

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Los genes de la familia DUF642, *At3g08030* y *At5g25460*,  
marcadores moleculares de envejecimiento y acondicionamiento  
natural de semillas de *Arabidopsis thaliana* y de especies silvestres

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**LUZ ELENA GARZA CALIGARIS**

Tutora: Dra. Alicia Gamboa de Buen, Instituto de Ecología UNAM

Miembros del Comité Tutor:

Dra. Sobeida Sanchez Nieto, Instituto de Química, UNAM

Dra. Ana Elena Mendoza Ochoa, Instituto de Ecología, UNAM

**MÉXICO, D.F. AGOSTO DEL 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Los genes de la familia DUF642, *At3g08030* y *At5g25460*,  
marcadores moleculares de envejecimiento y acondicionamiento  
natural de semillas de *Arabidopsis thaliana* y de especies silvestres

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**LUZ ELENA GARZA CALIGARIS**

Tutora: Dra. Alicia Gamboa de Buen, Instituto de Ecología UNAM

Miembros del Comité Tutor:

Dra. Sobeida Sanchez Nieto, Instituto de Química, UNAM

Dra. Ana Elena Mendoza Ochoa, Instituto de Ecología, UNAM

**MÉXICO, D.F. AGOSTO DEL 2013**

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

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Diálogo Institucional y Formación, en su sesión ordinaria del día 22 de abril de 2013, se aprobó el siguiente juicio para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna GARZA CALIGARIS LUZ ELENA con número de cuenta 50511513 con la tesis titulada: "Los genes de la familia DUF412, At2g03030 y At5g05460, marcadores moleculares de envejecimiento y acondicionamiento natural de semillas de *Arabidopsis thaliana* y de especies silvestres", realizada bajo la dirección del Dr. ALICIA GAMBOA DE BUEN:

Presidente:	DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NETO
Vocal:	DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ
Secretario:	DR. ELIZABETH MARTÍNEZ SARAJAS
Suplente:	DR. CESAR MALLO FLORES ORTIZ
Secretaría:	DRA. BELVIA CASTILLO ARGÜERO

De otra particular, me es grato enviarle un cordial saludo

**ATENTAMENTE**  
"POR MIRAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 30 de julio de 2013

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
COORDINADORA DEL PROGRAMA

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

A CONACYT por el apoyo recibido con el número de becario 61135.

Este trabajo fue financiado por los proyectos PAPIIT IN22109 y IN200912 (AGB)

A Sobeida Sanchez Nieto y Ana Elena Mendoza Ochoa, miembros de mi comité tutor quienes contribuyeron con valiosas sugerencias y correcciones

A Alicia Gamboa de Buen por su gran apoyo académico y moral, ya que gracias a ella fue posible la realización de esta tesis

A mis compañeros de laboratorio quienes me alentaron y apoyaron en todo momento, en especial a Sandra Alvarado López, y Alexis Salazar Iribe

A Laura Castrejón que me auxilió en múltiples labores de laboratorio y campo

Dedico este esfuerzo a José de Jesús que aunque no está presente, me prestó sus alas para seguir adelante, a Itzel que estuvo a mi lado en todo momento y a Jesús Mosqueda quien me animó y enseñó que vale la pena continuar.

## CONTENIDO

---

• Resumen	9
• Introducción	13
• Justificación	15
• Antecedentes	
○ Germinación	16
○ Características de la familia de proteínas DUF642	23
○ Efecto del envejecimiento y deterioro de semillas	26
○ Efectos de los tratamientos de hidratación- deshidratación sobre la germinación	28
○ Bancos de semillas y acondicionamiento natural	37
• Hipótesis	41
• Objetivos	42
• Metodología	44
• Resultados	
○ Efecto de los diferentes tratamientos de acondiciona- miento sobre la germinación y la expresión de los genes de la familia DUF642 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	
▪ Germinación de las semillas control y tratadas con acondicionamiento hídrico y mátrico	53
▪ Expresión de <i>At3g08030</i> durante el desarrollo de la semilla y germinación	54
▪ Patrón de localización espacial de <i>At3g08030</i> de semillas control, con acondicionamiento hídrico y con acondiciona- miento mátrico	55
▪ Efecto de la temperatura del tratamiento pre-germina- tivo sobre la germinación	56
▪ Efecto de los pre-tratamientos de acondicionamiento en la germinación bajo condiciones de estrés	57



▪ Efecto de la deshidratación durante el tratamiento pre-germinativo sobre la germinación	57
▪ Determinación preliminar de la expresión de otros genes de la familia DUF642 en semillas control, con diferentes tratamientos pre-germinativos y germinadas	60
▪ Desempeño germinativo y detección del gen <i>At3g08030</i> de las semillas de <i>A. thaliana</i> almacenadas en el laboratorio	60
▪ Efecto del deterioro controlado sobre la germinación y la expresión de <i>At3g08030</i> de semillas de <i>A. thaliana</i>	62
○ <i>At3g08030</i> como marcador de envejecimiento de las semillas de <i>Wigandia urens</i> y <i>Buddleia cordata</i>	
▪ Efecto del acondicionamiento natural sobre la germinación	64
▪ Efecto del almacenamiento de semillas	66
▪ Patrones de Expresión en <i>Wigandia urens</i> y <i>Ceiba aesculifolia</i> : expresión de <i>At3g08030</i> durante el deterioro y/o envejecimiento de las semillas	67
○ Sobreexpresión de genes	
▪ Sobreexpresión de <i>At3g08030</i>	69
▪ Sobreexpresión de <i>At5g25460</i>	73
○ Análisis preliminar de los cambios en la expresión de genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> durante los tratamientos de acondicionamiento utilizando microarreglos	75
▪ Genes que aumentan su expresión	82
▪ Genes que reducen su expresión	89
• Discusión	93
• Conclusiones	101
• Bibliografía	102
• Anexos	112

## Resumen

---

El presente estudio abordó los eventos de acondicionamiento en ecosistemas naturales y su efecto en especies silvestres. Así mismo, se determinó el efecto del acondicionamiento mátrico en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* para tener un punto comparativo de los cambios de expresión de genes y evaluar si los genes ortólogos responden de la misma manera en especies silvestres.

La familia de proteínas DUF642 es exclusiva de espermatofitas y se encuentra muy conservada. Algunos genes de esta familia muestran cambios de expresión durante la germinación, por ello se planteó la importancia de estudiar estos genes en *Arabidopsis thaliana* y compararlos con lo que ocurre en especies silvestres.

Corroboramos que el acondicionamiento mátrico favorece la germinación, tanto de *Arabidopsis thaliana* como de *Wigandia urens* y *Buddleja cordata*. Así mismo encontramos que el gene *At3g08030* reduce su expresión significativamente en semillas envejecidas, tanto naturalmente por almacenamiento en el laboratorio, como a través de técnicas de deterioro controlado. Esta reducción ocurre tanto en semillas de la especie modelo como en *Wigandia urens* y *Ceiba aesculifolia*, por lo que este gene se propone como un marcador de envejecimiento de las semillas. Por otra parte, encontramos que el gene *At5g25460* en *Arabidopsis thaliana* se expresa únicamente en semillas con acondicionamiento mátrico, por lo que se propone como un marcador de acondicionamiento natural, aunque será necesario hacer los estudios correspondientes con otras especies de plantas.

Para ahondar en la función de estos genes de la familia DUF642 se realizaron estudios de sobreexpresión (SE). Aunque los resultados a este respecto son preliminares, éstos parecen indicar que SE25460 incrementa la tasa y reduce los tiempos medios de germinación. Por su parte SE08030 muestra incremento en los parámetros germinativos en las semillas que han recibido acondicionamiento hídrico.

También se realizó un análisis sobre los cambios de expresión de genes en semillas con acondicionamiento mátrico en *Arabidopsis thaliana* a través de la técnica de microarreglos. Aunque es necesario seguir profundizando en este tipo de estudios, encontramos que muchos de los genes que aumentan su expresión pueden estar relacionados con la reparación de los ácidos nucleicos. También encontramos una activación en el ciclo circadiano, lo cual indica inicio diferenciada de procesos metabólicos en los distintos tipos de acondicionamiento. En cuanto a los genes que reducen su expresión encontramos degradación de mRNA relacionado con el almacenamiento de reservas, la maduración de la semilla, el transporte de lípidos, dentro de los grupos más importantes.

La presente tesis representa uno de los primeros esfuerzos por avanzar en el conocimiento de la familia de proteínas DUF642. Lo planteado en esta investigación está siendo desarrollado en otros trabajos de investigación en el laboratorio de ecología Fisiológica del Instituto de Ecología de la UNAM con el fin de profundizar tanto en el estudio de esta familia de proteínas, como en el estudio de los procesos de acondicionamiento mátrico de semillas.

## Abstract

---

Seed germination is a vital event that has a crucial impact throughout the life of the plant. Plants have developed evolutionary strategies to survive as a species in a changing environment. One of those strategies is to remain in seed banks for different periods of time, until they detect suitable conditions to germinate. During this period seeds can suffer hydration-dehydration cycles, process named priming or natural conditioning. These processes have been widely studied for agricultural species using laboratory techniques (mainly, hydropriming, matric-priming, osmopriming). It has been demonstrated that priming (or conditioning) in many species improves germination parameters, especially for aged or deteriorated seeds.

This study deals with priming events in natural ecosystems and its effects in wild species. It also studies the effects in the model species *Arabidopsis thaliana*, in order to compare gene expression changes and to assess if orthologous genes respond equally in wild species.

DUF642 protein family is spermatophyte exclusive and its sequence remains highly conserved in all seed plant species. Some genes of this family change their expression during germination, for this reason we set the importance of studying these genes in *A. thaliana* and compare the results with wild species.

We confirmed that natural and matric conditioning enhances germination in the tested species: *Arabidopsis thaliana*, *Wigandia urens* and *Buddleja cordata*. We also found that the DUF642 gene *At3g08030* significantly reduces its expression in aged species, both in lab stored seeds and in those subjected to controlled deterioration experiments. This decrease in expression occurs in the model and in the wild species tested: *Ceiba aesculifolia* and *W. urens*. We suggest that this gene can be a molecular marker for seed ageing. We also found that the gene *At5g25460* in *A. thaliana* only expresses after matric

conditioning. We suggest this gene can be a molecular marker for this process.

In order to deepen our understanding of these genes, we constructed over expression (OE) transgenic plants. Our preliminary results show that OE25460 has a higher germination rate and a lower mean germination time; and OE08030 only shows increases in germination rate when primed. These over expression lines continue to be studied in the laboratory.

We also carried out microarray analysis to assess the expression changes in *A. thaliana* seeds with matric and hydric conditioning. Although it is necessary to continue with these experiments, we found that many genes that increase their expression could be related to nucleic acid repair. We also found circadian cycle activation. As for genes that reduce their expression, we found mRNA degradation associated to seed storage, seed ripening, and lipid transport, among others.

This thesis represents one of the first approaches in the study of the DUF642 family proteins. Findings in this research are being further developed in other laboratory studies.

## INTRODUCCIÓN

---

La germinación de las semillas es un evento crucial para la vida de las plantas, ya que el tiempo y lugar en donde ocurra este evento determina la posibilidad que tenga una planta para establecerse, crecer y reproducirse adecuadamente. A pesar de ser un proceso inicial en la vida de las plantas, puede afectar de manera dramática las condiciones de crecimiento a lo largo toda su vida.

Las semillas son estructuras de resistencia que, desde su liberación y hasta su germinación, están sujetas a condiciones diversas que pueden ser adversas en los ecosistemas. Por ello, a lo largo de la evolución, las semillas han desarrollado mecanismos que les permiten percibir el medio ambiente y ajustarse para enfrentar las condiciones externas de una manera más eficiente. El periodo previo a la germinación es de suma importancia para la mayoría de las especies, pues durante la estancia de las semillas en el suelo pueden ocurrir múltiples eventos fisiológicos incluyendo la maduración del embrión, ruptura de latencias endógenas y exógenas y adquisición de nuevas latencias (latencias secundarias). Además, la semilla interacciona de diversas maneras con múltiples factores bióticos y abióticos del medio: está sujeta a depredación, escurificación, intemperismo, interacción con hongos y bacterias, fluctuaciones de luz y temperatura, etc. El periodo de tiempo en el que las semillas permanecen en el suelo es muy variable, desde días hasta años, por lo que las semillas de las diferentes especies de plantas forman parte del banco de manera transitoria o permanente. En cualquier caso, los bancos de semillas son sumamente importantes para los ecosistemas, pues representan el pasado y el futuro potencial de una comunidad vegetal (Fenner, 2000; Thompson, 2000).

En las regiones tropicales, es común que existan lluvias ocasionales que provean a la semilla de pequeñas cantidades de agua seguidos de un periodo

de sequía. Estos ciclos de hidratación-deshidratación de las semillas permiten que se lleven a cabo algunos procesos relacionados con la germinación sin promover la protrusión de la radícula. Es durante estos momentos, de imbibición parcial, cuando ocurren diversos procesos que pudieran preparar a la planta para enfrentar el ambiente. En los estudios de transcriptomas se corrobora la presencia de una gran cantidad de elementos regulatorios que permiten a la semilla detectar las condiciones ambientales, tanto durante la fase de maduración, como en la etapa de imbibición (Carrera *et al.*, 2008), ambos procesos pueden ocurrir en el suelo. Este proceso de toma de agua previo a la germinación se ha definido como acondicionamiento natural o natural *priming* (González-Zertuche *et al.*, 2001; Gamboa de Buen *et al.*, 2006).

El efecto de los tratamientos de hidratación-deshidratación controlada o acondicionamiento (*priming*) ha sido estudiado principalmente con fines agronómicos y se ha demostrado que estos tratamientos son eficientes para revigorizar semillas envejecidas, acelerar y uniformar la germinación, acelerar los ciclos de las plantas e incrementar los rendimientos de los cultivos, sobre todo en condiciones adversas (Halmer, 2004). Estudios realizados con diferentes especies de plantas nativas y malezas, entre ellas *Wigandia urens*, *Buddleja cordata* y *Ceiba aesculifolia* han demostrado que el acondicionamiento natural promueve un incremento en la velocidad y la uniformidad de la germinación y un mayor vigor en las plántulas (González-Zertuche, 2005; Alvarado López, 2012). Así mismo, se promueven eventos metabólicos relevantes como la movilización de proteínas (Alvarado López, 2012) y la reducción en la actividad catalasa y concentración de peróxido de hidrógeno, moléculas involucradas en el deterioro de las semillas (Gamboa-deBuen *et al.*, 2006).

Se ha documentado que existen muchos cambios a nivel de proteínas durante los procesos de hidratación controlada. Algunos de estos eventos

como la movilización de proteínas implican el inicio de los procesos germinativos (Gallardo *et al.*, 2001), otros en cambio, como el aumento en la concentración de calalajas o de dehidrinas son procesos diferentes a los que ocurren durante la germinación (Gallardo *et al.*, 2011; Soeda *et al.*, 2005).



## JUSTIFICACIÓN

---

La permanencia de las semillas de algunas especies vegetales en un banco es una estrategia que aumenta sus probabilidades de establecimiento, ya que puede ser una etapa necesaria para asegurar la viabilidad de las semillas y modificar el desempeño fisiológico tanto de las semillas como de las plántulas en condiciones naturales, al generar mecanismos de compensación o de tolerancia a condiciones adversas específicas al microclima donde germinan y se establecen (González-Zertuche, 2005). Se ha estudiado la dinámica de los bancos de semillas en el Pedregal de Sn Ángel, (Martínez-Orea, et al, 2010) sin embargo, existen pocos estudios fisiológicos sobre el efecto de la permanencia de las semillas en el suelo en condiciones ecológicas y hay poca información sobre los efectos de estas variables en la expresión de genes.

En el presente trabajo se estudiaron los cambios en la expresión de algunos genes de la familia DUF642, familia exclusiva de plantas con semilla con patrones de expresión diferencial durante la germinación descritos para semillas de plantas cultivadas, durante el acondicionamiento mátrico y el natural en semillas de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, y en semillas de especies nativas (*W. urens*, *B. cordata* y *C. aesculifolia*). Esta expresión diferencial podría estar relacionada con las diferentes fases de la germinación y ser indicadores de cada una de estas. Los tratamientos de acondicionamiento promueven un avance en los procesos germinativos solo hasta la fase II de la germinación. Los genes de esta familia están muy conservados desde gimnospermas por lo que podrían constituir una herramienta molecular como marcadores tanto del acondicionamiento como del envejecimiento de la semilla.

## ANTECEDENTES

---

### Germinación

La germinación *sensu stricto* se define como el proceso desde el inicio de la imbibición de una semilla, hasta que el embrión (generalmente la radícula) emerge de cualquier tejido que lo rodea (Nonogaki *et al.*, 2007). Este importante evento se regula tanto por procesos ambientales como de desarrollo de semilla. Las hormonas juegan un papel primordial, especialmente el ácido abscísico (ABA) y las giberelinas (GA), pues “traducen” los cambios ambientales en señales para promover o inhibir la germinación (Fig. 1). El ABA es necesario durante la embriogénesis tardía y evita la germinación precoz mientras que las GA promueven la protrusión de la radícula. Los niveles activos de estas dos hormonas están finamente regulados y dependen tanto de la tasa de biosíntesis como de su inactivación. Esta regulación depende de la integración de múltiples señales ambientales. En *Arabidopsis thaliana* se han identificado genes que están involucrados en la regulación y la biosíntesis e inactivación de ABA (50) y de GA (22). En este proceso también intervienen otras hormonas como el etileno, los brasinoesteroides (BRs), las citocininas y las auxinas, aunque de forma menos determinante. Así se establece una compleja red regulatoria que permite a la semilla estimar e integrar los diferentes factores ambientales y germinar en el momento más favorable.

La luz es un factor muy importante en la germinación de semillas fotoblásticas positivas, como *A. thaliana*. En particular la proteína PIL5 reduce su concentración con la luz y ésta también regula la expresión de dos inhibidores de GA (DELLA). PIL5 también aumenta la concentración de ABA al activar algunos genes dentro de la biosíntesis de esta hormona e inhibir genes que la catabolizan (Oh *et al.*, 2007).

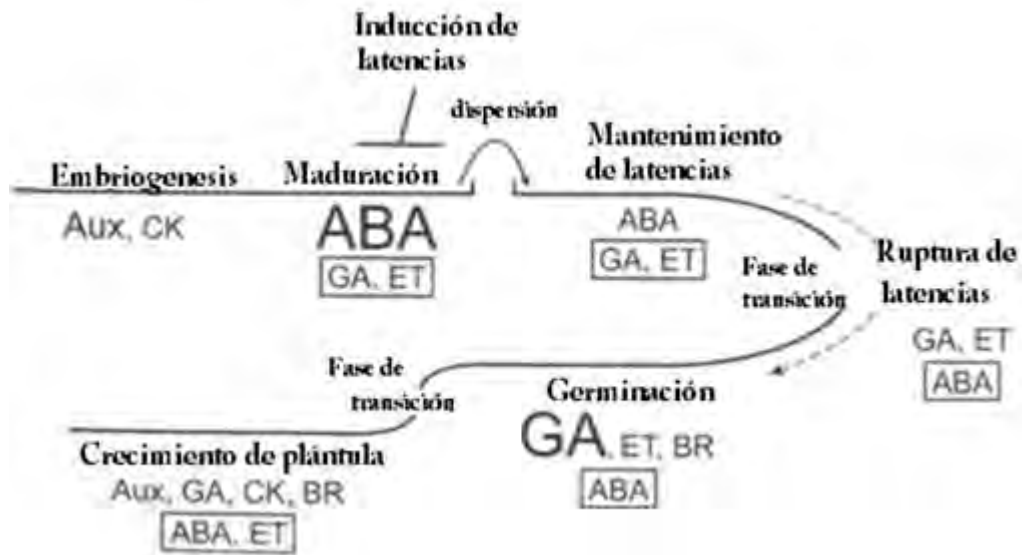


Figura 1: Participación de hormonas durante el desarrollo de las semillas, mantenimiento de latencias, germinación y crecimiento de la plántula. Tomado de Feurtado y Kermode, (2007).

La germinación inicia con la imbibición (Fig. 2). Este es un proceso físico que depende del potencial mátrico de los componentes de la semilla y del medio que la rodea. Por lo general, las semillas viables muestran un patrón trifásico de imbibición en donde ocurren múltiples procesos como a continuación se describe (Figura 2).

