y UDPglucosa, se conoce como una enzima ahorradora de energía, ya que la glucosa se encuentra en una forma activada que no requiere la inversión de ATP. La UDPglucosa se puede utilizar en la semilla para la síntesis de nuevos componentes de la pared celular, mientras que la fructosa necesariamente tendrá que ser fosforilada para entrar a la vía glucolítica (Sturm y Tang, 1999). Por otra parte, la actividad de las invertasas proporcionará glucosa y fructosa, estos carbohidratos podrán ser utilizados por el metabolismo, ya sea para entrar al ciclo de las pentosas, ya que se hace necesaria la producción de ribosas y NADPH



para la síntesis de nucleótidos y comenzar la reparación y síntesis de DNA y otros nucleótidos como RNA y coenzimas; además de la xilulosa que se usa en la síntesis de pared celular. Por otro lado, las hexosas pueden continuar con la vía glucolítica para sintetizar intermediarios biosintéticos (ciclo de Krebs) o bien enlaces de alta energía (ATP o NADH).

La actividad de hidrólisis de la sacarosa se vuelve entonces necesaria para que la germinación proceda. Las invertasas son enzimas que presentan diferente localización subcelular, las que se han caracterizado como importantes en favorecer o potenciar la entrada de nutrientes hacia las células son la invertasa vacuolar y la invertasa de pared celular. La invertasa vacuolar es capaz de degradar de manera activa a la sacarosa almacenada de manera transitoria en la vacuola, de tal forma que al degradarse la sacarosa, las hexosas producidas pueden ser transportadas hacia el citoplasma para su metabolismo. Pero al degradarse la sacarosa, la célula percibe que hay una disminución en su contenido y esto favorece la entrada de más sacarosa a la célula y a la vacuola, es por ello que se dice que la invertasa vacuolar favorece la demanda de fotosintatos (Roitsch, 2004).

Al medir la actividad de la invertasa vacuolar encontramos que las semillas control aumentan la actividad de la enzima en las primeras 12h de germinación (4.1 veces) y posteriormente a este tiempo se mantiene constante y vuelve a incrementarse ligeramente a los 3 días de la germinación; lo cual muestra que la actividad de la invertasa vacuolar es necesaria para la movilización de las reservas almacenadas en la vacuola. Al realizar el tratamiento de priming, la actividad de la invertasa vacuolar se incrementa, sin embargo, presenta diferencias importantes en cuanto a la forma de la curva y la magnitud del incremento, si el priming fue en bosque o en claro. En el primer caso (bosque), las semillas, desde un inicio y durante los tres días que se germinaron, mantuvieron un incremento gradual en la actividad de la enzima, lo cual estará proveyendo de manera constante de hexosas al hidrolizar la sacarosa que está en la vacuola.



Esta mayor actividad podría deberse a que durante el tiempo del priming se hubiera sintetizado mayor cantidad de proteína o de alguna isoforma para la enzima y por tanto esto nos lleva a una mayor actividad de invertasa, o bien a que la enzima que se encontraba en la semilla seca, al comenzar la hidratación, tomó la conformación óptima para su actividad, o bien la enzima fue modificada covalentemente para ser más activa durante el periodo germinativo, aunque para la invertasa no se ha documentado la modificación covalente, pero lo que sí se sabe es que existe un inhibidor proteico de la enzima (Roitsch, 2004).

En cuanto a la expresión diferencial de isoformas de enzimas, se ha documentado cuando menos en maíz, que el producto del gen de la *Invr1* disminuye gradualmente al cultivar células en suspensión durante 48h, mientras que la *Invr2* se reduce después de 18 h de cultivo. El regreso a los niveles normales del transcrito para ambos genes se produce cuando son colocadas a crecer las células en sacarosa, por lo que la regulación de la expresión de las diferentes isoformas depende de la disponibilidad de su sustrato (Xu et al., 1996). Si relacionamos que durante la germinación de las semillas de *Dodonea* que fueron sometidas a priming en bosque, hay un aumento constante en la concentración de glucosa y que esto coincide con el aumento sostenido en la actividad de la enzima, podríamos especular que alguna forma de invertasa se encuentra regulada positivamente por la glucosa.

Respecto a la modificación de la actividad por la presencia de la proteína inhibidora de la invertasa, podría haber ocurrido una disminución en la expresión de esta última, lo que nos llevaría a un aumento en la actividad de la invertasa. Sin embargo, hay pocos estudios sobre la proteína inhibidora y aún no se ha establecido con certeza el papel de ésta en la fisiología de la planta (Rausch y Greiner 2004).