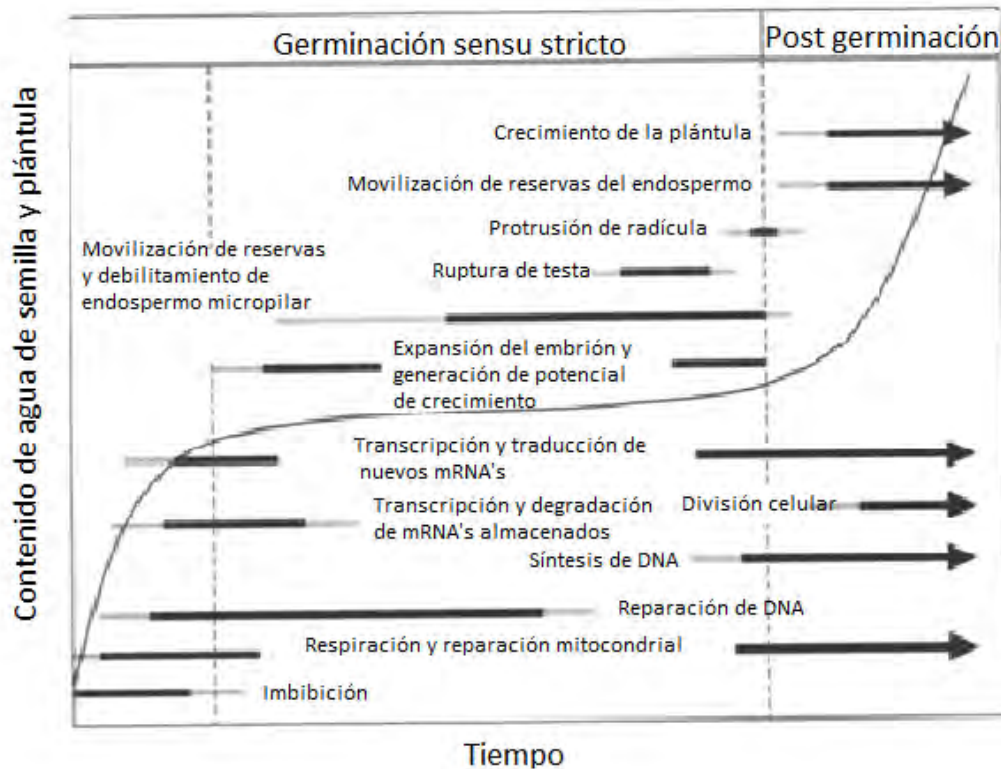


Figura 2: Procesos metabólicos y moleculares involucrados en las diferentes fases de la germinación. Tomado de Nonogaki *et al.* (2007).

Son varios los factores que controlan la imbibición en la fase uno. En primer lugar, la permeabilidad de las cubiertas seminales que puede contener células lignificadas y cubiertas serosas. Es necesario que el intemperismo y la escarificación reblandezcan estas estructuras antes de que penetre el agua. Posteriormente el agua entrar a los tejidos de la semilla, sin embargo, la distribución de ésta no es uniforme, ya que el potencial mátrico y el contenido, especialmente reservas de lípidos o vacuolas, de cada tipo celular provoca una imbibición diferencial. Por lo general existen regiones de mayor acumulación de agua, que en muchas especies es la región micropilar y la punta de la radícula (p. e. tomate, pino, tabaco). Por otra parte, la entrada de agua también depende de la presencia de proteínas que formen canales (acuaporinas).

Durante la fase dos, la velocidad de entrada de agua disminuye debido a la turgencia de las células que contrarresta el potencial osmótico externo. En este momento el potencial hídrico interno es contenido por las paredes celulares evitando la elongación, hasta que, más avanzado el proceso, la pared reciba las señales necesarias para relajarse y permitir el aumento de tamaño. Por otra parte, los tejidos que envuelven al embrión, también ejercen una fuerza de contención que evita que las células embrionarias crezcan. Este proceso mecánico ocurre tanto en semillas muertas, como en las viables, tengan o no latencia.

También se puede limitar la entrada de agua a las semillas si el medio tiene un bajo potencial osmótico. En este caso, se prolongarán las etapas uno y dos, y los procesos metabólicos serán más lentos, aunque eventualmente culminen con la protrusión de la radícula (Bradford y Trewavas, 1994). Esta imbibición a bajos potenciales osmóticos es la base del acondicionamiento y ocurre también durante el acondicionamiento natural en los bancos de semillas del suelo. Los estudios mediante técnicas de microarreglos han mostrado que la mayoría de los genes que cambian su expresión durante la germinación, muestran los mismos patrones durante el acondicionamiento (Gallardo *et al.*, 2001; Soeda *et al.*, 2005). Sin embargo, hay un pequeño número de genes cuyos patrones de expresión cambian, entre ellos están proteínas que confieren resistencia a la oxidación, proteínas relacionadas con procesos de estrés como anoxia y resistencia a patógenos.

La germinación implica un cambio drástico en el metabolismo de las semillas. Durante la germinación *sensu stricto* los principales procesos que se han documentado incluyen: movilización de proteínas, azúcares y lípidos, aumento en respiración, reparación de membranas externas e internas, reparación de nucleótidos, fotosíntesis, traducción y transcripción. Así mismo se lleva a cabo

la activación de las principales de las vías metabólicas: glucólisis, ciclo tricarboxílico, vía de las pentosas, degradación de proteínas y lípidos y síntesis de aminoácidos (Weitbrecht *et al.*, 2011). Aunque se ha demostrado que la transcripción no es indispensable para que ocurra la germinación, ya que en la semilla se acumula RNA que se utilizará en la germinación (Rajjou *et al.*, 2004; Kimura y Nambara, 2010), múltiples estudios a nivel de transcriptoma documentan grandes cambios en la expresión de genes (Weitbrecht *et al.*, 2011; Bassel *et al.*, 2008; Carrera *et al.*, 2008; Soeda *et al.*, 2005).

Las plantas responden a los ciclos de luz/oscuridad ajustando muchos de sus procesos fisiológicos. Schaffer, *et al.* (2001) han demostrado que hasta el 11% de los genes de *A. thaliana* presentan cambios cíclicos en periodos de 24 horas. En la semilla, el ciclo circadiano se encuentra congelado y durante la germinación ocurren cambios en los genes relacionados con este proceso. Zhang *et al.* (2007) demostraron que la expresión constitutiva de CIR, proteína relacionada con la desactivación del ciclo circadiano, afecta severamente la germinación de *A. thaliana*.

### ***Modificaciones en la pared celular durante la germinación***

La protrusión de la radícula implica el aumento en tamaño de las células del eje embrionario. Para que se lleve a cabo este crecimiento celular es necesario que aumente la presión de turgencia interna que lleva a las paredes celulares a expandirse y elongarse. En las semillas, esto ocurre debido a la rápida toma de agua durante la imbibición. Esta hidratación celular está regulada inicialmente por las cubiertas seminales y posteriormente por el endospermo que rodea al embrión. El endospermo, una estructura rica en reservas que provee al embrión de energía para la germinación, también controla el tiempo de emergencia de la radícula, ya que debe degradarse, al

menos parcialmente en el área micropilar, para que la radícula logre abrirse paso. Esta degradación implica, además de una actividad lítica en toda la célula, la activación de mecanismos de reblandecimiento y degradación de las paredes celulares.

La pared de los diferentes tipos celulares que componen las semillas está constituida por la pared primaria y la lámina media. La pared primaria es un esqueleto rígido de fibras entremezcladas: celulosa, hemicelulosas (xiloglucanos), pectinas y proteínas de diferentes familias. Cada malla de fibras forma enlaces cruzados que confiere rigidez a la pared: las microfibras de celulosa se unen entre sí por medio de los xiloglucanos, las pectinas interaccionan entre sí principalmente por puentes de calcio y algunas glicoproteínas ricas en (hidroxi)prolina (HRGPs), predominantemente extensinas, que se entrecruzan a través de derivados de tirosina.

Durante el proceso de imbibición, la fuerza de turgencia interna promueve la expansión de la pared. Para que esto ocurra, son necesarias modificaciones en las paredes celulares que permitan un relajamiento. Algunas proteínas de pared como glucosil-hidrolasas, expansinas, manasas, poligalacturonasas y pectin-metil-esterasas posiblemente están involucradas en estos procesos, ya que su expresión aumenta durante la germinación (Gallardo *et al.*, 2001; Soeda *et al.*, 2005; Carrera *et al.*, 2008). Endo *et al.* (2012) han reportado aumentos en la expresión de extensinas, xiloglucanos, manasas y proteínas del tipo de celulosa sintetasa en el endospermo de semillas de *A. thaliana* imbibidas durante 24 horas. Por otro lado, Ren y Kermode (2000) reportaron un aumento en la actividad de la pectin metil esterasa durante la ruptura de la latencia y la germinación de *Chamaecyparis nootkatensis* (cedro amarillo). Asimismo, Kanai *et al.* (2010) demostraron que las poligalacturonasas pueden regular el tiempo de protrusión de la radícula, ya que la degradación de la pectina del endospermo es un requerimiento para que se lleve a cabo la germinación. Dicho proceso de degradación está finamente regulado por ABA

y ABI5. Durante la estratificación la semillas de *A. thaliana* presentaron una dramática reducción en la concentración de ABA sin que ocurra la ruptura de la testa, mientras que en las primeras horas de imbibición, la disminución en la concentración de ABA se correlaciona con la ruptura de la testa. De igual manera, el aumento en ácido giberélico durante la imbibición se correlaciona con la ruptura de la testa (Weitbrecht *et al.*, 2011).

### **Características de las proteínas de la familia DUF642**

La familia DUF642 es una familia de proteínas asociadas a pared celular exclusiva de espermatofitas (Vázquez-Lobo *et al.*, 2012). Todas las proteínas de esta familia presentan un único dominio que incluye un posible sitio de unión a carbohidratos y un péptido señal que las dirige hacia la pared celular (Irshad *et al.*, 2008). Algunos miembros de la familia, como *At3g08030* y *At1g29980*, presentan una edición alternativa que determina que se generen dos formas proteicas, con y sin péptido señal.

Miembros de esta familia han sido encontrados en todos los tejidos de *A. thaliana* incluyendo células en suspensión. En particular, la proteína *At3g08030* ha sido encontrada en proteomas de pared celular de hojas y tallos, apoplasto y células en suspensión (Fig 3). Por otro lado, esta proteína interactúa *in vitro* con celulosa mientras que las proteínas *At5g11420* y *At4g32460* interaccionan *in vitro* con una pectin metil esterasa (PME, *At3g14310*) cuya función está relacionada con modificaciones en la estructura de la pared (Vázquez-Lobo *et al.*, 2012; Zúñiga Sánchez, 2007).



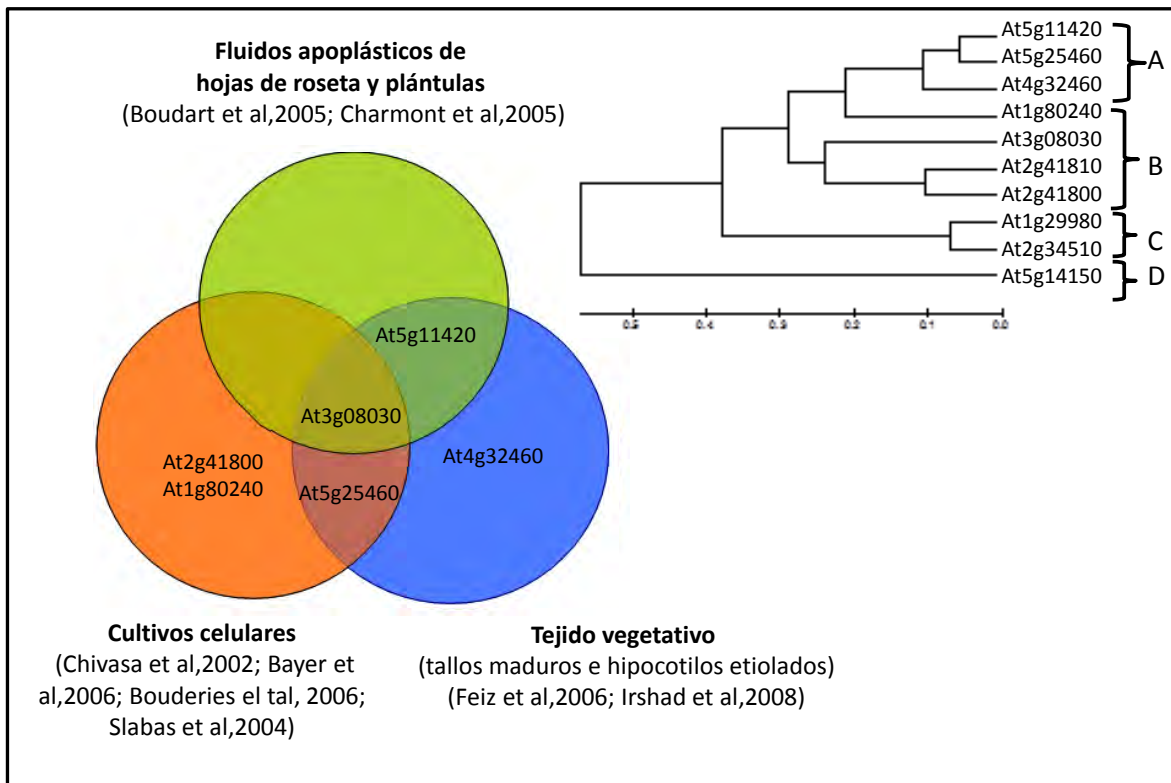


Figura 3. Proteínas DUF642 presentes en diferentes proteomas de pared celular. Tomado de Zúñiga-Sánchez y Gamboa-deBuen (2009.).

La participación de la familia DUF642 en la germinación no solo ha sido sugerida por la disminución o incremento de su expresión por efecto de las hormonas. En *Brassica oleraceae*, la expresión de los genes *At3g08030* y *At5g25460* de esta familia aumenta en semillas tratadas con acondicionamiento hídrico y osmótico; y durante la germinación hay un aumento en la expresión de *At4g32460* (Soeda *et al.*, 2005). La posible participación de las proteínas de la familia DUF642 en la germinación también se sugiere por estudios realizados en cebada. Sreenivasulu *et al.* (2008) utilizando microarreglos reportan una expresión diferencial a lo largo del desarrollo de la semilla y la germinación de 7 transcritos de genes correspondientes a la familia DUF642. Uno de los transcritos se expresa

únicamente al inicio de la formación de la semilla (4 días después de la floración), otro de los transcritos se expresa durante la formación de la semilla (4 a 25 días después de la floración), posteriormente deja de expresarse al inicio de la imbibición y se expresa nuevamente a las 48 y 72 horas de imbibición. Los otros cinco diferentes transcritos se expresan únicamente a las 48 y 72 horas de imbibición. La expresión de genes de la pared celular en semilla está fuertemente regulada por GA. La adición de esta hormona en semillas de plantas mutantes insensibles a giberelinas aumenta la expresión de expansinas, glucanasas, una PME y la proteína DUF642: *At4g32460* (Ogawa *et al.*, 2003). Esto indica que GA, al regular los genes que modifican a la pared celular, regula la germinación permitiendo el crecimiento de embrión, el avance del eje embrionario y la degradación de las cubiertas seminales (Nonogaki *et al.*, 2007).

Es muy posible que las proteínas DUF642, reportadas en los diferentes proteomas de pared celular, estén involucradas en los procesos de modificación de dicha estructura. En *A. thaliana*, la expresión de dos genes de esta familia *At4g32460* y el *At2g41800* se incrementa durante la germinación por efecto del ácido giberélico (Ogawa *et al.*, 2003). También se ha reportado en plántulas que el gene *At5g25460* se reprime por efecto de ABA (Xin *et al.*, 2005).

Gao *et al.* (2012) reportan que dos de los genes de la familia DUF642 responden al precursor del ácido ascórbico l-galactona 1-4lactona (GAIL). Con base en los resultados de fenotipo de mutantes de los genes *At5g25460* y *At1g80240*, los autores reportan que *At5g25460* tiene un importante papel en el crecimiento de hojas, raíces y de la plántula, aunque no determinan su función específica. Sun *et al.* (2009) indican que el tratamiento en frío (4°C por 4 y 24 horas) a plántulas de *A. thaliana* reduce la expresión del gene *At5g25460* considerablemente (cuando menos 25 veces) y que dicho gene también reduce significativamente su expresión en hojas senescentes

(Bruslan *et al.*, 2012).

## **Envejecimiento y deterioro de semillas**

El deterioro de las semillas depende de múltiples factores, tanto ambientales, como intrínsecos a las semillas. La mayor parte de las semillas de interés agrícola tienen períodos de viabilidad de entre 1 y 5 años cuando son almacenadas en ambientes no controlados (p.e.,, soya, ajo y girasol), mientras otras plantas pueden permanecer viables por períodos de hasta 20 años o más (frijol y jitomate). También hay ejemplos de semillas que permanecen viables durante cientos de años, como *Nelumbo nucifera* (loto sagrado), que ha logrado germinar después de 1,000 años de permanecer enterrado en un lecho de río (Shen-Miller *et al.*, 2002). En términos generales se ha documentado que semillas que provienen de especies de selvas tropicales tienen periodos de vida más cortos (semillas recalcitrantes) en comparación con especies de climas templados o de zonas áridas (semillas ortodoxas) (Vázquez-Yanes y Orozco-Segovia, 1993; Vázquez-Yanes y Orozco-Segovia, 1996; FAO,1983).

En general, las semillas almacenadas presentan un retraso en el inicio de la germinación, reducción en la tasa de germinación y en el vigor de las plántulas, especialmente bajo condiciones de estrés. El envejecimiento de las semillas puede tener efectos durante toda la vida de la planta.

La principal causa del deterioro de semillas es la auto oxidación. Este proceso genera radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) que ocasionan daño a las moléculas, membranas y organelos (Foyer y Noctor, 2005).

Los daños a las semillas envejecidas se han estudiado a través de técnicas de envejecimiento controlado, sometiendo a las semillas a condiciones de alta humedad y temperatura. Rajjou *et al.* (2008) mediante estudios proteómicos

comprobaron que las semillas envejecidas presentan un alto grado de oxidación en diferentes proteínas. Asimismo, las semillas envejecidas germinadas presentan diferencias en el patrón proteómico con respecto a las semillas sin tratamiento. Principalmente, reportan menor movilización de proteínas, menor número de proteínas de transporte de lípidos, menor cantidad de factores de iniciación de la traducción y menor traducción de proteínas.

Otro factor de deterioro importante es la oxidación de lípidos, sobre todo los que mantienen la integridad de las membranas. La lixiviación de iones de las semillas es un indicador de deterioro en las semillas.

Adicionalmente existen daños oxidativos al DNA. En girasol se encontró que la viabilidad de las semillas almacenadas estaba correlacionada con el contenido de humedad de las mismas y con la fragmentación del DNA (Maarouf-Bouteau *et al.*, 2011).

Se ha propuesto que las sustancias antioxidantes son factores que aumentan la vida de las semillas. La doble sobreexpresión de la super óxido dimutasa (CuZnSOD) y ascorbato peroxidasa (APX) disminuyó la lixiviación de iones y aumentó el desempeño germinativo en condiciones de estrés en semillas de *Nicotiana tabacum* almacenadas durante dos años (Lee *et al.*, 2010). La enzima L-isoaspartil metiltransferasa también ha sido propuesta como otro factor protector de envejecimiento, ya que actúa reparando daños en proteínas carboniladas. Esta enzima se encuentra en altas cantidades en las semillas longevas de *Nelumbo nucifera* y se ha correlacionado con una mayor longevidad en semillas de *Arabidopsis thaliana* (Ogé *et al.*, 2008). Otras moléculas que se han propuesto como factores que aumentan la longevidad de las semillas son las ligasas que están involucradas en la reparación de DNA (Waterworth *et al.*, 2010) o las dehidrinasa (Hundertmark *et al.*, 2011).

El conocer el estatus de germinación y vigor de las semillas almacenadas es

un elemento vital en las colecciones de semillas, tanto de uso agrícola y comercial, como en las colecciones de especies silvestres con fines de restauración o investigación. Para conocer esto, generalmente se recurre a hacer pruebas de germinación en lapsos de tiempo preestablecidos. Sin embargo, esto implica ensayos de varios días y el uso de cientos de semillas. Por ello, se han propuesto varios indicadores de edad y vigor de las semillas como: la concentración de catalasa (Leggat *et al.*, 2011) o el superóxido generado durante la imbibición (Liu *et al.*, 1997). Estos ensayos bioquímicos pueden arrojar datos en unas horas, como la peroxidación de lípidos sin embargo el requerimiento de semillas es alto. Otro método propuesto es la medición de gases. Éste es un método utilizado en investigación y se ha propuesto para el monitoreo de colecciones de semillas. Es un método no destructivo que mide la concentración de gases como etano, etileno, acetaldehído, etanol y CO<sub>2</sub> utilizando la cromatografía de gases y puede ser una medida indirecta de respiración, y peroxidación de lípidos (Colville, *et al.*, 2012).

### **Efectos de los tratamientos de hidratación-deshidratación sobre la germinación y crecimiento de plántulas**

A partir de los años setenta se comenzaron a desarrollar técnicas de hidratación-deshidratación de semillas de uso agronómico y forestal. Estos tratamientos consisten en proporcionar condiciones para la imbibición de las semillas propiciando que se activen procesos metabólicos y fisiológicos relacionados con la germinación, la tolerancia al estrés ambiental y la auto reparación celular, pero sin permitir la emergencia de la radícula. Posteriormente, las semillas pueden utilizarse en invernadero o el campo, o secarse hasta recuperar su estado de hidratación inicial y almacenarse para su posterior utilización (Sánchez *et al.*, 2001).

Actualmente, estas técnicas se utilizan con éxito en semillas de muchas hortalizas como jitomate, ajo y zanahoria, en algunas plantas de ornato y en

especies forestales como pino y oyamel, entre otras. Estas técnicas se aplican tanto a nivel comercial como en los sitios de cultivo. Por ejemplo, es común la práctica de imbibición en los invernaderos de producción de plántulas de arroz que luego se trasplantan al campo. También estas tecnologías se están difundiendo entre campesinos que cultivan en zonas de ambientes áridos y poco productivos en India y África para cultivos como algodón, maíz y garbanzo (Harris *et al.*, 2001; Murungu *et al.*, 2003).

Estas técnicas se han designado con diferentes nombres de acuerdo al objetivo principal que se persiga: acondicionamiento o “seed *priming*” busca aumentar la velocidad y porcentajes de germinación, así como mejorar el establecimiento y producción de la cosecha; la revigorización o “seed reinvigoration” se refiere a tratamientos efectuados a semillas envejecidas y pretende aumentar su vigor; y finalmente robustecimiento, endurecimiento o “seed hardening” se refiere a tratamientos para mejorar el desempeño en condiciones adversas (Sánchez *et al.*, 2001). También el término de “hardening” se utiliza cuando se somete a las semillas a varios ciclos de hidratación-deshidratación (Farooq *et al.*, 2007; Tajbakhsh *et al.*, 2004).