Por otra parte, las semillas que pasaron por el priming natural en claro presentaron un máximo de actividad a las 12h que fue de 5.1 veces con respecto al control, y posteriormente disminuyó a valores cercanos aunque ligeramente más altos que los del control. El aumento inicial tan grande en la actividad de la invertasa vacuolar de las semillas tratadas con priming en claro, explica porque a las 12h en estas semillas encontramos un aumento importante en fructosa y una disminución en el contenido de sacarosa, y es posible que haya ocurrido una movilización elevada de la sacarosa a las 12h, por lo que la posterior caída de la actividad podría sugerir que ya no se hace necesaria su actividad porque ya movilizó la sacarosa almacenada en la célula. El aumento transitorio en la actividad de la enzima podría deberse nuevamente a la presencia de una isoforma más activa, o bien a cambios en los niveles de los diferentes carbohidratos que puedan regularlas. El máximo nivel de actividad que encontramos a las 12h coincide con el pico máximo de contenido de glucosa a ese tiempo, lo que sugiere que las hexosas están aumentando en el citosol y son disponibles al metabolismo, también encontramos que es el punto en el que se degradó más rápidamente la sacarosa y posterior a este tiempo ya no hay cambio en el nivel de sacarosa y disminuye el de la actividad de la invertasa vacuolar. La disminución en la actividad podría explicarse por la disminución en la concentración de su sustrato, la sacarosa, y también a que el incremento grande en glucosa en un tiempo previo, podría ser la señal para apagar la transcripción del gene. Por lo que debe de haber una regulación coordinada entre la disponibilidad de azúcares (glucosa o sacarosa) y la transcripción del gene.

En cuanto a la invertasa de la pared celular, también se encontraron incrementos en la actividad de éstas cuando las semillas fueron tratadas con priming, que conllevan a un patrón de actividad diferente al de las semillas control. Se observó que las semillas control mantuvieron una actividad baja y constante de sus invertasas de pared celular, lo que nos hace pensar que tal vez no se necesite aún de reservas externas que requiera que estas enzimas se encuentren



activas o bien que no se hayan emitido las señales que conlleven a funcionar a las mismas, ya que se sabe que las invertasas de pared celular están reguladas por estímulos ambientales, como es la respuesta a factores de estrés de tipo biótico y abiótico (Koch, 2004). En este sentido, la regulación de la actividad de las invertasas, que generalmente es en aumento en la actividad, se produce cuando hay un cambio en la concentración de diferentes carbohidratos, como glucosa y sacarosa. En los casos en los que no se ha observado cambio en la actividad, se ha propuesto que el tejido examinado presenta de por sí contenidos altos de azúcares o bien es un tejido almacenador, por lo que cambios discretos en la concentración de carbohidratos no afectan la actividad de la enzima. Sin embargo, cuando un tejido no es almacenador sino que se encuentra en activo crecimiento, pequeñas modificaciones en el contenido de azúcares sí impactan en un aumento en la transcripción del gene (Koch, 2004 y Sturm 1999).

En nuestro caso, las invertasas de la pared celular de las semillas que fueron tratadas con priming natural, están respondiendo a los cambios en los contenidos de glucosa y sacarosa, y debido a que estas semillas (las tratadas con priming) han pasado por un proceso de estrés como es la sequía o bien demás situaciones ambientales adversas, es probable que la semilla encienda los sistemas enzimáticos que requiere y que el suministro de nutrientes se esté llevando a cabo en este estadio de desarrollo.

Al igual que lo observado para la invertasa vacuolar, la actividad de la invertasa de pared celular mostró comportamientos diferentes entre los dos tratamientos de priming, uno mostrando un pico de actividad máximo y otro un aumento constante en la actividad. Cuando se lleva a cabo el tratamiento de priming en claro se obtiene el máximo en la actividad a las 24h que llega a ser 43.1 veces mayor que el control y la posterior disminución alcanza valores similares a los que presentan las semillas control. Mientras que la curva que presentaron las semillas del priming en bosque no presentó diferencias con respecto al control hasta las 24h de



germinación, pero a partir de las 48h la actividad se incrementa hasta 22.7 veces y continua en aumento durante el resto del periodo germinativo. Las diferentes condiciones que caracterizan a los ambientes en los cuales se llevó a cabo el priming, claro y bosque, pueden ser la principal causa por la cual se observan estas diferencias en la actividad de las invertasas de pared celular, ya que se ha reportado que las invertasas responden a estímulos ambientales así como a la presencia de patógenos, lo que nos indica la importancia de las invertasas de pared celular para la sobrevivencia y aclimatación de las semillas (Koch, 2004).

El priming en bosque le permite a la semilla responder al menos en la movilización de carbono mediada por invertasas, de manera gradual y sostenida, ya que sus dos invertasas ácidas, responden de igual manera. Mientras que las semillas que fueron sometidas al priming en claro, muestran un pico de actividad de sus invertasas ácidas, a tiempos y magnitudes distintas, pero con un comportamiento de actividad máximo transitorio. Esto nos habla de que la respuesta al estímulo ambiental, como se mencionó, es distinta y que la movilización de sacarosa a través de las invertasas es un buen marcador de que el ambiente puede ayudar o cambiar la expresión de las enzimas germinativas para poder contender con el estrés que a la semilla o joven plántula le depara.

Por otro lado, se sabe que la función de esta enzima no sólo es de proveer de carbohidratos o sustancias heterotróficas para el crecimiento, sino también esta a cargo de mantener un balance entre el contenido de sacarosa y hexosas requerido como mecanismos de señalización que regulan el desarrollo de las plantas (Roitsch, 2004), por lo cual una vez que la semilla ha germinado y hasta que se establezca como un organismo autotrófico necesita el importe de nutrientes provenientes de la movilización de reservas externas, que pueden estar siendo importados debido a la alta actividad de la invertasa de pared celular, pero sobretodo por la producción de las hexosas, glucosa y fructosa, que al ser transportadas al citoplasma,



mediante transportadores de hexosas, pueden generar señales o aumentar la actividad de otras enzimas celulares que son necesarias para el establecimiento de la plántula (Sherson *et.al.*, 2003).

La actividad de las invertasas resultaron ser entonces un buen marcador de que el priming aceleró la movilización de las reservas de carbono, preparando a la semilla para su posterior etapa de desarrollo, la planta en crecimiento, así como para las condiciones cambiantes del ecosistema en el que sobrevivirá.



8. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo que la sacarosa se encuentra en valores menores en la semilla seca de *D. viscosa* que fueron sometidas a priming. Aún cuando la tasa de degradación es similar, los valores de sacarosa siempre son menores en las semillas tratadas con priming en comparación con el lote control.
2. No se encontraron diferencias significativas en la movilización de almidón en los diferentes tratamientos y respecto al control.
3. El contenido de fructosa aumentó conforme avanzó la germinación en las semillas tratadas, lo que sugiere que hay una mayor degradación de sacarosa.
4. El contenido de glucosa aumentó en los tratamientos de priming, en tiempos discretos durante la germinación.
5. La actividad de las invertasas ácidas durante la germinación siempre fue mayor en los lotes de las semillas tratadas con priming.
6. La actividad de la Invertasa de pared celular aumentó desde el primer día de germinación a diferencia de la Invertasa vacuolar donde se vio disminuida su actividad al aumentar el tiempo de germinación.
7. El priming en claro produjo un aumento transitorio en ambas invertasas ácidas, aunque a tiempos distintos de la germinación. Mientras que el priming en bosque produjo aumentos graduales y por más tiempo de ambas invertasas ácidas.
8. El efecto del tratamiento pre-germinativo a las semillas de *Dodonea viscosa* (L.), como es el priming natural, fue acelerar el reparto de carbono medido como contenido de carbohidratos y actividad de invertasas ácidas, y es probable que los cambios observados en estas enzimas sean un reflejo de la actividad metabólica generalizada en la semilla durante la germinación.



9. PERSPECTIVAS

En vista de que las actividades de las invertasas vacuolares y de pared celular se encuentran aumentadas durante el priming natural, se deben medir los niveles de ARNm de estas enzimas y compararlas con otras semillas que también hayan sufrido priming natural o de laboratorio, tratando de encontrar si las invertasas ácidas son un buen marcador de que el priming natural ha ocurrido, y que las semillas que son sometidas a este tipo de tratamientos, van a ser más vigorosas cuando se les coloque en el campo a germinar.

Es necesario también, para completar el presente estudio, conocer si la sobrevivencia de las plantas que fueron sometidas a priming natural en bosque presentan diferencias notables respecto a las que fueron sometidas a priming natural en claro, para sugerir las posibles fuentes del aumento en el vigor de las semillas.

También se debe de investigar si las enzimas del metabolismo de los lípidos se encuentran afectadas y que pudieran también ser usadas como marcadores moleculares del priming y el vigor de las semillas.