Para disminuir la actividad del agua y, en consecuencia, limitar la toma de agua se emplean soluciones osmóticas (acondicionamiento osmótico u “osmopriming”), partículas sólidas (acondicionamiento mátrico o “matriming”) o la adición de cantidades limitadas de agua a volúmenes exactos de semillas (“drum priming”). En otras técnicas, no se controla la cantidad de agua que entra a la semilla, sino el tiempo en el que permanecen en contacto (“hidropriming”).

**Acondicionamiento osmótico u Osmopriming:** Consiste en embeber a las semillas en soluciones con bajos potenciales hídricos, generalmente entre -0.5Mpa y -2.0Mpa. Comúnmente se requiere de aireación, pues las semillas permanecen sumergidas bajo el agua. Se utilizan polímeros de alto peso

molecular como polietilenglicol; sales como cloruro de calcio y potasio; nitrato y fosfato de potasio; sulfato de cobre, zinc y sodio y azúcares como manitol y sacarosa.

**Acondicionamiento mátrico o Matrimpriming:** Se emplean sustancias sólidas como arena, vermiculita o Micro-Cel E (silicato de calcio sintético con alta capacidad de retención de agua) o suelo como medio de soporte y de imbibición de semillas.

**Drum priming:** Se proporcionan volúmenes determinados de agua por aspersión o vaporización. Permite la hidratación de grandes cantidades de semillas a bajo costo y sin la producción de sustancias de desecho. Además no requiere sistemas de aireación. Se utiliza a nivel comercial.

**Acondicionamiento hídrico u Hidropriming:** Únicamente se embeben las semillas en agua y se controla el tiempo y la temperatura que permanecen en este estado. Este tiempo debe determinarse empíricamente para cada especie y lote de semillas. Sin embargo, se ha desarrollado un modelo matemático denominado tiempo de acondicionamiento hidrotérmico propuesto por Gummerson (1986) que pretende facilitar la determinación del tiempo de imbibición. Se calcula con la siguiente ecuación:

$$GR_{50} = GR_i + K'(T - T_{\min})(\Psi - \Psi_{\min}) tp$$

Donde  $GR_{50}$  es el tiempo en donde ocurre la mitad de la germinación total,  $GR_i$  es la tasa de germinación sin el tratamiento de acondicionamiento,  $T_{\min}$  y  $\Psi_{\min}$  son la temperatura y el potencial de agua mínimo en el cual el acondicionamiento de las semillas podría ocurrir;  $T$  y  $\Psi$  son la temperatura y el potencial hídrico inicial de agua que exceden las mínimas de estos factores y  $tp$  es la duración del tratamiento.

Este modelo supone que hay una temperatura y potencial hídrico por debajo de los cuales el tratamiento no tiene efectos. También supone que entre más

tiempo y mayor potencial hídrico más grande será el efecto.

Este modelo ha sido útil en algunos casos (Osbingol *et al.*, 1998). Sin embargo su uso no ha podido generalizarse, ya que en otras ocasiones la ecuación no predice los mejores tiempos de tratamiento. Bradford y Cheng (1999) probaron esta ecuación en semillas de jitomate (*Lycopersicum esculentum*) utilizando varios lotes a dos temperaturas del sustrato, tres potenciales hídricos y 6 tiempos de duración del tratamiento y concluyeron que hay poca relación entre los modelos y la germinación real obtenida. La fisiología y bioquímica de los procesos de acondicionamiento y germinación son complejos y en ocasiones responden de diferente manera a las variaciones de temperatura y potencial hídrico, sobre todo fuera de los límites óptimos de germinación. Por ello, en la mayoría de los casos, el tiempo del tratamiento se obtiene de manera empírica y varía drásticamente de una especie a otra, desde horas hasta meses, como lo reportan los siguientes trabajos. Para *Impatiens* spp la imbibición por 4 y 8 horas aumenta los porcentajes de germinación, mientras que tiempos de 24 y 36 horas la reducen y el remojo de una hora no tiene efecto (Li *et al.*, 2005). En cambio, para cuatro especies de abetos (*Abies amabilis*, *Abies lasiocarpa*, *Abies grandis*, *Abies procera*) el tiempo de tratamiento para obtener porcentajes de germinación del 79% o mayores fue de 4 a 8 semanas (Ma *et al.*, 2003). Así mismo las necesidades y variaciones de temperatura varían entre especies ya que también es necesario romper latencias. Para *Pinus monticola* el aumento en la temperatura de remojo a 27 °C durante 12 días antes de un tratamiento en frío húmedo reduce el tiempo medio de germinación a 20-30 días (Feurtado *et al.*, 2003).

**Acondicionamiento biológico o Biopriming:** Algunos investigadores han propuesto el uso de cultivos obtenidos a partir de la microbiota de la rizósfera para aumentar el vigor de las plántulas. Por ejemplo, Karthikeyan *et al.* (2007) utilizan este método para mejorar la germinación de *Catharanthus roseus*



(planta de ornato Vinca de Madagascar), además reporta que con este tratamiento aumenta la concentración de enzimas antioxidantes que protegen contra el envejecimiento de las semillas.

**Acondicionamiento natural:** En ecosistemas naturales, las semillas de diversas especies permanecen enterradas durante periodos variables de tiempo, formando bancos de semillas. En los diversos micrositios pueden ocurrir ciclos de hidratación-deshidratación que ocasionan cambios fisiológicos en las semillas, similares a los del acondicionamiento de laboratorio. Aunque estos procesos apenas comienzan a estudiarse, se propone el enterramiento en ecosistemas naturales como un procedimiento para aumentar las posibilidades de germinación y establecimiento de especies nativas utilizadas para restaurar sitios perturbados (González-Zertuche, 2005; Gamboa-deBuen *et al.*, 2006).

### ***Efectos del secado de las semillas después de los tratamientos de hidratación***

El secado de las semillas suele ser el paso más importante para mantener los efectos del acondicionamiento. Las condiciones ambientales para llevar a cabo un secado sin deteriorar las semillas ni perder la capacidad de almacenamiento varían de acuerdo con la tolerancia a la desecación de cada especie e incluso para cada lote, por lo que es necesario probar empíricamente cuáles son las mejores condiciones en cada caso.

Para diferentes especies se reportan diferentes condiciones de humedad y temperatura óptimas para el secado (Halmer, 2004; Demir *et al.*, 2005; Modi, 2005). Kikuti y Marcos-Filho (2008) encontraron que en *Brassica oleraceae* (col) cualquier tratamiento de secado mantiene los efectos del acondicionamiento, pero el secado rápido es más efectivo para mantener los

efectos al almacenar las semillas a 20 °C y 50% de humedad relativa, pues los efectos permanecen durante cuatro meses. Sin embargo, para esta misma especie Soeda *et al.* (2005) obtienen resultados opuestos. En su experimento el secado rápido reduce los beneficios del acondicionamiento y causa mayor daño en semillas envejecidas artificialmente. Es posible que estas diferencias se deban a el vigor de los lotes utilizados, ya que Powell *et al.* (2000) encontraron que, en semillas de esta misma especie con poco vigor, el acondicionamiento con polietilenglicol aumenta el potencial de almacenamiento, pero en las de alto vigor las reduce. Estos investigadores encuentran una alta variación en la duración del efecto debido a la variación entre lotes y a las condiciones de almacenamiento, desde 28.7 meses en los mejores casos hasta 1.2 meses en las peores condiciones.

### ***Efectos del acondicionamiento sobre la germinación y crecimiento de las plantas***

Los efectos benéficos de los tratamientos de hidratación han sido ampliamente documentados y se han aplicado con éxito a la producción comercial de hortalizas, cereales y algunas plantas de ornato, así como en la producción forestal.

Gran parte de la investigación con fines agronómicos se centra en probar diferentes tratamientos de hidratación para encontrar el mayor efecto, tanto en germinación como en establecimiento y para la obtención de un mayor rendimiento de las cosechas. El aumento de la productividad agrícola bajo situaciones de estrés hídrico, térmico o debido a las condiciones edáficas, también ocupa la atención de una gran cantidad de estudios. Otra parte importante de los esfuerzos se enfoca a los efectos que tiene el acondicionamiento sobre el almacenamiento de semillas. Estos trabajos buscan un equilibrio entre la obtención de una mayor producción agrícola y

mayor tiempo de almacenamiento.

En la mayoría de los estudios se documentan beneficios tanto en germinación como durante el establecimiento y crecimiento de las plántulas y en la producción de grano o partes aéreas. Por ejemplo, en garbanzo (*Cicer arietinum*), tanto el *hidropriming* como el *osmopriming* aumentan la cantidad del grano obtenido. Esto se correlaciona con una mayor actividad de la enzima invertasa ácida, que puede dar lugar a una mayor disponibilidad de hexosas, en la parte apical del tallo en plantas de 100 y 130 días de edad que provenían de semillas tratadas (Kaur *et al.*, 2005). Cayuela *et al.* (1996) encuentran mayores efectos en etapas avanzadas de crecimiento por efecto del acondicionamiento en semillas de jitomate, ya que las mayores diferencias se observan a los 60 días de sembradas las plantas. Sin embargo, en algunas especies sólo se han encontrado beneficios en los parámetros de germinación, pero no en etapas posteriores de crecimiento como en el girasol (*Helianthus annuus*) en donde no se han encontrado efectos sobre el crecimiento o la floración (Mwale *et al.*, 2003). En arroz (*Oryza sativa*), los tratamientos de acondicionamiento hídrico u osmótico ( $\text{CaCl}_2$  y KCl) y endurecimiento (varios ciclos de hidratación deshidratación) tienen efectos sobre el desempeño de plántulas crecidas en invernadero y trasplantadas al campo. Existe un aumento en los parámetros de germinación y crecimiento, así como en el contenido de nitrógeno, azúcares y en la actividad de la alfa-amilasa. El tratamiento con mayores efectos fue el acondicionamiento osmótico con  $\text{CaCl}_2$  (Farooq *et al.*, 2007). Los tratamientos con ácido salicílico y ascórbico aumentaron también el vigor de las plantas de arroz, especialmente el último, en donde se presentaron menores tiempos medios de germinación, mayor longitud de la radícula y mayor peso fresco y seco de las plántulas (Iqbal *et al.*, 2006).

Gallardo *et al.* (2001) reportan que bajo condiciones óptimas, las semillas maduras de *A. thaliana* comienzan a germinar a los 1.6 días y obtienen el 50%

de las semillas germinadas a los 2.2 días. En cambio, las semillas tratadas con acondicionamiento hídrico u osmótico mostraron un avance significativo en la germinación, al comenzar a germinar entre 0.68 y 1.24 días, respectivamente y obteniendo un 50% de germinación a los 1.58 días con ambos tratamientos.

Algunas semillas, como las de apio y zanahoria presentan embriones inmaduros que crecen antes de la emergencia de la radícula, tanto por expansión, como por división celular. En estos casos, se observan ambos procesos durante el acondicionamiento; en cambio en las semillas con embriones maduros, como la cebolla, el acondicionamiento no tiene efecto sobre el tamaño celular o el número de células (Gray *et al.*, 1990). Los tratamientos de acondicionamiento promueven la maduración de las semillas ya que se observa una germinación en semillas de melón y oyamel (Demir y Okcu, 2004; Ma *et al.*, 2003)

Durante los pre-tratamientos de hidratación se inicia la movilización de reservas en algunas especies estudiadas como *Oryza sativa* (Farooq *et al.*, 2007), *Capsicum annum* (Pandita *et al.*, 2007), *Pinus taeda* (Wu *et al.*, 2003) y *A. thaliana* (Gallardo *et al.*, 2001).

Otros procesos fisiológicos que se han documentado durante el acondicionamiento son el aumento en el contenido de DNA en jitomate (Liu *et al.*, 1997), reducción de aberraciones cromosómicas en chícharo (Sivritepe y Dourado, 1995) reducción en el número de plántulas anormales provenientes de semillas envejecidas posiblemente debido a procesos de reparación de DNA en ajo (Tajbakhsh *et al.*, 2004) y mayor replicación en el núcleo de semillas de *Capsicum annum* (Lanteri *et al.*, 1996), así como un aumento en la cantidad de tubulina en *A. thaliana* (Gallardo *et al.*, 2001), lo que puede indicar un aumento en el avance del ciclo celular.

Durante el acondicionamiento se observa degradación del endospermo

correlacionado, aunque no de manera lineal, con un aumento en la  $\beta$  manasa. También se observan modificaciones en las paredes celulares a través de estudios de ultraestructura (Dawidowicz-Grzegorzewska, 1997). Existe una serie de proteínas que han sido identificadas en germinación y que posiblemente estén relacionadas con modificaciones en pared celular como expansinas, glucanasas, pectin metil esterasas, poligalacturonasas (Ogawa *et al.*, 2003; Sreenivasulu *et al.*, 2008). El aumento en la cantidad y su relación con ácido abscísico ha sido identificado como la causa de estos eventos durante la germinación (Nonogaki *et al.*, 2007) y este aumento se incrementa junto con una serie de enzimas como expansinas,  $\beta$ -1,3-glucanasas, endo- $\beta$ -manasa y xiloglucano endotransglucosilasas en semillas de jitomate (Nakaune *et al.*, 2012).

Soeda *et al.* (2005) analizan la expresión de genes de *Brassica oleraceae* durante la maduración, el acondicionamiento osmótico y la germinación utilizando la técnica de microarreglos. Concluyeron que durante el acondicionamiento osmótico se inicia la germinación, ya que se incrementa el RNA de muchos genes relacionados con la germinación como son los relacionados con la maquinaria transcripcional, enzimas del metabolismo de carbono, histonas, factores de transcripción. Sin embargo, también se expresan genes relacionados con el estrés, ya que existe un potencial osmótico que no permite el avance en la germinación, aunque estas proteínas también las se encuentra en las etapas iniciales de germinación, como las proteínas LEA.

El acondicionamiento puede no tener efecto en condiciones óptimas de germinación y crecimiento, sin embargo, al ser sometidas a estrés, las semillas tratadas de algunas especies responden favorablemente. En zanahoria, el tratamiento no tuvo efecto en la germinación a temperatura óptima de 20 °C mientras que a 35 °C, en condiciones adversas de germinación, el acondicionamiento incrementó el porcentaje de germinación

con respecto a las semillas control (Nascimento y Pereira, 2007).

Efectos del acondicionamiento en semillas deterioradas y/o envejecidas. Uno de los efectos más importantes de los tratamientos de hidratación controlada es el que se observa en semillas envejecidas, conocido como revigorización (Sánchez *et al.*, 2001). Este efecto revigorizante ha sido explicado en función de un incremento en los procesos de reparación de DNA en algunas especies como jitomate, chícharo, ajo y chile (Liu *et al.*, 1997; Sivritepe y Dourado, 1995; Tajbakhsh *et al.*, 2004; Lanteri *et al.*, 1996). También se ha documentado que el acondicionamiento promueve un aumento en el sistema anti-oxidante y una reducción en los subproductos de descomposición de lípidos como el malodialdehído (MDA), lo que sugiere procesos de reparación de membranas (Bailly *et al.*, 2000; Gallardo *et al.*, 2006; Pandita *et al.*, 2007; Farooq *et al.*, 2008a y b; Bailly *et al.*, 1998; Yeh y Sung, 2008; Goel *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2003).

En semillas con acondicionamiento se han encontrado aumentos en proteínas y azúcares que protegen contra diversos tipos de estrés, como son varios miembros de la familia ROF, proteínas chaperonas, GADPHc y LEA (Downie *et al.*, 2003; Gallardo *et al.*, 2006; Soeda *et al.*, 2005).

Butler *et al.* (2009) documentan que el acondicionamiento mejora la sobrevivencia de semillas de *Digitalis purpurea* durante el almacenamiento. Proponen que éste puede ser un método para revigorizar semillas de especies silvestres mantenidas en bancos de semillas con fines de restauración o entrecruzamiento. Así mismo, documenta que las semillas más viejas obtienen un mayor beneficio en cuanto a la longevidad, mientras que las semillas maduras pierden longevidad debido al acondicionamiento. Además los procesos de secado pueden mermar los efectos de los tratamientos de acondicionamiento.

## Bancos de Semillas y Acondicionamiento Natural

La biología de los bancos de semillas está estrechamente relacionada con el ecosistema en el que se forman, esto determinará las especies presentes y las perturbaciones y condiciones a las que estén expuestos (Aiko *et al*, 2002). En los ecosistemas templados existe una mayor densidad de semillas con respecto a los ecosistemas tropicales. Posiblemente en estos últimos hay un mayor número de salidas del banco causadas por depredadores y por el reclutamiento de nuevas plántulas promovido por las lluvias frecuentes (Garwood, 1989). Además se ha documentado una relación positiva entre el tamaño de la semilla y la depredación, así como entre el tamaño de semilla y la profundidad de enterramiento. En ecosistemas áridos, los bancos de semillas se caracterizan por una gran variabilidad espacial y temporal y son particularmente afectados por la distribución espacial de la vegetación y la precipitación.

En los ecosistemas de clima templado existe un periodo de lluvias intermitentes, antes del establecimiento de la época de lluvias, por lo que las semillas están expuestas a ciclos de hidratación-deshidratación. Las semillas de *Buddleja cordata* y *Wigandia urens*, especies silvestres del valle de México, de dos poblaciones distintas responden a los tratamientos de endurecimiento osmótico, hídrico y enterramiento (endurecimiento natural) (González-Zertuche, 2005). En *B. cordata* el acondicionamiento (osmótico e hídrico) reduce el tiempo medio para el inicio de la germinación, influye en la tasa y la sincronía de la germinación, mejora los porcentajes de germinación de las semillas después del almacenamiento y podría inducir la aparición de latencia secundaria en las semillas (González-Zertuche, 2005). En semillas de *W. urens* sometidas a procesos de endurecimiento natural (enterramiento) se favoreció la germinación y la emergencia de plántulas. El efecto del endurecimiento fue más evidente cuando las semillas germinaron en un ambiente fluctuante pues se presentaron una mejor emergencia y sincronía,

además se reportaron modificaciones en la morfofisiología de las plántulas que podrían indicar una pre-adaptación al medio ambiente (González-Zertuche *et al*, 2000). El enterramiento en *W. urens*, también promovió la movilización y la solubilización de algunas proteínas de reserva, el consumo de sacarosa antes de la protrusión de la radícula, diferencias en el patrón de isoenzimas de la amilasa y una disminución de la actividad de la catalasa; condiciones que se mantuvieron después de la desecación de las semillas (Gamboa-deBuen *et al.*, 2006). Los efectos del endurecimiento en *B. cordata* y *W. urens* dependen de las condiciones ambientales del sitio de origen de la semilla y del microclima en dónde las semillas germinen (González-Zertuche, 2005).

La permanencia de una especie en el banco dependerá de múltiples factores como longevidad, presencia de latencias, capacidad germinativa, depredación, perturbaciones, microclima del suelo, etc. El microclima de las semillas está definido por las características del suelo y por las variables ambientales como la radiación, la precipitación, la humedad y la temperatura, y puede variar en unos cuantos centímetros. Por ello, en algunas semillas se puede disparar la germinación, mientras que en otras de la misma especie puede disminuir la viabilidad o favorecerse las latencias secundarias (Gutterman, 1993). La longevidad de las semillas puede depender de su estructura, de la composición química (reservas, protección), la tolerancia a patógenos (Baskin y Baskin, 1998), la respuesta al microclima dentro del banco (la temperatura, la humedad relativa, la disponibilidad de oxígeno, la liberación de inhibidores químicos, el fotoperíodo, la calidad y la cantidad de luz, el pH y la salinidad).

Los datos de envejecimiento en condiciones óptimas de almacenamiento son muy útiles para conocer la longevidad de las semillas (Baskin y Baskin, 1998). Las condiciones de un laboratorio son muy distintas de las que se presentan en un banco de semillas. Por lo general, el almacenamiento *ex-situ* disminuye el daño a los ácidos nucleicos y a la membrana, y por lo tanto, aumenta la



viabilidad (Tenner *et al.*, 2003). Para el establecimiento exitoso de un banco de germoplasma es necesario conocer el momento y las técnicas adecuadas para la recolección de las semillas, la diversidad genética de la población, el potencial genético y fisiológico de las semillas para ser almacenadas, la tolerancia a la desecación, el tipo de latencia presente y las condiciones que mantienen o rompen esta latencia. En este caso, un marcador molecular que pueda indicar el estado fisiológico o edad de las semillas sería muy útil, pues se podría predecir el desempeño germinativo de diferentes especies, sobre todo de hábitats naturales.

Así mismo Gamboa-deBuen *et al.* (2006) observaron movilización de proteínas y aumento en el consumo de sacarosa, aunque no en el consumo de almidón en semillas con acondicionamiento natural de *W. urens*. También se ha reportado que el acondicionamiento natural promueve la movilización de proteínas en otras especies silvestres de México como *B. cordata*, *Dodonea viscosa* y *Opuntia tomentosa* (Alvarado, 2012).

## HIPÓTESIS

---

Debido a que las proteínas de la familia DUF642 se encuentran altamente conservadas desde su aparición en las espermatofitas, consideramos que los cambios en la expresión durante el acondicionamiento mátrico por enterramiento será muy similar en diversas especies nativas, con respecto a lo que ocurre en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Por la presencia de estas proteínas en la pared celular, consideramos que su expresión se modifica durante las etapas tempranas de la germinación.

1. La expresión de *At3g08030*, gene de la familia DUF642, aumentará por efecto del acondicionamiento natural en las semillas de la especie modelo *Arabidopsis thaliana* y de las especies silvestres que responden a este tratamiento.
2. La sobre expresión de las proteínas DUF642 incrementará la tasa y velocidad de germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana*.
3. Los tratamientos de acondicionamiento, mátrico por enterramiento e hídrico, promoverán un aumento en la expresión de genes de *Arabidopsis thaliana*.

# OBJETIVOS

---

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar el comportamiento de los genes de la familia DUF642, en particular *At3g08030* y *At5g25460*, en los procesos relacionados con el acondicionamiento natural, germinación y envejecimiento de las semillas en diferentes especies de plantas.

## OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el efecto del acondicionamiento natural sobre la capacidad germinativa de semillas de *Arabidopsis thaliana* y compararlo con lo que ocurre en especies de vegetación natural *Buddleja cordata* y *Wigandia urens* en condiciones óptimas y bajo estrés hídrico.

Determinar los patrones de expresión de los genes *At3g08030*, *At5g25460*, *At5g11420* y *At4g32460* durante el acondicionamiento mátrico e hídrico y en la germinación de *Arabidopsis thaliana*.

Determinar el efecto del acondicionamiento mátrico y natural sobre la expresión de genes en semillas viejas y/o deterioradas de *Arabidopsis thaliana*, *Wigandia urens* y *Ceiba aesculifolia*.

Clonar los genes ortólogos de *At3g08030* de especies silvestres (*Wigandia urens* y *Ceiba aesculifolia*) y determinar sus patrones de expresión

Establecer líneas de sobre-expresión de los genes *At3g08030* y *At5g25460* en *Arabidopsis thaliana* y determinar el fenotipo de estas líneas midiendo los parámetros relacionados con germinación y tolerancia a estrés hídrico.

Determinar el efecto de los tratamientos de acondicionamiento mátrico e hídrico sobre los cambios en la expresión del conjunto de genes de *Arabidopsis thaliana*

## MÉTODOS

---

### ***Obtención del material biológico***

Las semillas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo columbia wt (*wild type*) se obtuvieron de individuos crecidos en una cámara de crecimiento con fotoperíodo largo (16 horas de luz y 8 de oscuridad) a temperatura constante de 20°C. Las semillas tuvieron un periodo de maduración de un mes antes de los tratamientos.

Las semillas de *B. cordata* y *W. urens* se colectaron en la zona del pedregal dentro de la reserva ecológica de Ciudad Universitaria durante los meses de marzo y abril del 2007 y 2008; y las semillas de *Ceiba aesculifolia* Kunth (Britten & Baker) fueron obtenidas del bosque tropical caducifolio en Atocpan, Veracruz, durante el 2009 y 2010.

### ***Tratamientos a las semillas***

a) Acondicionamiento mátrico y acondicionamiento natural: Para este tratamiento, las semillas de *W. urens* y *C. aesculifolia* se enterraron en el sitio de colecta durante dos meses y medio antes del establecimiento de la época de lluvias, pero sujetas a lluvias esporádicas (de marzo a mayo). Posteriormente se secaron en oscuridad a temperatura ambiente y se guardaron en frascos de vidrio en condiciones ambientales del laboratorio. Las semillas de *A. thaliana* se enterraron en las macetas donde crecen las plantas dentro de la cámara de crecimiento por 24 horas o en refrigeración a 4°C durante 48 horas. Todas las semillas se secaron en oscuridad y a temperatura ambiente hasta regresar su estado de hidratación inicial.

b) Acondicionamiento hídrico: Las semillas se colocaron en tubos de microfuga con agua destilada a 4°C en oscuridad durante dos días,

posteriormente se utilizaron para los ensayos de germinación o se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para los ensayos moleculares. Este método es comúnmente utilizado en los laboratorios en donde se utiliza *A. thaliana* como especie modelo para diferentes estudios.

c) Estrés salino: las semillas control y acondicionadas se sembraron en cajas de petri con agar al 1% a diferentes concentraciones de NaCl (0, 50 y 100 mM) que corresponden a potenciales osmóticos de 0, -0.23 y -0.46 MPa.

d) Deterioro/Envejecimiento: Los tratamientos se basaron en los ensayos de deterioro controlado descritos por Tesnier *et al.* (2002) y utilizados por Rajjou *et al.* (2008). En el ensayo se consideraron dos controles: sin tratamiento (C) y con tratamiento de acondicionamiento mátrico (M) pero sin deterioro y tres tratamientos con deterioro: CD (control con deterioro), MAD (acondicionamiento mátrico antes del deterioro) and MDD (condicionamiento mátrico después del deterioro). El método consiste en equilibrar las semillas a 85% de humedad a  $20^{\circ}\text{C}$  (potencial hídrico de -22MPa, lograda en un ambiente cerrado con un solución saturada de KCl). Las semillas control (C y M) se secaron en un ambiente controlado a 32% de humedad (potencial hídrico = -154 MPa, en una ambiente cerrado con una solución de  $\text{CaCl}_2$ ) a  $20^{\circ}\text{C}$ . Las semillas se deterioraron a 85% de humedad relativa y  $40^{\circ}\text{C}$  por tres días (CD, MAD y MDD). Los tratamientos CD y MAD se secaron en un ambiente a 32% de humedad relativa y  $20^{\circ}\text{C}$ . Para el tratamiento de MDD, las semillas fueron enterradas después del deterioro durante 24 horas y posteriormente fueron secadas en un ambiente a 32% de humedad relativa y  $20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realizaron las pruebas de germinación, sembrándose las semillas en las mismas condiciones.

### ***Análisis de germinación***

Se sembraron 50 a 100 semillas por tratamiento en tres réplicas en placas de agar 1% y se pusieron a germinar en una cámara de germinación con

fotoperiodo largo (16 horas de luz y 8 de oscuridad) a 20° C. Se realizaron conteos regulares de las semillas germinadas considerándose ésta como la protrusión de la radícula. Se graficó la media de germinación por tratamiento y la desviación estándar correspondiente, así mismo en algunos casos se graficaron las velocidades medias de germinación obtenidas por la primera derivada máxima del ajuste a cada curva de germinación.

### ***Análisis estadísticos***

Las gráficas de germinación se obtuvieron a partir de la germinación acumulada. Estos datos se transformaron a arcoseno. La tasa de germinación se obtuvo con el valor de la primera derivada máxima de la curva exponencial sigmoide ajustada a partir de los valores de la germinación acumulada (TableCurve 2D, versión 3.0). El tiempo medio de germinación se obtuvo a partir de las curvas ajustadas como el tiempo en el que se alcanza la primera derivada máxima. Los análisis estadísticos se hicieron con el programa Statgraphics, versión 20 5.0 (Statistical Graphics Co., Rockville, MD) Se realizaron ANOVAS a los datos de los porcentajes finales de germinación, tiempos medios de germinación, tasas de germinación y al tiempo de inicio de la germinación. La prueba de Tuckey fue utilizada para los análisis *post hoc*.

### ***Extracción de mRNA de semillas***

La extracción de RNA de semillas con los tratamientos descritos anteriormente se llevó a cabo por el método descrito por Li y Trick (2005) para semillas con alto contenido de carbohidratos como son *C. aesculifolia* y *W. urens* o por el método de Oñate-Sánchez y Vicente-Carbajosa (2008), para semillas con altos contenidos de lípidos como es *A. thaliana*.

### ***RT-PCR***

Se realizaron diversos RT-PCR en las siguientes condiciones:

Retrotranscripción con la enzima superscript II reverso transcriptasa de Invitrogen y se amplificó el cDNA obtenido por PCR en las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos y 35 ciclos con temperatura de desnaturalización de 94°C por 30", seguida por una temperatura de alineación de 60°C por 30" y una temperatura de extensión de 72° por 1'30", con una extensión final de 72° por 5 minutos.

Se utilizaron los siguientes *oligonucleótidos*:

Gene	Oligonucleótido Sentido*	Oligonucleótido antisentido	Tamaño del Producto
08030	<b>GGA GTC</b> ATG AAG AAA ACA GTT CT ACTA G	<b>GAG CTC</b> CTA AGC GAC ATG AGA AAA C	792 pb
11420	<b>GGA TCC</b> ATG AAA GGA GGC AGC CTC T	<b>GAG CTC</b> TTA CGG CTT ACG AGC ACT GA	1101 pb
25460	<b>GGA TCC</b> ATG GAA GGC GTC ACC GTC	<b>GAG CTC</b> CTA TGG TTT ACG AAC GCT TAT A	1110 pb

\* Los sitios de restricción están resaltados en negritas

El tamaño del gene amplificado se observó por electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

### ***Hibridación in situ***

Para los ensayos de hibridación *in situ*, se fijaron semillas control, con acondicionamiento mátrico e hídrico en FAA (formol- ácido acético-alcohol). Se deshidrató el tejido con alcohol (30, 50, 70, 96 y 100%), para obtener la inclusión en parafina gradualmente se sustituyó el alcohol (butanol) por paraplast 25:75, 50:50 y 100%. Se realizaron cortes de 8-12 micras y se colocaron en portaobjetos preparados con polivicina. Posteriormente se



desparafinó el tejido, se digirió con proteinasa K y se hibridó con la siguiente sonda biotinada preparada para el gen 25460: BIOTINA-ATT AGT ATT ACC CGG CTC GAC AAC TGG AGT TTT GAT CCC A. Posteriormente se reveló con el conjugado streptavidina-fosfatasa alcalina y con el cromóforo BCIP (5bromo-4cloro-3indolil fosfato) y NBT (azul de nitro tetrazolio) que se deposita en el sitio de la hibridación.

### ***Diseño de la sonda***

Se compararon las secuencias de los genes DUF642 presentes en germinación y se localizaron las regiones con menos similitudes. Se escogió una región de 40 pb con una similitud del 40% con respecto a los otros genes de la familia. Posteriormente se comparó la secuencia con otros genes de *A. thaliana* mediante la opción “*blast*” en la página del NCBI. Se encontraron pequeñas regiones parecidas en diversos genes, siendo la a máxima similitud de 14 pares de bases contiguas.

### ***Clonación y patrones de expresión de genes ortólogos en Wigandia urens y Buddleja cordata***

#### ***Clonación de genes***

Se diseñaron *primers* degenerados para detectar la expresión de genes de la familia DUF642. Para ello se buscaron las regiones más conservadas entre los genes 08030, 25460, 32460 y 11420.

<b><i>Primers</i></b> Degenerados	Sentido			Antisentido		Tamaño Aprox 300 pb
	GAR	RAR	CSY	TGD	GCD	
	RCY	TGT	GGW	WYB	GCR	
	CC			CTY	TCT	

Se extrajo RNA, se realizó la reacción de retro transcripción y se amplificó el cDNA por PCR en las siguientes condiciones: temperatura de alineación inicial

de 94°C por 5 minutos, 40 ciclos con temperatura de desnaturalización de 94°C por 40 “,temperatura de hibridación de 51°C por 30” y temperatura de extensión de 72°C por 40”. La temperatura de extensión final fue de 72°C por 5 minutos.

El producto obtenido se clonó en pGemT-easy y se mandó secuenciar como se describe en el inciso anterior. Se obtuvo un gene ortólogo proveniente de semillas de *W. urens* y parecido a *At3g08030*. Esta secuencia y sus similitudes con otras especies (*Brassica rapa* y *Vitis vinifera*) se utilizó para diseñar otros *primers* más internos.

<i>Primers</i> Degenerados anidados	Sentido GGC TKG GRA AYG AGG CAT C	Antisentido CHAAGGGMAAAG GWGGVTTYAAG	Tamaño Aprox 200pb
---	---	--	--------------------------

### *Patrones de expresión*

Con base en las secuencias clonadas en *W. urens*, se diseñaron los siguientes *primers* para detectar expresión en las diferentes condiciones de las semillas.

<i>Primers para expresión de Wigandia urens ortólogo a At3g08030</i>		
Sentido GGCTKGGRAAYGAGGCATC	Antisentido CHAAGGGMAAAGGWGGVTTY AAG	Tamaño 320 pb
<i>Primers para expresión de Ceiba aesculifolia ortólogo a At3g08030</i>		
Sentido GAGAAGCGCGCTTGTGGTCC	Antisentido CGACGGCGCTCTCTCCCT	320 pb

## ***Microarreglos***

Se realizó un estudio a nivel del transcriptoma de semillas maduras (dos meses de post maduración) de *A. thaliana*. Se obtuvo RNA de semillas con acondicionamiento mátrico e hídrico y control. La técnica consiste en la hibridación del RNA de dos muestras (tratamiento y control), contra microarreglos diseñados con etiquetas (secuencias cortas pero específicas para cada gene) de todos los genes de *A. thaliana*. Debido a que cada muestra contiene una marca específica, se compara la señal de una muestra contra la otra (tratamiento contra control) y de acuerdo a la intensidad de la señal, se miden los cambios en la expresión (Figura 4). Las hibridaciones llevadas a cabo fueron: acondicionamiento mátrico contra control y acondicionamiento hídrico contra control. Se consideraron dos réplicas para cada hibridación con marcas cruzadas. El ensayo se realizó en el laboratorio de microarreglos del Instituto de Fisiología Celular.

Los datos obtenidos se analizaron con el programa DAVID Bioinformatic Resource (Huang *et al.*, 2009). Este programa agrupa los transcritos implicados en la misma función. A cada grupo le asigna un valor denominado valor de enriquecimiento (enrichment score) obtenido por el número de genes implicados en una función en particular (de la base de datos que estemos analizando) dividido entre el número total de genes descritos para esa función (en diversas bases de datos). Las funciones de los genes que muestran cambios de expresión fueron obtenidas de las bases de datos de DAVID y NCBI.

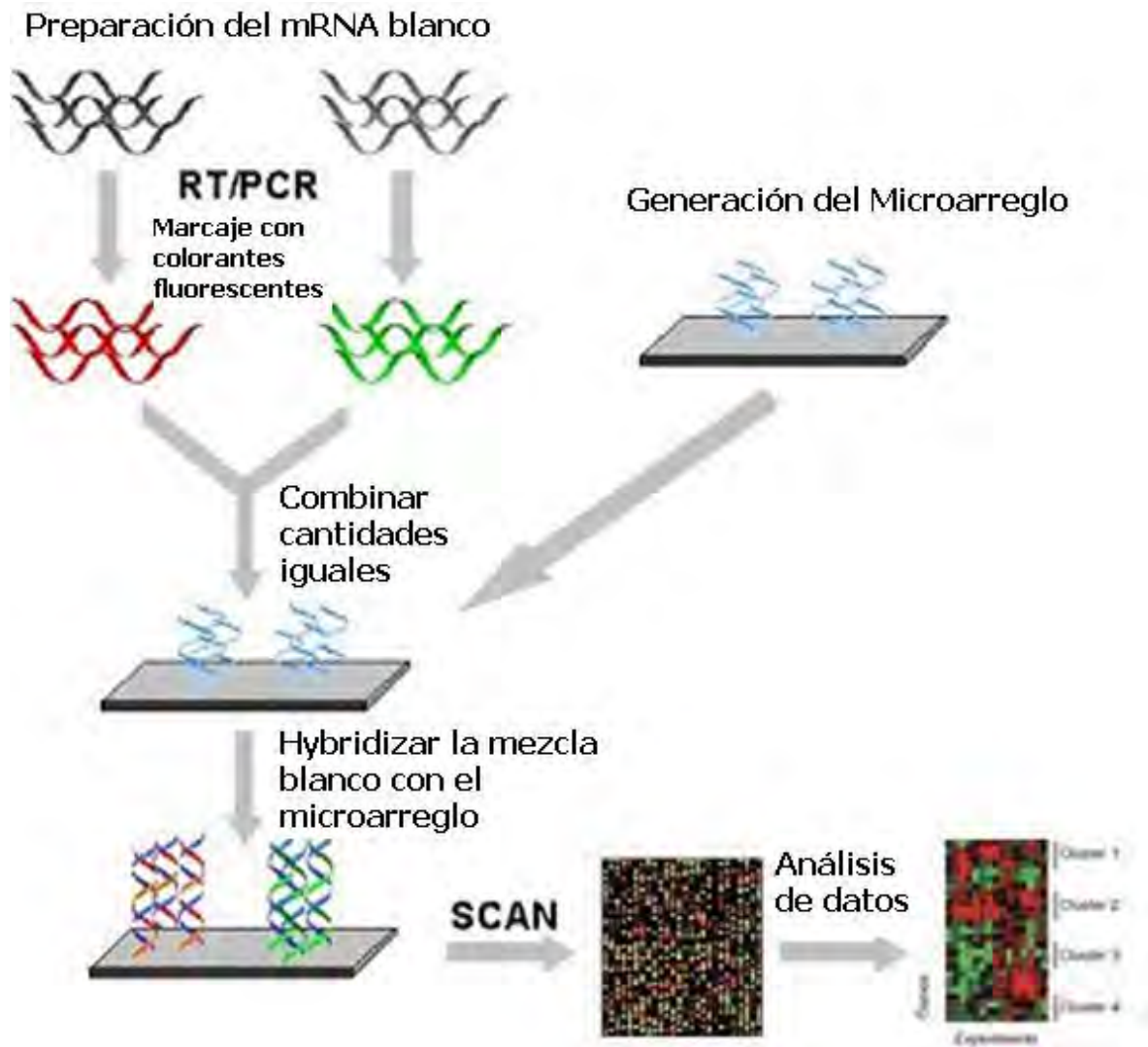


Fig. 4. Diagrama de método de hibridación a través de microarreglos. Tomado de [csmbio.csm.jmu.edu](http://csmbio.csm.jmu.edu) (13 de febrero 2012).

### *Sobreexpresión en plantas de Arabidopsis thaliana*

Las construcciones realizadas fueron: *At3g08030* sin péptido señal y *At5g25460* con péptido señal en el vector p-BIN. Estos mensajeros fueron obtenidos a partir de la amplificación por RT-PCR, las bandas observadas se purificaron con filtro de fibra de vidrio. El producto obtenido se ligó en el vector

pGEM-Teasy y se introdujo en células competentes de *E. coli* cepa Top10 de Invitrogen. Los plásmidos con el inserto se purificaron con el kit de Qiagen QIAprep Spin I mini prep. Se enviaron a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Biología. Los transcritos se introdujeron a células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* realizando la transformación por electroporación. Esta bacteria fue utilizada para infectar plántulas silvestres de *A. thaliana* ecotipo columbia con inflorescencias no fecundadas. Las plantas transformadas se identificaron por la resistencia a la kanamicina.

Obtención de líneas homocigotas Las plántulas resistentes a kanamicina (F1) se dejaron crecer hasta obtener semillas nuevamente. Las plántulas que nuevamente resultaron resistentes a kanamicina se sembraron en tierra para obtener la F2.

Posteriormente se midieron los parámetros de germinación para detectar fenotipos específicos de esta sobreexpresión.

## RESULTADOS

---

### **Efecto de diferentes tratamientos de acondicionamiento sobre la germinación y la expresión de los genes de la familia DUF642 de *Arabidopsis thaliana***

#### ***Germinación de las semillas control y tratadas con acondicionamiento hídrico y mátrico***

Las semillas de *A. thaliana* control (2-4 meses) fueron sometidas a acondicionamiento hídrico a 4°C y acondicionamiento mátrico (enterramiento en suelo) a 20°C. Estos tratamientos incrementaron diferentes parámetros de germinación con respecto a los de las semillas control. El inicio de la germinación, identificada por la protrusión de la radícula, fue significativamente menor en semillas con tratamiento mátrico (M) en comparación con semillas con acondicionamiento hídrico (H) y control (C) ( $F_{2,6} = 14.33$ ,  $p = 0.0052$ ). Sin embargo, la germinación máxima y la tasa de germinación no mostraron diferencias significativas ( $F_{2,6} = 32.68$ ,  $p = 0.022$ ). El tiempo medio para alcanzar la primera derivada máxima se muestra en la Fig. 5. Se observó una reducción en el tiempo medio de germinación en las semillas con acondicionamiento hídrico.

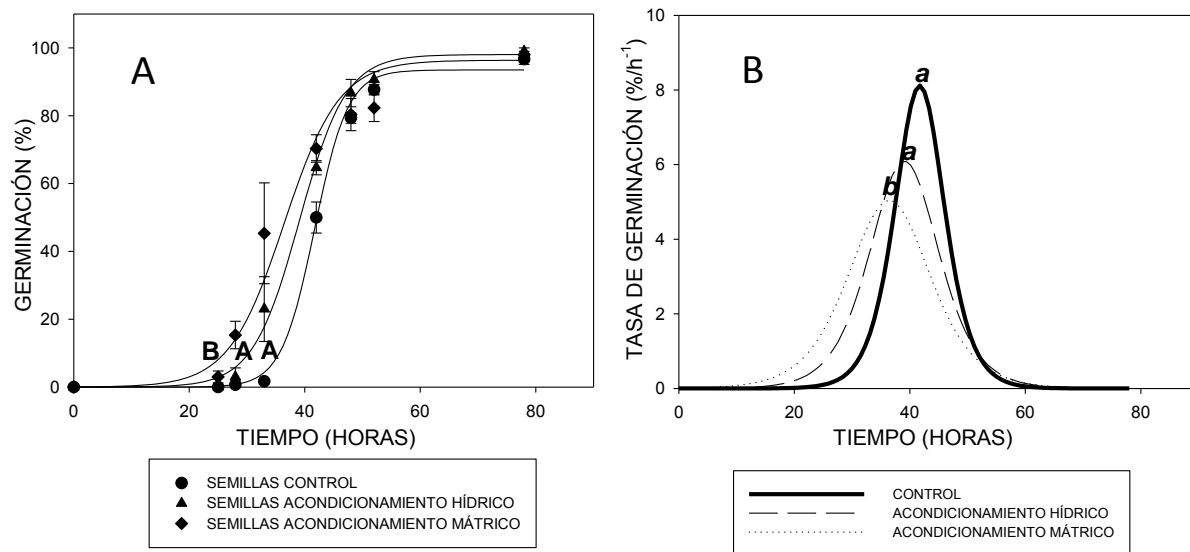


Figura 5: Efecto de diferentes tratamientos pre germinativos sobre la germinación de *Arabidopsis thaliana*. Semillas de 2 meses se sometieron a acondicionamiento hídrico a 4°C y a acondicionamiento mátrico a 20°C. Para determinar la germinación, se llevaron a cabo tres repeticiones de 50 semillas del mismo lote y al menos con 3 diferentes lotes de semillas (réplica biológica). Las letras indican diferencias estadísticas entre los tratamientos: (A) inicio de germinación y (B) tiempos medios de germinación.