10. BIBLIOGRAFIA

1. Benítez JL., 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. Instituto de Ecología, UNAM.
2. Bergmeyer HV, Bernt E. 1974. Sucrose. En *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol 3 (ed HV Bergmeyer), Academic Press, New York. 1176-1179 pp.
3. Bewley JD, Black M., 1994. *Seeds. Physiology of Development and Germination*. 2nd. edition. Plenum Press. N.Y. USA. 445 pp.
4. Bewley JD, Black M. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9:1055-1066.
5. Bewley JD. 2001. Plant storage products (carbohydrates, oils and proteins). In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd: <http://www.els.net/> [DOI: 10.1038/npg.els.0002047]
6. Bradford K., 2004. Germination: Imbibition, activation and reserve mobilization. In *Seed production and quality*. 85-94pp.
7. Cribb, A.B, Cribb, J.W. 1981. *Wild Medicine in Australia*. Collins, Sydney. Editorial Intl Specialized Book Service Inc. 228 pp.
8. Decagon Devices Application Note: AN4301-10, Water Potencial: The Key to Successful Seed Priming. 5 pp
9. Eastmond PJ, Graham, IA. 2001. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci*. 6: 72-77.
10. Gallardo K, Job C, Groot S, Puype M. 2001. Proteomic Analysis of Arabidopsis Seed Germination and Priming. *Plant Physiology*. 126:938-948.
11. Ghosh S, Gepstein S, Heikkila JJ, Dumbroff EB. 1988. Use of a scanning densitometer or an ELISA plate reader for measurement of nanogram amounts of protein in crude extracts from biological tissues. *Anal Biochem*. 169:227-33.



12. González-Zertuche L, Gamboa A, Sánchez-Coronado E, Aguilera P, Orozco-Segovia A. (2001). Natural Priming of *Wigandia urens* seeds during burial: effects on germination, growth and protein expression. *Seed Sci. Res.* 11:27-34.
13. Koch K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Plant Biol.* 7:235-246.
14. Martínez V. 2007. Expresión de la actividad de las invertasas ácidas en la germinación de tejido embrionario de maíz en carbohidratos metabolizables y su relación con el contenido de carbohidratos. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
15. Moreno N P. 1984. Glosario botánico ilustrado. Compañía editorial continental, S.A. de C.V. México D. F. 300 pp.
16. Pelleschi S, Rocher JP, Prioul JL. 1997. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant Cell Environ.* 20: 493-503.
17. Plata-Álvarez, M. A. 2002. Estudio ecofisiológico de la germinación de dos especies arbustivas del Pedregal de San Angel *Dodonaea Viscosa* (L.) Jacq. (sapindaceae) y *Senna multiglandulosa* (Jacq.) Irwin y Barnaby (Caesalpinaceae). Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM. 71pp.
18. Ramírez, T., 2007. Estrés hídrico altera el reparto de carbono en tejidos fuente y demanda de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) Tesis de Maestría en Ciencias (Bioquímica). Facultad de Química, UNAM.
19. Raymond P, Spiteri A, Dieuaide M, Gerhardt B, Pradet A. 1992. Peroxisomal β -oxidation of fatty acids and citrate formation by particulate fraction from early germinating sunflower seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 30: 153–161
20. Rausch T, Greiner S. 2004. Plant protein inhibitors of invertases. *Biochim. Biophys. Acta* 1696: 253– 261
21. Roitsch T, Balibrea ME., Hofmann M., Proels R., Sinha AK. 2003. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Botany.* 54: 513.524.



22. Roitsch T, González MC. 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 9: 606-613.
23. Rojas A, Cruz S., Ponce-Monter H., Mata R. 1996. Smooth muscle relaxing compounds from *Dodonaea viscosa*. *Planta Médica.* 62:154-159.
24. Salon, C. Raymond P, Pradet A. 1988. Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos. *J. Biol. Chem.* 263: 12278–12287.
25. Sánchez J, Calvo E, Orta R, Muñoz B. 1997. Tratamientos pregerminativos de Hidratación-deshidratación para semillas de pepino (*Cucumis sativus L.*). *Acta Bot. Mex.* 38:13-20.
26. Sánchez J, Calvo E, Orta R, Muñoz B. 2001. Tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de las semillas y sus efectos en plantas de interés agrícola. *Agronomía Costarricense.* 25: 67-92.
27. Sherson M., Alford H., Forbes S., Wallace G., Smith S. 2003. Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *J. Exp. Botany.* 54:525-531.
28. Srivastava LM. 2002. Plant Growth and development. Hormones and environment. Academic Press, Sand Diego, CA, Estados Unidos. 447-464, 503-519 pp.
29. Sturm A., Tang GQ., 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* 4:401-407.
30. Weschke W, Panitz R, Gubatz S, Wang Q, Radchuck R, Weber H, Wobus Y. 2003. The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant J.* 33: 395-411.
31. Xu J, Avigne WT, McCarty DR, Koch KE. 1996. A similar dichotomy of sugar modulation and developmental expression affects both paths of sucrose metabolism: Evidence from a maize invertase gene family. *Plant Cell* 8: 1209-1220.



-
32. Zheng G, Wilen R, Slinkard A, Gusta L. 1994. Enhancement of canola seed germination and seedling emergence at low temperature by priming. *Crop Sci.* 34:1589-1593.