### **Expresión de At3g08030 durante el desarrollo de la semilla y germinación**

La expresión de *At3g08030* se detectó en silicuas, semillas recién liberadas y germinadas (Fig.6A). Los tratamientos de acondicionamiento incrementaron la expresión (Fig. 6B).

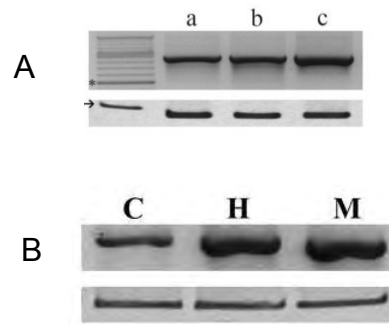


Figura 6. Efecto de los tratamientos pregerminativos sobre la expresión de *At3g08030*. A) Desarrollo de la semilla y germinación: silicuas (a), semillas recién liberadas (4 a 6 semanas) (b) y semillas de dos días de germinación (c). B) Efecto del acondicionamiento: semillas control (C), con acondicionamiento hídrico (H), con acondicionamiento mátrico (M). La expresión de ACT7 se analizó simultáneamente como un control interno (imagen inferior de cada panel). Esta figura representa las tres réplicas biológicas llevadas a cabo.

***Patrón de localización espacial de At3g08030 de semillas control, con acondicionamiento hídrico y con acondicionamiento mátrico***

Para detectar diferencias en la localización del *At3g08030* en los diferentes tejidos de semillas y entre los tratamientos, se realizaron ensayos de hibridación *in situ* (Fig. 7). Las semillas control presentaron marca en todas las células del embrión y el endospermo. No se encontraron diferencias en el patrón de expresión entre los tratamientos.



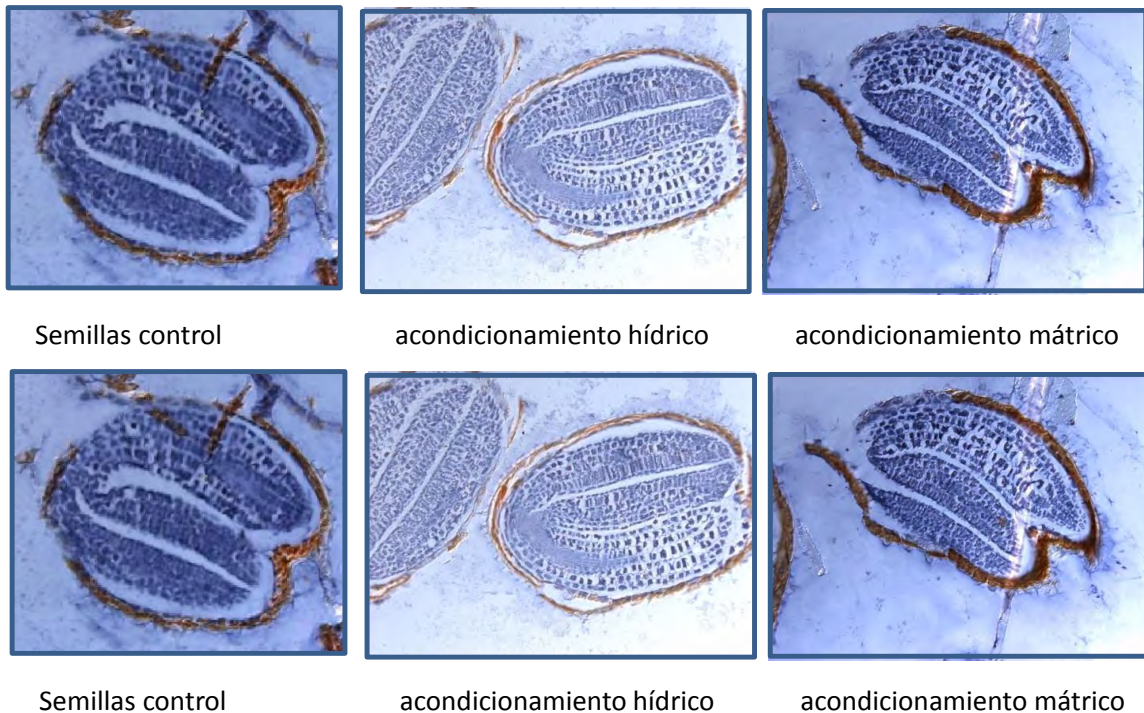


Figura 7: Expresión de *At3g08030* en semillas control y tratadas. Se realizó una hibridación *in situ*, utilizando una sonda de 20-30 nucleótidos derivada del UTR 5', a cortes longitudinales de semillas control, con acondicionamiento hídrico y con acondicionamiento mátrico (20x).

### ***Efecto de la temperatura del tratamiento pre-germinativo sobre la germinación***

La temperatura de la hidratación previa a la germinación tiene efectos significativos en la germinación de *A. thaliana* (Fig. 8); el tratamiento mátrico a 4°C incrementa tanto la velocidad de germinación ( $F_{(2,6)} = 1.35$  con una  $p = 0.03$ ), como el tiempo medio de la misma ( $F_{(2,6)} = 7.31$ ,  $p = 0.01$ ) con respecto al tratamiento a 20°C. Sin embargo, no se observan diferencias en el inicio de la misma por efecto de la temperatura, aunque sí debido al tratamiento mátrico ( $F_{(2,6)} = 10.95$  con una  $p = 0.003$ ) tal como se describió en la Fig. 5.

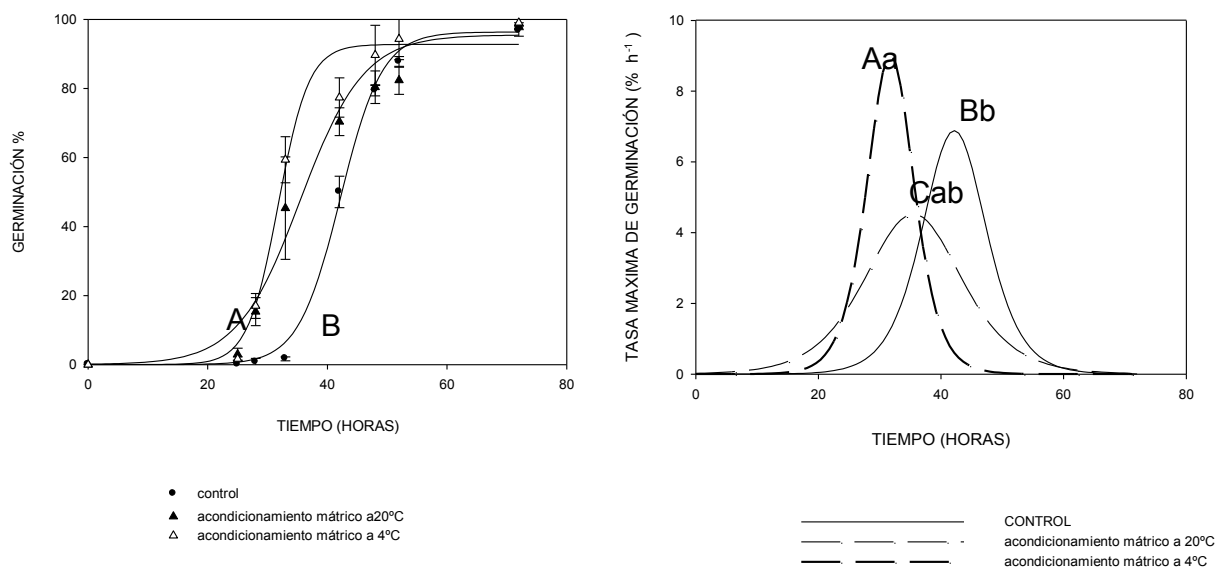


Figura 8. Efecto de la temperatura del acondicionamiento sobre la germinación de *Arabidopsis thaliana*. Las letras indican diferencias estadísticas entre los tratamientos (A) inicio de germinación, (B) mayúsculas para tasa de germinación y minúsculas para tiempos medios de germinación.

### **Efecto de los pre-tratamientos de acondicionamiento en la germinación bajo condiciones de estrés**

Las semillas control y acondicionadas se germinaron en condiciones de estrés salino (100mM NaCl, Fig. 59). Las semillas con acondicionamiento a 4°C (hídrico o mátrico) presentaron un mejor desempeño en estas condiciones. La baja temperatura influyó en todos los parámetros germinativos, salvo en el inicio de la germinación ( $F_{(3,8)} = 2.76$ ,  $p = 0.11$ ). El porcentaje final de germinación fue mayor para semillas con acondicionamiento hídrico o mátrico a 4°C ( $F_{(3,8)} = 2.17$ ,  $p = 0.01$ ), al igual que la velocidad ( $F_{(3,8)} = 8.07$ ,  $p = 0.008$ ) y el tiempo medio de germinación ( $F_{(3,8)} = 5.25$ ,  $p = 0.03$ ) fue menor en estos tratamientos. El acondicionamiento mátrico a 20 °C solo redujo el tiempo medio de germinación.

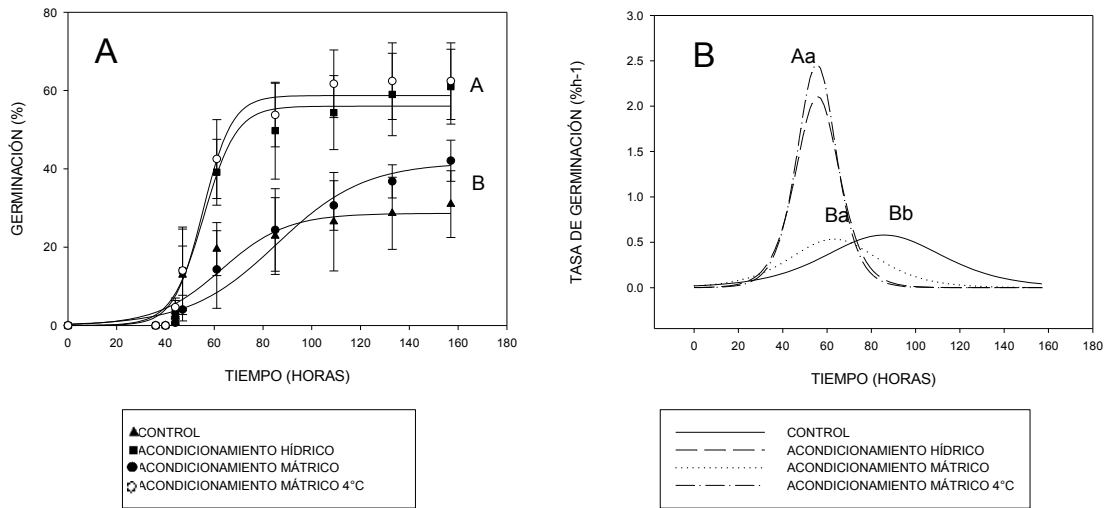


Figura 9: Efecto de los tratamientos de acondicionamiento y de la temperatura en la germinación bajo condiciones de estrés salino (100mM NaCl). Las letras indican diferencias estadísticas entre los tratamientos: (A) porcentaje final de germinación y (B) mayúsculas para tasa de germinación y minúsculas para los tiempos medios de germinación.

### ***Efecto de la deshidratación durante el tratamiento pre-germinativo sobre la germinación***

En general, los tratamientos de acondicionamiento incluyen un ciclo de deshidratación (Fig.10). Para determinar si la deshidratación de las semillas tiene un efecto sobre el desempeño germinativo, se realizó un experimento en donde se incluyeron acondicionamiento hídrico y mátrico con y sin deshidratación. Los resultados obtenidos indican que a pesar de que no existe una diferencia significativa en ninguno de los parámetros evaluados en relación a la deshidratación, sólo los tratamientos de acondicionamiento hídrico sin deshidratar y acondicionamiento mátrico con deshidratación incrementaron significativamente la germinación con respecto a las semillas

control. El inicio de la germinación es significativamente menor en semillas con acondicionamiento ( $F_{(4, 10)} = 7.05$ ,  $p = 0.006$ ), así como el tiempo medio de germinación ( $F_{(4, 10)} = 12.91$ ,  $p = 0.0006$ ).

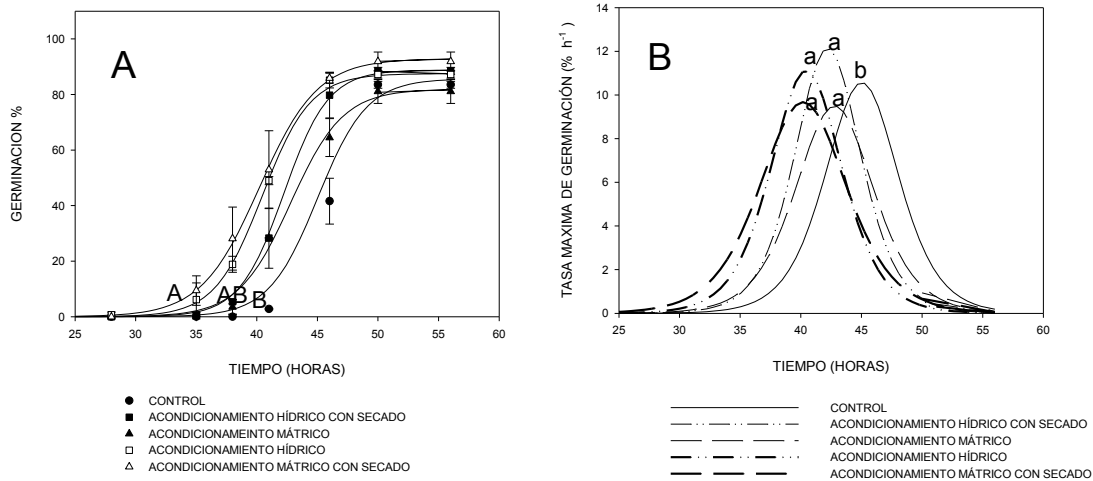


Figura 10. Efecto de la deshidratación de semillas acondicionadas sobre la germinación de *Arabidopsis thaliana*. Las letras indican diferencias estadísticas entre los tratamientos: (A) inicio de germinación y (B) tiempos medios de germinación.

**Determinación preliminar de la expresión de otros genes de la familia DUF642 en semillas control, con diferentes tratamientos pre-germinativos y germinadas**

Aunque *At5g25460* y *At5g11420* no se detectan en la semilla control, la expresión es inducida por el acondicionamiento mátrico (Fig. 11). *At4g32460* no se detectó en la semilla control ni se indujo su expresión por ningún tratamiento. En las semillas germinadas se expresan todos los genes DUF642 estudiados.

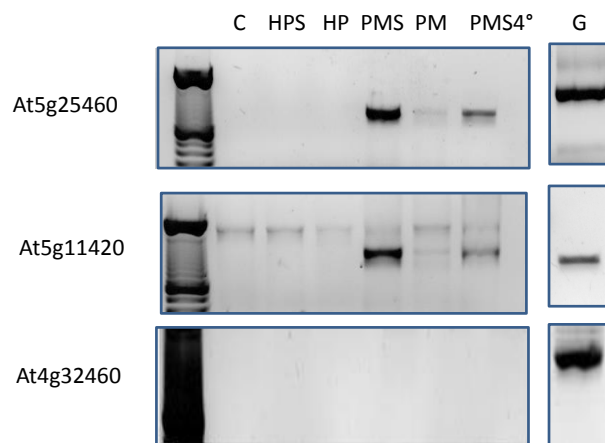


Figura 11: Expresión de los genes DUF642: *At5g25460*, *At5g11420* y *At4g32460* en respuesta al acondicionamiento y en la germinación. C (control) HPS (acondicionamiento hídrico con secado) HP (acondicionamiento hídrico) PMS (acondicionamiento mátrico con secado) PM (acondicionamiento mátrico) PMS4° (acondicionamiento mátrico a 4°C con secado) y G germinado.

### ***Desempeño germinativo y detección del gene At3g08030 de las semillas de A. thaliana almacenadas en el laboratorio***

Se determinaron los parámetros germinativos de semillas maduras control (dos meses post cosecha) y semillas almacenadas (entre seis y diez meses de almacenamiento) (Fig. 12). Las semillas almacenadas no presentaron diferencias en los parámetros germinativos evaluados con respecto a las semillas maduras al germinar en condiciones óptimas. Sin embargo, al germinar dichas semillas en condiciones de estrés salino (100mM NaCl), las semillas almacenadas mostraron una disminución en la capacidad germinativa, siendo el porcentaje final de germinación significativamente menor ( $F_{(3, 8)}=89.38, p<0.05$ ). No se observaron diferencias en la velocidad de germinación, ni en el tiempo promedio. El inicio de la germinación, la velocidad de la misma y el tiempo medio de germinación muestran diferencias debido a la salinidad, aunque no por efecto del almacenamiento. En las semillas

almacenadas no se detectó el transcrito *At3g08030* (Fig.13).

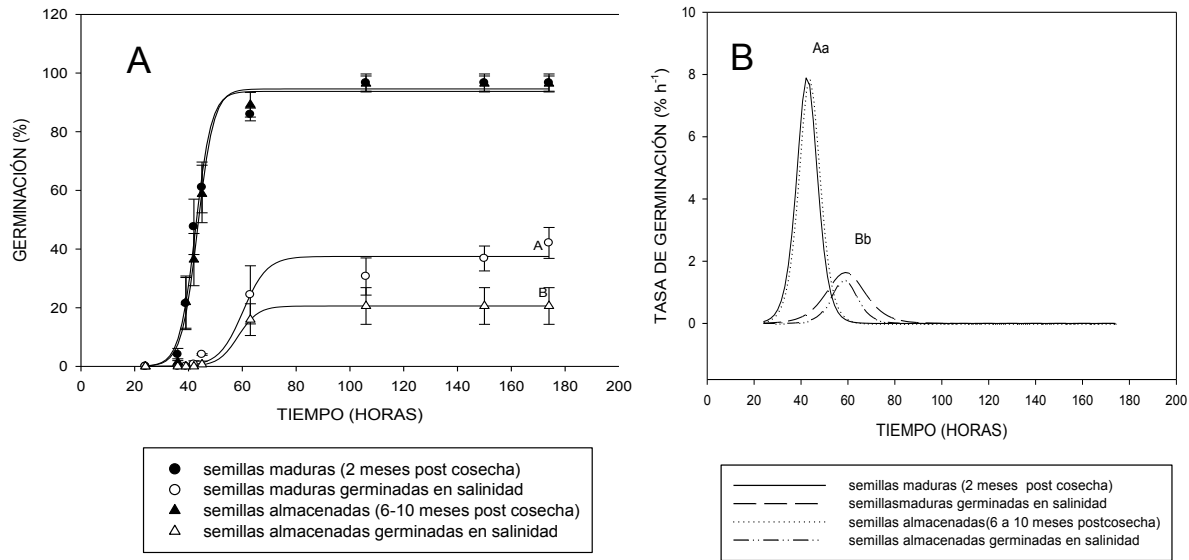


Figura 12: Germinación de semillas control y almacenadas bajo condiciones óptimas y bajo estrés salino (100mM NaCl). Las letras indican diferencias estadísticas entre los tratamientos: (A) porcentaje final de germinación y (B) mayúsculas para tasa de germinación y minúsculas para los tiempos medios de germinación.

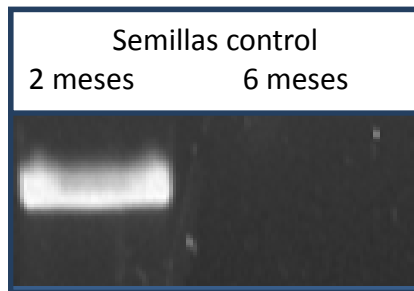


Figura 13. Detección de *At3g08030* en semillas de 2 y 6 meses de almacenamiento.

**Efecto del deterioro controlado sobre la germinación y la expresión de *At3g08030* de semillas de *A. thaliana***

El deterioro controlado (DC) de las semillas de *A. thaliana* permitió un estudio más profundo del comportamiento del gene *At3g08030* durante el deterioro que ocurre por el envejecimiento de las semillas (Fig 14). Este tratamiento consistió en someter a las semillas a altas temperaturas bajo una hidratación controlada. El efecto del acondicionamiento mátrico se determinó en las semillas sometidas al deterioro controlado. Se determinaron los diferentes parámetros germinativos en semillas control sin deterioro (C), semillas control con acondicionamiento mátrico (M), semillas deterioradas (D), semillas con acondicionamiento mátrico previo al deterioro (MD) y semillas con deterioro tratadas con acondicionamiento mátrico (DM). Los resultados muestran el tratamiento de deterioro controlado disminuye la capacidad germinativa de las semillas y los tratamientos de acondicionamiento mátrico mejoran su desempeño. Las semillas MBD obtuvieron mayores valores con respecto a las semillas MAD, acondicionadas después del deterioro.

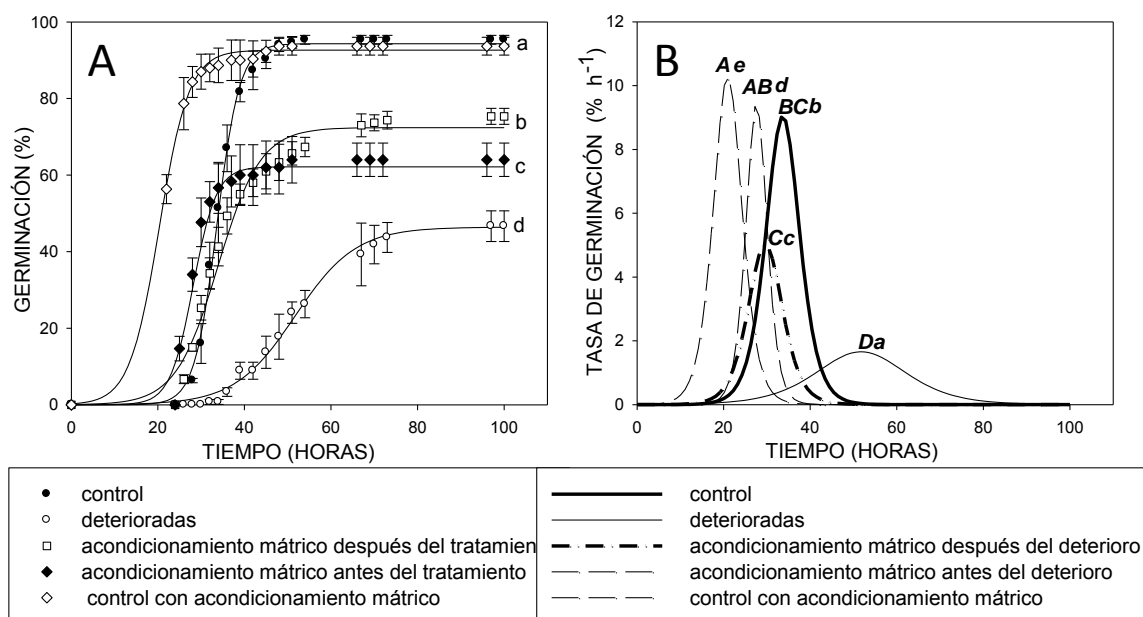


Figura 14: Efecto de tratamientos de deterioro controlado sobre la germinación. (A) porcentaje de germinación, (B) tasa de germinación. Las letras indican diferencias significativas, mayúsculas para diferencias en la tasa de germinación y minúsculas para tiempos medios.

El deterioro controlado reduce significativamente la detección de *At3g08030* mientras que el acondicionamiento mátrico lo incrementa (Fig. 15)

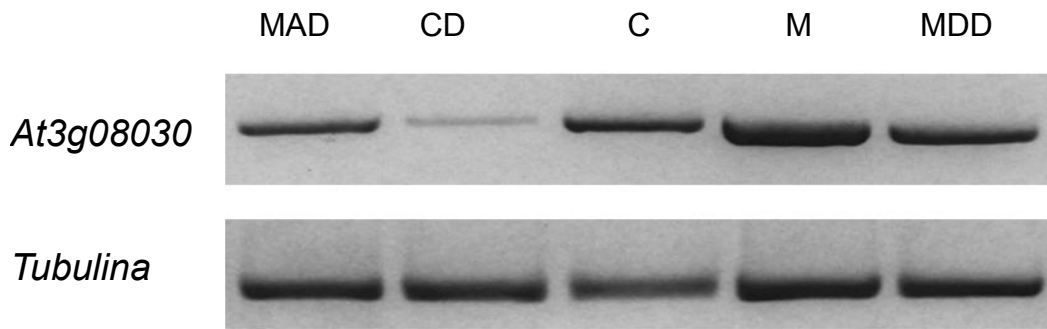


Figura 15: Efecto de los tratamientos de deterioro controlado sobre la expresión del genes *At3g08030* por RT-PCR en acondicionamiento mátrico antes del deterioro (MAD), semillas control con deterioro(CD), semillas control (C), semillas con acondicionamiento mátrico (M), semillas con acondicionamiento mátrico después del deterioro (MDD).Se utilizó tubulina como control interno.

***At3g08030* como marcador de envejecimiento de las semillas de *Wigandia urens* y *Buddleia cordata***

***Efecto del acondicionamiento natural sobre la germinación***

*Wigandia urens* responde al acondicionamiento por enterramiento en campo (durante dos meses antes de inicio de la temporada de lluvias), incrementando el porcentaje final de germinación en semillas germinadas bajo estrés salino (50mM NaCl) ( $F_{(,8)}=12.38$ ,  $p=0.002$ ), mientras que no se observan diferencias en este parámetro al germinar bajo condiciones óptimas (Fig. 16). No se determinaron diferencias en la velocidad de germinación entre semillas control y con acondicionamiento. El tiempo medio de germinación se reduce por



efecto del acondicionamiento en ambas condiciones de germinación ( $F_{(3,8)}=5.52$   $p=0.02$ ); de la misma manera, el inicio de la germinación se reduce por efecto del acondicionamiento ( $F_{(3,8)}=16.15$ ,  $p=0.003$ ).

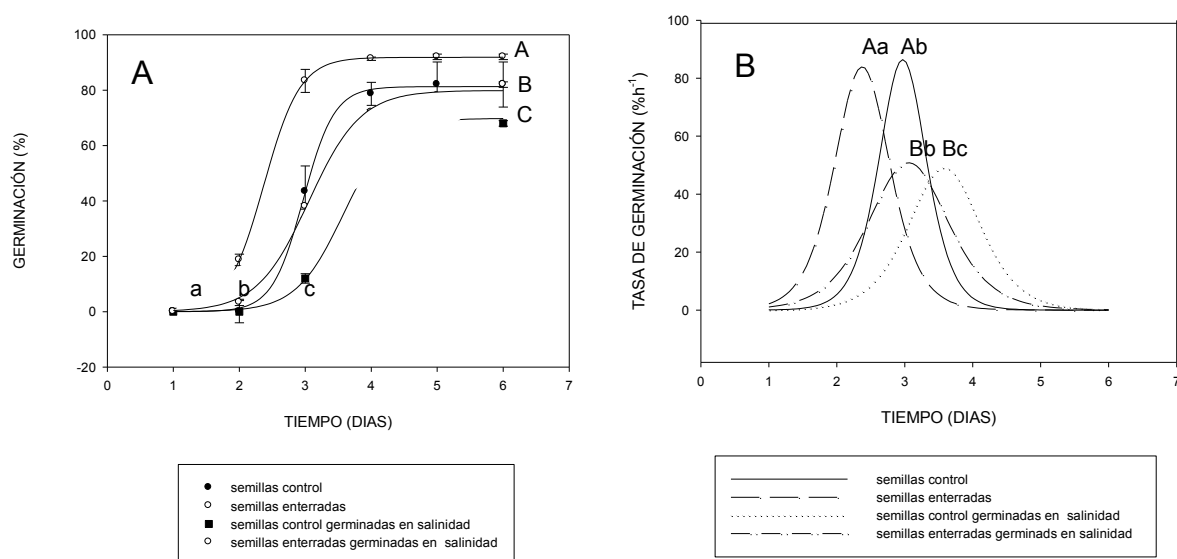


Figura 16: Efecto del acondicionamiento mátrico y salinidad sobre la germinación de *Wigandia urens*. Las letras indican diferencias estadísticas (A) minúsculas para inicio de germinación y mayúsculas para porcentaje de germinación, (B) minúsculas para tiempo medio de germinación y mayúsculas para tasa de germinación.

Para el caso de *Buddleja cordata* (Fig. 17), la velocidad de germinación y los tiempos medios de germinación se incrementan por efecto del acondicionamiento mátrico en semillas germinadas en condiciones óptimas ( $F_{(3,8)}=24.55$ ,  $p=0.0002$  y  $F_{3,8}=12.37$ ,  $p=0.002$ , respectivamente). Así mismo, el acondicionamiento modifica significativamente el porcentaje final para las

semillas germinadas en salinidad ( $F_{(3,8)}=17.76$ ,  $p=0.0007$ ).

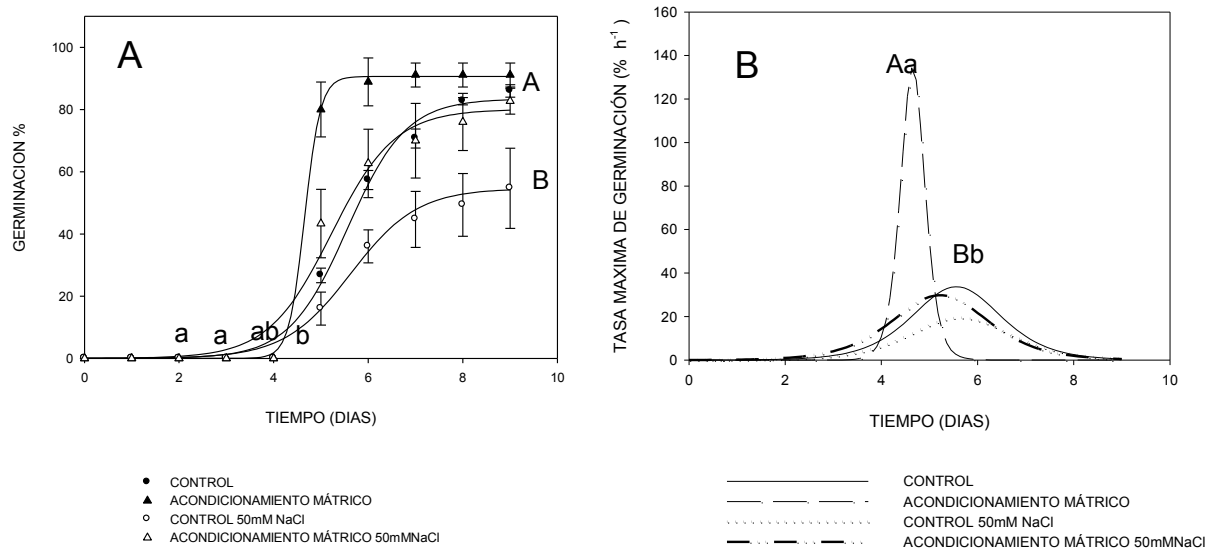


Figura 17: Efecto del acondicionamiento mátrico y estrés salino (NaCl 50mM) en semillas de *Buddleja cordata*. Letras distintas indican diferencias estadísticas (A) minúsculas para inicio de germinación y mayúsculas para porcentaje final, (B) minúsculas para tiempo medio de germinación y mayúsculas para tasa de germinación.

### Efecto del almacenamiento de semillas

Las semillas de *W. urens* almacenadas durante dos años, muestran el mismo patrón con respecto a lo observado en *A. thaliana*, ya que no se observan diferencias significativas en los parámetros germinativos entre semillas de reciente cosecha (control) y semillas almacenadas (Fig. 18). Sin embargo, al germinar dichas semillas bajo condiciones de estrés salino, sí se observan diferencias. Se obtuvo un porcentaje de germinación del  $82\% \pm 8.3$  en semillas control, mientras que las semillas almacenadas germinaron en  $59\% \pm 10.6$ . ( $p= 0.0359$ ). El inicio de la germinación es de 2 días en semillas almacenadas y de 3 en semillas control.

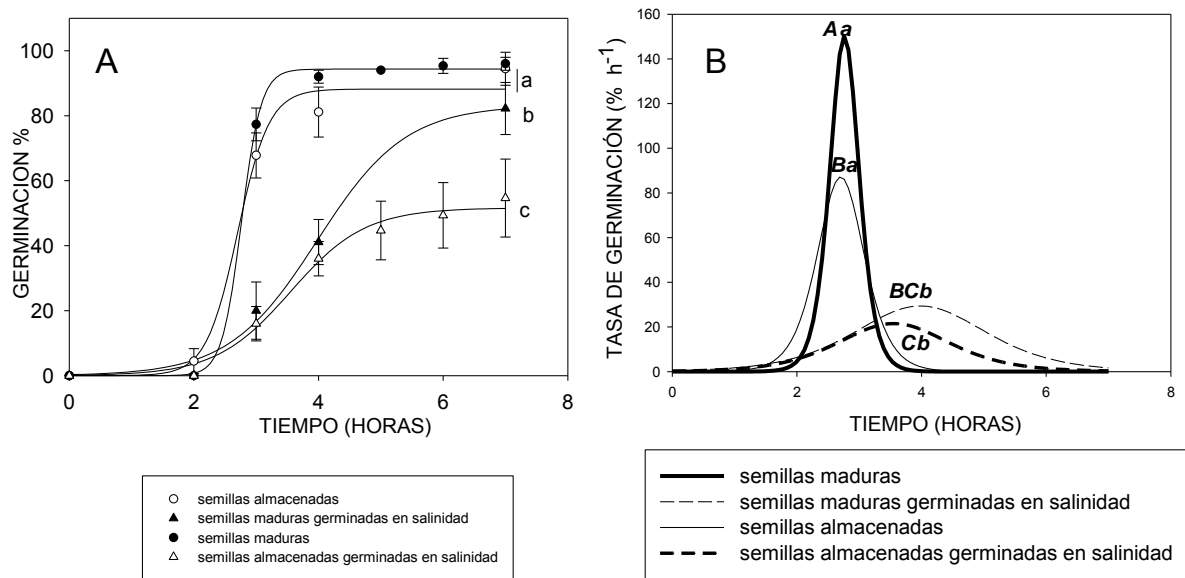


Figura 18: Efecto del envejecimiento en la germinación de *Wigandia urens* en condiciones óptimas de germinación y estrés salino para semillas (seis meses de cosecha) y para semillas almacenadas por dos años. Las letras indican diferencias estadísticas (A) porcentaje de germinación y (B) mayúsculas para tasa de germinación y minúsculas para tiempo medio de germinación.

Para el caso de *Buddleja cordata* observamos una respuesta similar. Las semillas control (seis meses post-cosecha) y almacenadas (dos años) no presentaron diferencias significativas en el porcentaje final de germinación (Fig. 19). Sin embargo, las semillas almacenadas presentan menor velocidad de germinación bajo condiciones de salinidad ( $F_{(3,8)}=5.99, p0.02$ ). El inicio de la germinación y el tiempo medio de germinación no presentan diferencias.

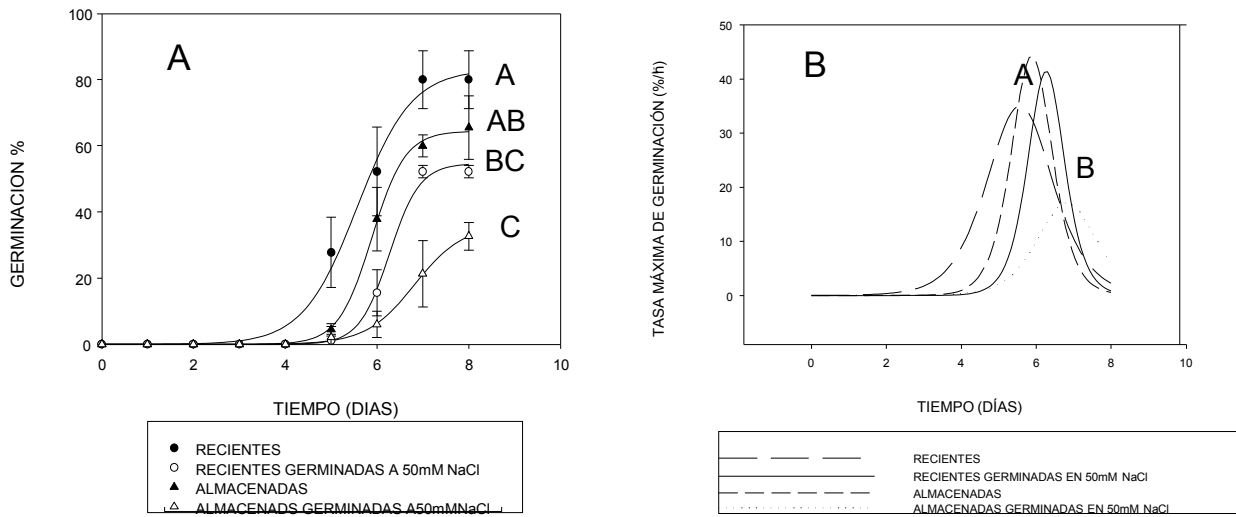


Figura 19: Efecto del envejecimiento en la germinación de *Buddleja cordata* en condiciones óptimas de germinación y estrés salino para semillas control (seis meses de cosecha) y almacenadas por dos años. Las letras indican diferencias estadísticas (A) porcentaje de germinación y (B) mayúsculas para tasa de germinación y minúsculas para tiempo medio de germinación.

**Patrones de Expresión en *Wigandia urens* y *Ceiba aesculifolia*: expresión de *At3g08030* durante el deterioro y/o envejecimiento de las semillas**

Con el objeto de clonar los genes ortólogos en *W. urens* y *B. cordata*, se llevó a cabo extracción de RNA de semillas. Para el caso de *W. urens*, se clonó una región del gene ortólogo de *At3g08030*, se secuenció y alineó con la de *A. thaliana* (Fig. 20). A pesar de que a partir de cDNA de semillas de *B. cordata* se amplificó una banda del tamaño adecuado, no se logró clonar ni obtener la secuencia.

Estudios realizados por Alvarado (2012) con *Ceiba aesculifolia* demostraron

que esta planta también responde al acondicionamiento mátrico y puesto que se contaba con el material biológico adecuado (semillas de 6 meses y almacenadas 2 años) y las curvas de germinación respectivas, se decidió clonar el gene ortólogo en esta especie (Fig 20).



Figura 20: Alineación entre las secuencias de las regiones ortólogas del gene *At3g08030* de *W. urens* y *C. aesculifolia*.

La expresión del gene ortólogo a *At3g08030* en las semillas de las dos especies silvestres *W. urens* y *C. aesculifolia* es similar a lo encontrado para *A. thaliana*. En ambos se detecta el mensajero del *At3g08030* en semillas control mientras que en las semillas almacenadas no se detecta el transcrito. En el caso de *C. aesculifolia*, el enterramiento mátrico mantiene la expresión (Fig. 21).

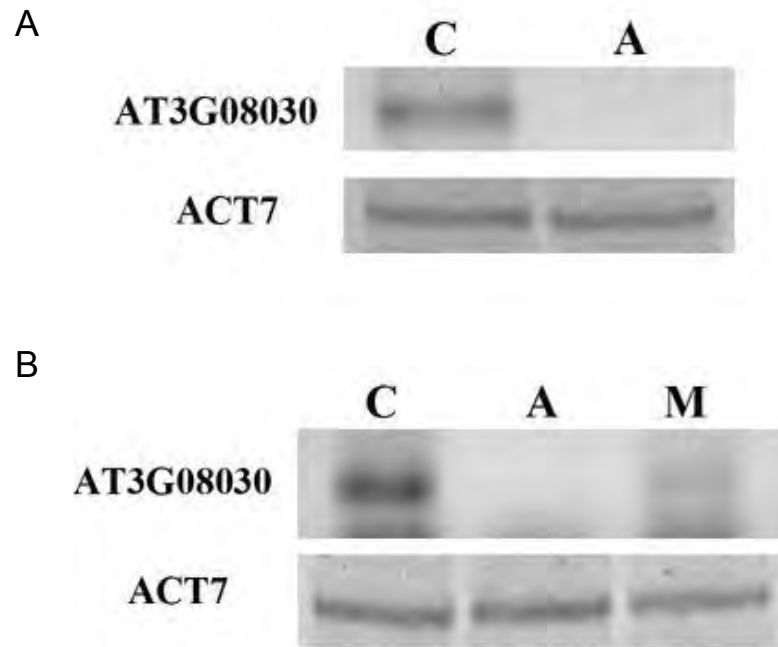


Figura 21: Expresión de genes ortólogos a *At3g08030* en semillas de (A) *Wigandia urens* y (B) *Ceiba aesculifolia*. C semillas control, A semillas almacenadas durante un año, M semillas con acondicionamiento mátrico. La actina 7 fue utilizada como control (panel inferior)

### **Sobreexpresión de *At3g08030* y *At5g25460***

La expresión del gene *At3g08030* se modifica en relación al deterioro de la semilla. Para profundizar en el estudio de su función en el proceso de envejecimiento y germinación, se sobreexpresó esta molécula en plántulas de *A. thaliana*. Este gene presenta dos formas, derivadas de un uso alternativo del primer exón, que genera dos proteínas con y sin péptido señal. El estudio preliminar en este trabajo se llevó a cabo con las plantas transgénicas que sobre expresan la proteína de tránsito sin péptido (SE08030).

Se detectó en el DNA genómico la presencia del transgene en las plantas transgénicas seleccionadas con kanamicina: el tamaño del inserto es menor

(972 pb) porque no presenta los intrones, mientras que el tamaño esperado para el transcrito con intrones es de (1303pb). Se obtuvieron 9 líneas de sobreexpresión (Fig. 22).

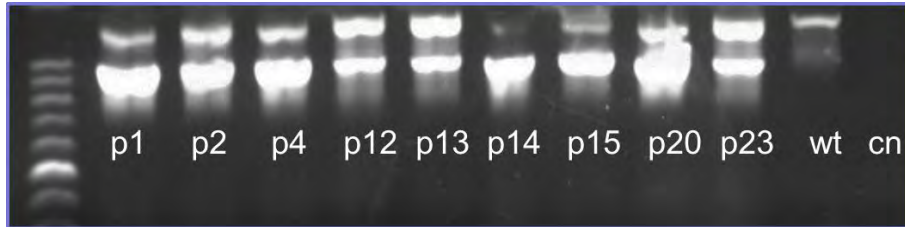


Figura 22: Amplificación del gene *At3g08030* en DNA genómico de plántulas resistentes a kanamicina (p). La banda superior corresponde al tamaño de transcrito con intrones y la inferior al inserto sin intrones.

### **Sobreexpresión del gene *At3g08030***

El gene *At3g08030* se expresa en todos los tejidos de *A. thaliana*. Por lo tanto, para corroborar su sobreexpresión, se realizó un ensayo de expresión en plantas sometidas a estrés hídrico por trasplante (Fig. 23). Se tomaron muestras de tejido foliar de plántulas de 8 días al tiempo del trasplante (d0) y a los dos días posteriores a éste (d2). Las plántulas silvestres d2 no expresaron el gene, contrario a lo que ocurrió en las plántulas SE08030 donde sí se detectó el transcrito.

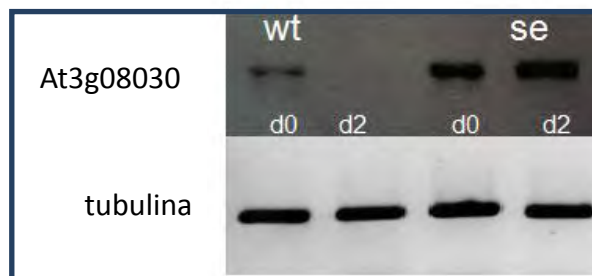


Figura 23: Expresión de *At3g08030* en plántulas silvestres (wt) y con sobreexpresión (SE08030) del gene *At3g08030* antes del trasplante (d0) y dos días posterior a éste (d2). Se utilizó tubulina como control interno.

La respuesta a diferentes tratamientos de acondicionamiento de las semillas control (2 meses de almacenamiento) de plantas SE08030 fue determinada (Fig. 24). El acondicionamiento mátrico no alteró la germinación de las semillas SE08030 con respecto a las semillas Wt tratadas (Fig. 24A). Se encontraron diferencias significativas en el tratamiento de acondicionamiento hídrico en la velocidad de germinación ( $t= 3.4709$ ,  $p=0.0255$ ) y en el tiempo medio de germinación ( $t= -3.82804$ ,  $p= 0.0186$ ) (Fig. 20B).

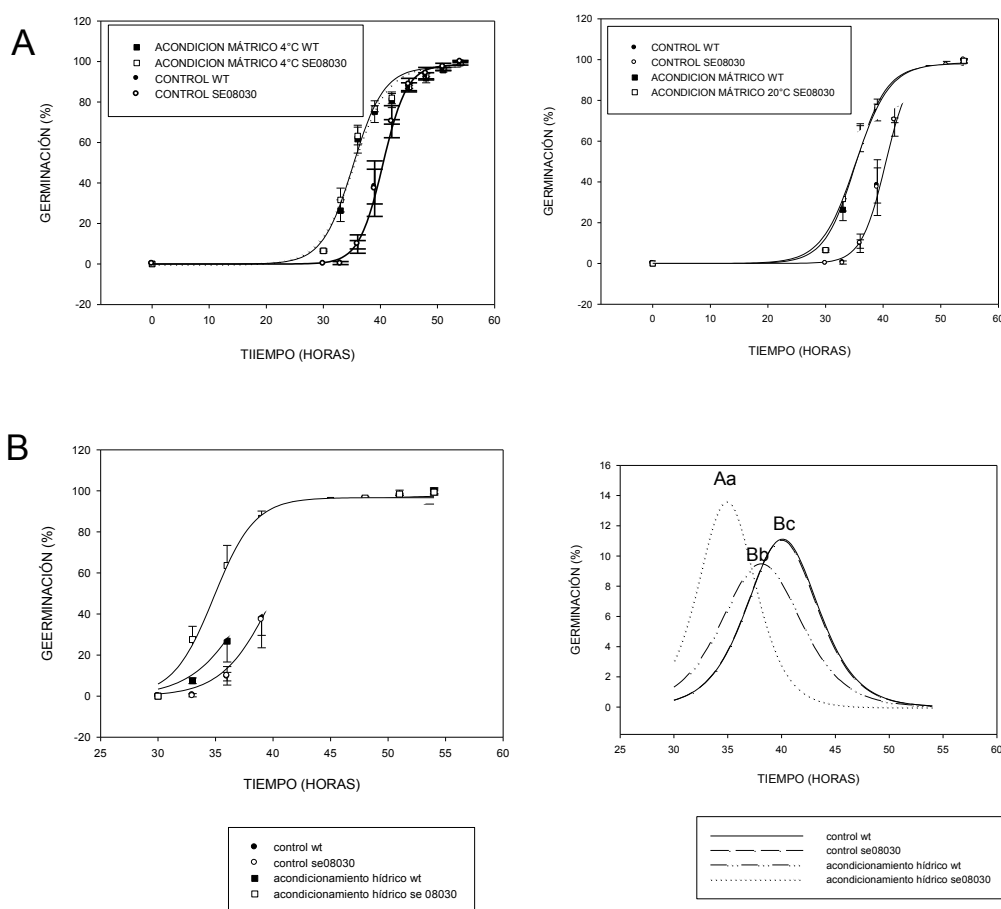


Figura 24: Efecto de tratamientos de acondicionamiento sobre la germinación de semillas control (wt) y SE08030. (A) semillas con acondicionamiento mátrico a 20°C y 4°C. (B) semillas con acondicionamiento hídrico. Las letras indican diferencias estadísticas entre los tratamientos; mayúsculas para tasa de germinación y minúsculas para los tiempos medios de germinación.



El efecto de los tratamientos también se determinó usando semillas recién liberadas (Fig. 25). El acondicionamiento hídrico no promovió la germinación de las semillas wt y afectó negativamente el desempeño de las semillas SE08030. En las semillas SE08030 tratadas el porcentaje de germinación fue menor ( $F_{(4,11)}=4.42$ ,  $p=0.04$ ) y el tiempo medio de germinación ( $F_{(4,7)}= 5.13$ ,  $p=0.030$ ) fue mayor. El acondicionamiento mátrico a 4°C aceleró el inicio de la germinación con respecto a las semillas control tanto en semillas wt como en las SE08030 ( $F_{(3, 8)}= 16.15$ ,  $p= 0.0012$ ). Las semillas silvestres mostraron una mayor velocidad de germinación respecto a las SE08030 ( $F_{(3,8)}= 7.96$ ,  $p=0.0087$ ). A diferencia de lo que ocurre con las semillas maduras, la sobreexpresión reduce los tiempos medios de germinación ( $F_{(3,8)}=5.13$ ,  $p=0.03$ ).

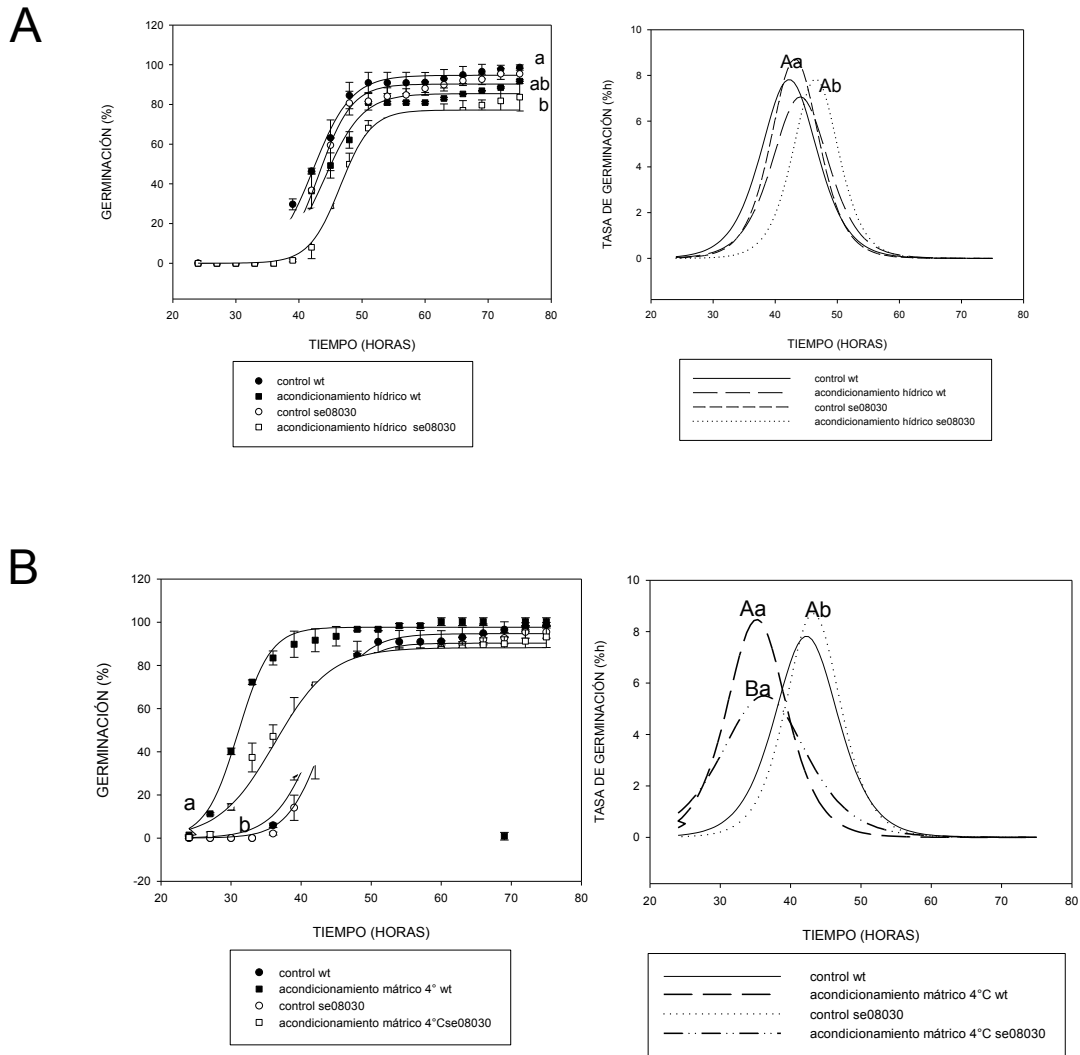


Figura 25: Germinación en semillas recién liberadas silvestres (wt) y SE08030. (A) semillas con acondicionamiento hídrico (B) semillas con acondicionamiento matricio. Las letras indican diferencias estadísticas entre los tratamientos; mayúsculas para tasa de germinación y minúsculas para los tiempos medios de germinación.

### **Sobreexpresión del gene *At5g25460***

Los experimentos realizados indicaron que las semillas que contienen una sobreexpresión del transcrito *At5g25460* muestran un inicio más temprano de la germinación con respecto a las semillas silvestres ( $F_{(5, 12)} = 49.97$ ,  $p < 0.05$ )

(Fig. 26). El tiempo medio de germinación es significativamente diferente en todos los tratamientos entre las semillas wt y las sobre expresoras ( $F_{(5,12)} = 36.30$ ,  $p < 0.05$ ). La velocidad de germinación es mayor en semillas silvestres con acondicionamiento hídrico, con respecto al resto de los tratamientos ( $F_{(5,12)} = 63.3$ ,  $p = 0.004$ ).

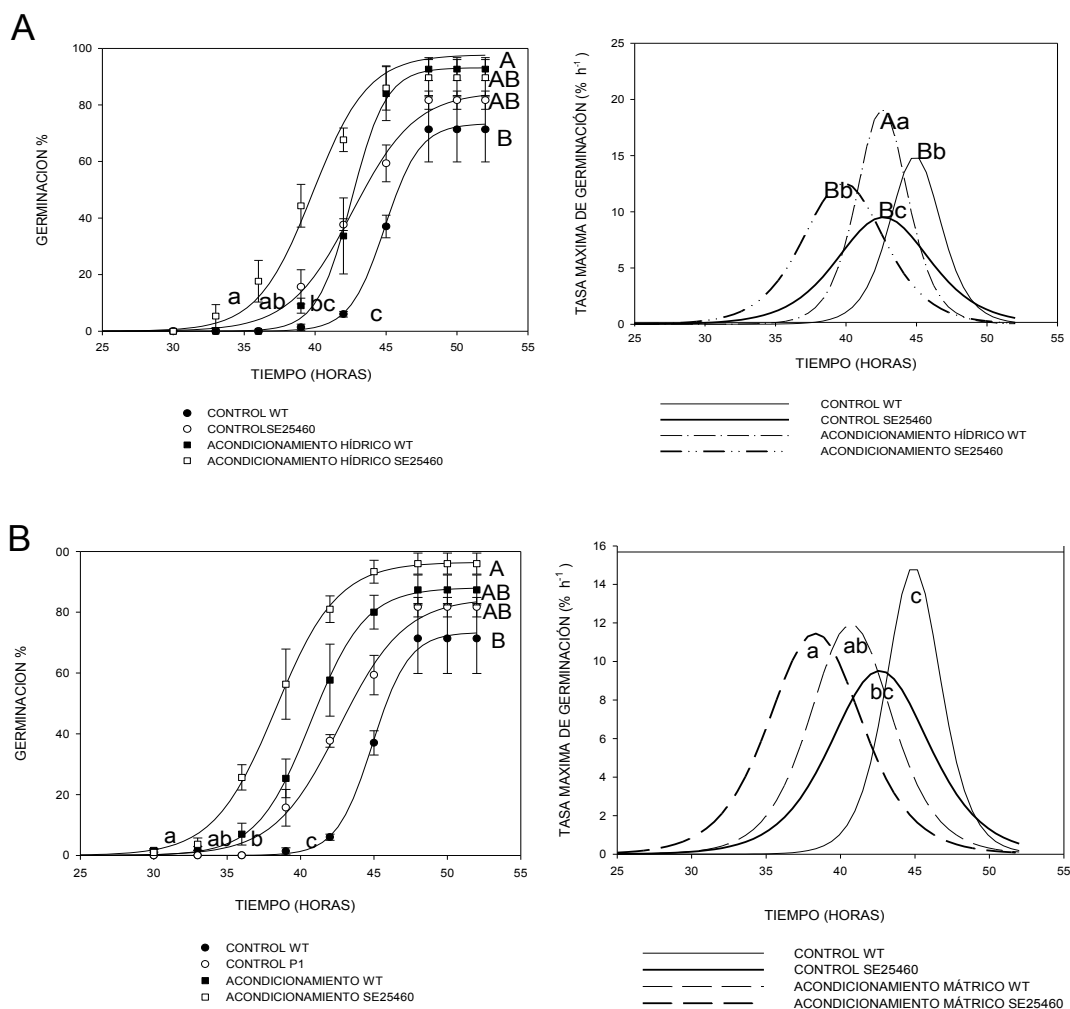


Figura 26: Germinación en semillas silvestres (wt) y sobre expresoras del gene *At5g25460*. (A) con acondicionamiento hídrico (B) con acondicionamiento mátrico. Las letras indican diferencias estadísticas. En (A) mayúsculas para porcentaje de germinación y minúsculas para inicio de germinación, (B) mayúsculas para tasa de germinación y minúsculas para tiempo medio de germinación.

## **Análisis preliminar de los cambios en la expresión de genes de *Arabidopsis thaliana* durante los tratamientos de acondicionamiento utilizando la técnica de microarreglos**

Las posibles vías genéticas involucradas en el mejor desempeño germinativo de las semillas tratadas se detectaron al comparar la expresión masiva de genes utilizando la técnica de microarreglos.

Las semillas control se compararon con las semillas tratadas con acondicionamiento mátrico y con las semillas tratadas con acondicionamiento hídrico en experimentos independientes. La lista de los genes con una disminución o aumento de la expresión de cuando menos 1.5 veces se presenta en el anexo 2.

Con el objeto de determinar que procesos metabólicos de los que se estimulan durante la germinación temprana podrían estar relacionados con la respuesta al acondicionamiento, se analizaron los genes que cambiaron su expresión en vías metabólicas primarias (tabla 1 y Figura 27-29).

La información obtenida también se analizó con el programa DAVID Bioinformatic Resources 6.7 para su agrupación funcional. En las tablas 2 (aumento de la expresión) y 3 (disminución de la expresión) se presentan los grupos con valores de enriquecimiento mayores o iguales a 1.00, para genes comunes a ambos tratamientos (MH) y para los tratamientos de acondicionamiento mátrico (M) e hídrico (H). El valor de enriquecimiento (enrichment score) se refiere a la relación entre los genes que presentaron un cambio con respecto al total de genes descritos para una función particular.

**Tabla 1: Enzimas con cambios en expresión en metabolismo primario**

Vía metabólica	Tratamiento	Aumento de expresión	Disminución en expresión
Glucolisis	MH	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aldehído deshidrogenasa fam 3 miembro II (cloroplástica) <i>At4g34240</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fosfoglucomutasa (citoplásmica) <i>At1g70730</i></li> <li>Piruvato deshidrogenasa E1 sub alfa 2 (mitocondrial) <i>At1g24180</i></li> </ul>
	M	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fosfofructocinasa 4 (cloroplástica) <i>At5g61580</i></li> <li>Hexocinasa 4 <i>At3g20040</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dihidrolipolisina acetiltransferasa 3 de piruvato deshidrogenasa (mitocondrial) <i>At1g54220</i></li> </ul>
	H	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aldosa 1 epimerasa <i>At5g15140</i></li> <li>Alcohol deshidrogenasa clase P <i>At1g77120</i></li> <li>Piruvato cinasa <i>At3g55810</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fosfoenolpiruvato carboxinasa 2 <i>At2g36530</i></li> <li>Dihidrolipolisina acetiltransferasa 1 de piruvato deshidrogenasa (mitocondrial) <i>At3g52200</i></li> </ul>
Ciclo tricarboxílico	MH		<ul style="list-style-type: none"> <li>Malato deshidrogenasa (glisomal)</li> <li>Piruvato deshidrogenasa Componente E1 subunidad alfa 2 (mitocondrial) <i>At1g24180</i></li> </ul>
	M	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aconitato hidratasa 2 (mito) <i>At2g05710</i></li> <li>Isocitrato deshidrogenasa subunidad catalítica 5 (mitocondrial) <i>At5g03290</i></li> <li>Isocitrato deshidrogenasa subunidad regulatoria 1 (mitocondrial) <i>At4g35260</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Citrato liasa A1 <i>At1g10670</i></li> <li>Malato deshidrogenasa1 <i>At1g53240</i></li> <li>Dihidrolipolisina acetiltransferasa 3 de piruvato deshidrogenasa (mitocondrial) <i>At1g10640</i></li> <li>Succinato deshidrogenasa subunidad 2 (mitocondrial) <i>At5g40650</i></li> </ul>
	H	<ul style="list-style-type: none"> <li>Citrato liasa A2 <i>At1g60810</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Citrato cinasa 5 (mitocondrial)</li> <li>Dihidrolipolisina acetiltransferasa 1 de piruvato deshidrogenasa (mitocondrial)</li> <li>Piruvato isocitrato deshidrogenase parecida a subunidad 4</li> </ul>
Vía de pentosas	MH	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ribosa 5 fosfato isomerasa A <i>At5g44520</i></li> </ul>	

	M	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6 fosfofructocinasa <i>At5g60580</i></li> <li>• 6 fosfogluconato deshidrogenasa descarboxilante <i>At5g41670</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucosa 6 fosfato1 deshidrogenasa 3 (cloroplástica) <i>At1g24280</i></li> <li>• Glucosa 6 fosfato1 deshidrogenasa 4 (cloroplástica) <i>At1g09420</i></li> </ul>
	H		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucosa 6 fosfato1 deshidrogenasa 2 (cloroplástica) <i>At5g13110</i></li> <li>• 6 fosfoglucolactonase 2 <i>At3g49360</i></li> <li>• Ribosa fosfato pirofosfocinasa <i>At2g35390</i></li> </ul>
Metabolismo de purinas	MH		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ribosa-fosfato pirofosfocinasa 1</li> </ul>
	M	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenin fosforibosil transferasa</li> <li>• Ribonucleótido difosfato reductasa</li> <li>• <i>At4g22570</i></li> </ul>	
	H	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Piruvato cinasa</li> <li>• <i>At1g71750, At2g35040, At3g57080</i></li> </ul>	
Metabolismo de pirimidinas	H	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>At1g308200, At3g57080</i></li> <li>• Utridilato cinasa</li> </ul>	
Glutación	H	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>At1g02950, At2g29490</i></li> <li>• Glutación peroxidasa 4 (probable)</li> <li>• Spermidina sintetasa 2</li> </ul>	
Reparación de DNA	M	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RAD50 (<i>At2g31950</i>)</li> <li>• RAD51 homólogo 2 (<i>At2g28560</i>)</li> <li>• Inducida por daño al DNA (<i>At3g13235</i>)</li> <li>• <i>At4g03360, At4g05260</i></li> <li>• Flap endonucleasa GEN like2</li> <li>• Ribonucleósido difosfato reductasa de cadena corta C</li> <li>• <i>At1g05900, At1g10520, At1g18090, At5g57970</i></li> </ul>	

	H		<ul style="list-style-type: none"> <li>• SNM1 reparación de DNA por entrecruzamiento</li> <li>• DNA ligasa 6</li> <li>• Proteína de reparación de mala alineación Msh2</li> <li>• Proteína de reparación de mala alineación Msh6-2</li> </ul>
Metabolismo de aminoácidos	MH		<ul style="list-style-type: none"> <li>• anthranilato sintasa componente II (try)</li> <li>• indole-3-glycerol phosphato sintetasa</li> <li>• tryptophano sintetasa cadena beta</li> <li>• 1-aminociclopropane-1-carboxilato sintetasa 9 (cys)</li> <li>• Metiltransferasa específica de cisteína</li> <li>• Peroxidasas :25,30,52,57</li> <li>• Fosfo serina aminotransferasa</li> <li>• Triptófano sintasa cadena beta</li> </ul>
	M	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Histidinol fosfato aminotransferasa (cloroplástica)</li> <li>• Aspartato amino transferasa (cloroplástica) <i>At5g11520</i></li> <li>• Peroxidasa 18,54</li> <li>• cisteína sintetasa</li> <li>• Leucina aminopeptidasa</li> <li>• Diaminotransferasa</li> </ul>	
	H	<ul style="list-style-type: none"> <li>• glutamin sintetasa (citosólica)</li> <li>• <i>At3g54640</i></li> <li>• Histodinol fosfato aminotransferasa</li> <li>• spermidina sintetasa 2</li> <li>• nitrato reductasa</li> <li>• peroxidasas:8,67,5,21</li> <li>• 2isopropilmalato sintasa</li> <li>•</li> </ul>	

Degradación de ácidos grasos (w-oxidación)	MH	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aldehído deshidrogenasa fam 3 miembro II (cloroplástica)</li> </ul>	
	H	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alcohol deshidrogenasa</li> </ul>	
Degradación de ácidos grasos (B-oxidación)	M	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hidroxi isobutiril-CoA tipo-proteína 5 hidrolasa proteína 5 (<i>At1g06550</i>)</li> <li><i>pex1</i> (<i>At5g08470</i>)</li> <li><i>pex2</i> (<i>At1g79810</i>)</li> <li>GDSL esterase/lipasa EXL2 (<i>At1g78890</i>)</li> <li>GDSL esterase/lipasa EXL3 (<i>At1g75900</i>)</li> <li>Fosfoinositido fosfolipasa C2 (<i>At3g08510</i>)</li> <li>Fosfoinositido fosfolipasa C6 (<i>At2g40116</i>)</li> </ul>	
	H	<ul style="list-style-type: none"> <li>triacil glicerol lipasa (<i>At4g1350</i>)</li> <li>proteína que contiene dominio alpha/beta-hidrolasa (<i>At1g73920</i>)</li> <li>proteína de la familia lipasa clase 3 (<i>AT3G48080</i>), <i>At3g62590</i>, <i>At4g13550</i></li> </ul>	



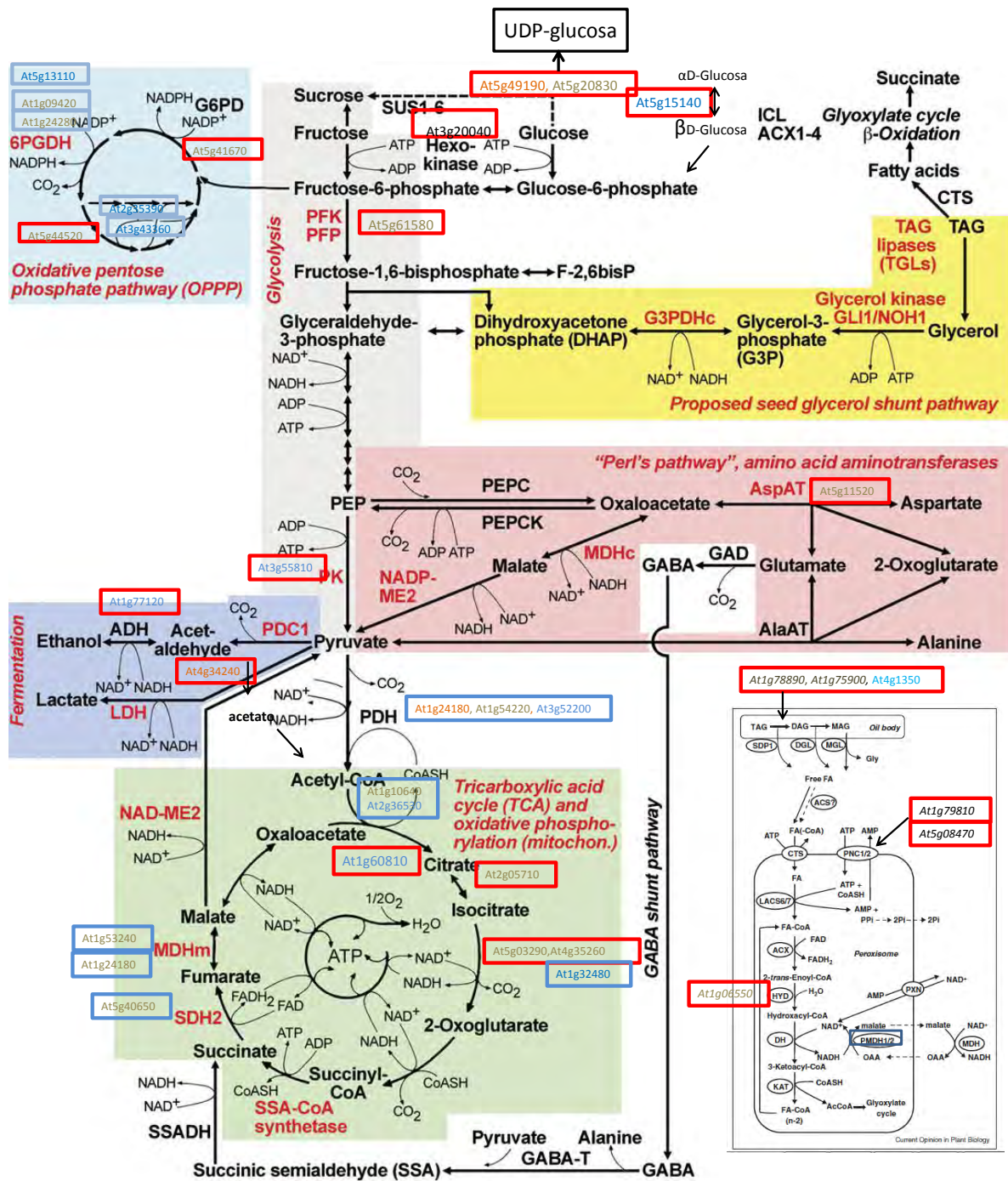


Figura 27: Genes que modifican su expresión en las principales rutas metabólicas. Recuadros rojos indican aumento, recuadros azules indican disminución, letras cafés en acondicionamiento mátrico, letras azules en acondicionamiento hídrico y letras naranja en ambos tratamientos. Modificado

de Weitbrecht *et al.*, 2011 y Theodoulou y Eastmond, 2012

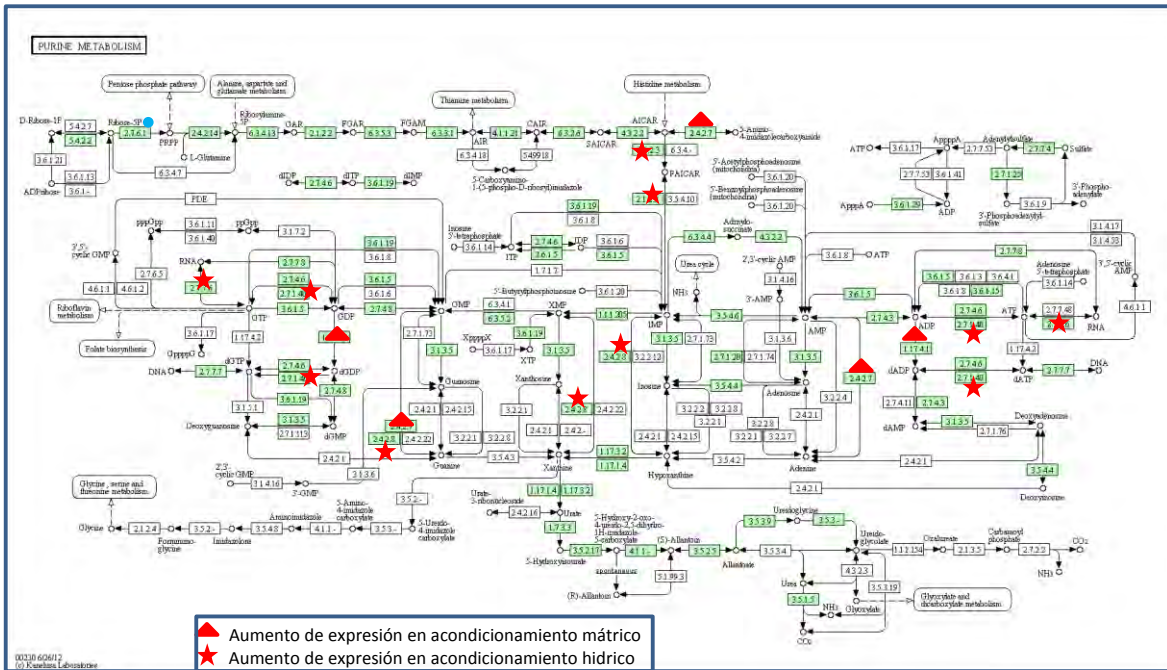


Figura 28: Enzimas involucradas en el metabolismo de purinas que aumentan su expresión con los tratamientos de acondicionamiento. Tomado de *Kegg pathway* en *David bioinformatics resources 6.7*

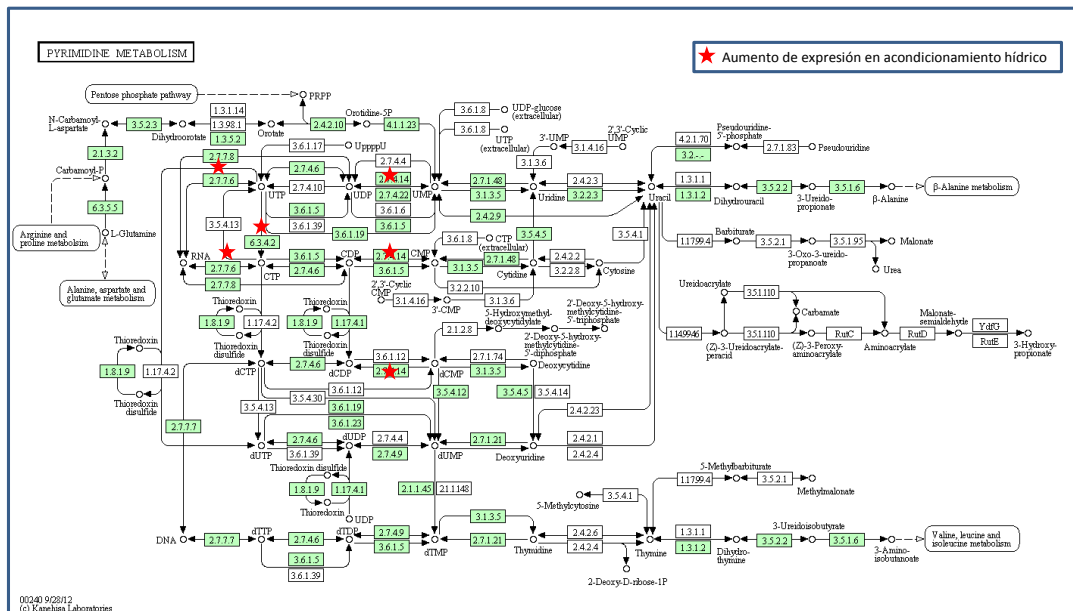


Figura 29: Enzimas involucradas en el metabolismo de pirimidinas que aumentan su expresión con los tratamientos de acondicionamiento hídrico. Tomado de Kegg pathway en *David bioinformatics resources 6.7*

Tabla 2: Grupos funcionales con mayor expresión con respecto al control para acondicionamiento mátrico (M), hídrico (H) y comunes (M y H)

Tratamientos	M	H	
Número de genes (1980)	263	873	844
<b>GRUPO</b>	<b>VALOR DE ENRIQUECIMIENTO</b>		
<u>glucosil transferasas</u>	1.81	0.76	
ciclo circadiano		1.78	
armadillo		1.6	
<u>Ubiquitinas</u>	0.32	1.56	1.28
PPR		1.36	
Ribosomas			1.28
<u>Citoesqueleto</u>	0.38	1.23	0.96
Unión a lípidos	0.6	1.22	0.42
LRR	0.16	0.34	1.11
cadena respiratoria	1.09	0.41	
síntesis de carbohidratos	1.09		0.87
<u>cinasas y uniones a nucleósidos</u>	0.59	1.08	
respuesta a hormonas y estímulos endógenos	0.77	1.02	0.59

### Genes que aumentan su expresión

Los genes compartidos para ambos tratamientos fueron analizados (MH) y corresponden a: glucosil transferasas, la cadena respiratoria y síntesis de carbohidratos. Las glucosil transferasas son enzimas que catalizan la adición de un grupo glucosil de un azúcar UDP a una molécula hidrofóbica y están

involucradas en regular diversos procesos metabólicos. De los 7 miembros cuya expresión aumenta en ambos tratamientos solo en dos se ha descrito su función: *At5g17050*- flavonoide 2-O-glucosil transferasa y *At5g49190*-sacarosa sintetasa 2. Esta última está reportada en el embrión, endospermo y testa de las semillas. Su función es hidrolizar la sacarosa para proporcionar UDP glucosa necesaria para la biosíntesis de glicoproteínas requeridas para la formación de nueva pared celular. En el tratamiento de acondicionamiento mátrico también encontramos otros 7 transcritos relacionados con glucosil transferasas, aunque con menor valor de enriquecimiento y sin función específica reportada.

El grupo funcional correspondiente a la cadena respiratoria solo presentó 3 miembros que forman parte del complejo I mitocondrial y con un alto valor de enriquecimiento: *At1g67350*, *At2g42310*, *At4g20150*

La síntesis de polisacáridos, el proceso relevante para ambos tratamientos, presentó 5 miembros de los cuales solo para *At5g37180* (Sacarosa Sintasa 5 para síntesis de calosa), *At4g24000* (celulosa sintasa) y *At5g49190* (SUS2) se ha descrito su función.

Los grupos funcionales compartidos en ambos tratamientos, pero no necesariamente con los mismos genes y con un alto valor de enriquecimiento para algún tratamiento, también fueron analizados. Esos grupos incluyen las ubiquitinas, citoesqueleto, transporte de lípidos, proteínas LRR, proteínas cinasas y de unión a nucleótidos y respuesta a hormonas y estímulos endógenos.

El grupo de proteínas con dominio de ubiquitina está altamente representado en ambos tratamientos pero no presentan ningún elemento en común. Siete genes aumentan su expresión en el tratamiento mátrico de los cuales tres se ha descrito su función: *At3g19040* (Factor de iniciación de la transcripción HAF2, relacionado con luz), *At3g13235* (ubiquitina inducida por daño en el

DNA), *At1g23410* (asociada a 40S ribosoma). En el caso del tratamiento hídrico se ha descrito la función de seis de los ocho genes: *At1g65350* (UBQ13), *At5g55160* (SUMO2, proteína involucrada en sumoilación), *At2g47110* (asociada a 40S ribosoma), *At4g02890* (UBQ14), *At4g05320* (UBQ10) y *At4g05050* (UBQ11).

Los tratamientos de acondicionamiento promueven la expresión de genes relacionados con la actividad motora del citoesqueleto. Se detectó el aumento en la expresión de 4 genes en común: 2 para actinas (*At5g59370* y *ATSCAR4* que se expresa durante la expansión de los cotiledones), 1 proteína relacionada (*At1g13180*) y otra cuya función no está descrita. Para acondicionamiento mátrico aumentó la expresión de 11 genes relacionados con proteínas involucradas en la actividad motora del citoesqueleto [*At1g20060*, *At1g20570*, *At1g73860*, *At3g43210* (involucrado en citocinesis), *At3g44730* (involucrado en mantener los niveles de ATP durante la germinación), *At3g63480*, *At4g14330* (asociado a la formación del fragmoplasto durante la división celular), *At4g39050*, *At3g60640*, *At2g03670* (relacionada con división celular) y la fimbrina1 *At4g26700*]. Para acondicionamiento hídrico 9 proteínas que participan en la regulación de microtúbulos presentaron un aumento de expresión (*At1g22620*, *At2g1750*, *At2g8720*, *At5g23720*, *At2g43800* (proteína tipo formina 2), *At4g15200* (proteína tipo formina 3), *At2g19770* (profilina 4), *At4g29340* (profilina 3) y *At2g46225* (AB1L1).

Los genes relacionados con proteínas transportadoras de lípidos también presentan un aumento en la expresión en ambos tratamientos con 4 en común: *At1g32280*, *At4g22630*, *At5g59330* y *At1g17500* (transporte de fosfolípidos). Para el acondicionamiento mátrico, se detectaron 8 proteínas: tres de unión a oxisterol (*At2g31030*, *At4g12460* y *At5g59420*), una anexina D3 (*At2Gg38760*), una proteína de unión a esteroides de membrana (*At5g52240*), una proteína de transporte intermembranal (*At5g59310*), una

involucrada en la regulación de brasinoesteroides (*At4g39400*) y una proteína de ensamblaje de clatrin (*At4g25940*). En el caso del tratamiento hídrico fueron 9 que corresponden a dos albúminas con función de transporte de lípidos (*At1g36150* y *At3g07450*), una de transporte de fosfolípidos (*At3g27870*) y tres generales *At5g07630*, *At3g51600* y *At1g27950*.

Las proteínas LRR (por sus siglas en inglés, **Leucine Rich Repeat**) también aumentan su expresión con 5 miembros en común, 19 para el acondicionamiento mátrico y 25 en el tratamiento hídrico. Las proteínas LRR constituyen una familia con dominios que presentan motivos repetidos de leucina que participan en el reconocimiento e interacción proteína-proteína. Generalmente forman parte de receptores de membrana y están involucradas en procesos de transducción de señales, respuesta inmune y reparación del DNA. De los 19 genes detectados para acondicionamiento mátrico, 5 están relacionados con resistencia a patógenos (*At1g27180*, *At2g14080*, *At3g51560*, *At5g16000* y *At5g36930*) y los demás no tienen descrita función alguna. Solo la función para 5 de los 25 miembros con aumento en tratamiento hídrico ha sido descrita: *At3g46730* tiene funciones contra defensa ante patógenos, *At1g61850* presenta un dominio catalítico con actividad de fosfolipasa, *At3g44670* está involucrado en la respuesta de defensa al hongo *Peronospora parasitica*, *At3g56100* es un receptor que reconoce al factor de transcripción de la familia MADS AGL24 involucrado en la floración y *At2g17020* está relacionado con la degradación de proteínas.

El grupo de proteínas de unión a nucleótidos y con actividad de cinasa está ampliamente representado. Se detectaron 30 genes comunes a ambos tratamientos de los cuales 11 corresponden a serina/treonina-cinasas incluyendo 2 de la familia WNK involucradas en fotoperiodo, 5 son proteínas relacionadas con el metabolismo (Fig. 30), 4 con unión a DNA y 2 actinas. Para el tratamiento de acondicionamiento mátrico se detectó el aumento en la expresión de 94 genes de los cuales 28 codifican para serin/treonin cinasas

entre las cuales destacan TOUSLED, involucrada en ciclo celular y *At4g28650* cuya función está relacionada con el desarrollo del tejido vascular. En este grupo también se encuentran 17 genes involucrados en metabolismo, 5 relacionados con unión a DNA y 6 de citoesqueleto. Adicionalmente, hay un incremento en 5 genes para proteínas de respuesta a patógenos (ver anexo 3).

Los transcritos relacionados con respuesta a hormonas se incrementan de manera más importante en el tratamiento mátrico y corresponden a genes involucrados principalmente en señalización en respuesta a auxinas (12), etileno (9), ácido abscísico (4), brasinoesteroides (1), ácido salicílico y/o jasmónico (2) y ácido giberélico (1). Para la mayoría de los genes relacionados con auxinas se desconoce su función, el más relevante para la germinación es ASIL1 (*At1g54060*), que está involucrado en la represión de la maduración del embrión de la semilla y el llenado del grano. Además de los 9 genes involucrados en señalización, se expresan dos genes relacionados con la regulación negativa de la síntesis de etileno. De los cuatro genes relacionadas ácido abscísico, 2 están relacionados con resistencia a la desecación; LEA y GEA1 y las otras dos con señalización. El gene que responde a ácido giberélico y está involucrado en regular el tamaño de la semilla. Son 8 los genes que aumentan su expresión en ambos tratamientos, de ellos 5 responden a etileno, 2 a auxinas y uno a giberelinas. En el grupo de los 20 genes con aumento en acondicionamiento hídrico encontramos 7 que responden a auxinas, 5 a ácido abscísico, 2 a etileno y 2 a ácido giberélico. De ellas trece proteínas responden a auxinas, *At2g21210* está relacionada con la respuesta a patógenos, *At3g23250* con sequía y estrés hídrico y *At1g22640* con estrés abiótico en general; doce proteínas responden a ácido abscísico: *At1g31930* interviene en la regulación de la germinación, *At5g02310* reduce la sensibilidad al ABA y *At3g50970* responde al frío e induce la expresión de dehidrinas. Un sólo gene está relacionado con giberelinas (*At5g59845*) (ver anexo 3).

Para el acondicionamiento mátrico los grupos de mayor importancia fueron los



relacionados con: ciclo circadiano, familia de proteínas con dominio ARMADILLO y familia de proteínas con dominio pentatricopéptido (PPR).

La ruta del ciclo circadiano en semillas se encuentra inactivo y se activa rápidamente durante la germinación (Fig 30). Los genes *At3g60250* (casein cinasa II- subunidad beta 3, fosforila CCA1), *At3g04910* (proteína cinasa serina/treonina WNK1, fosforilación de APR3/TOC1), *At5g61380* (TOC1) y *At5g02810* (APR7) codifican para proteínas fundamentales para el funcionamiento adecuado del ciclo circadiano.

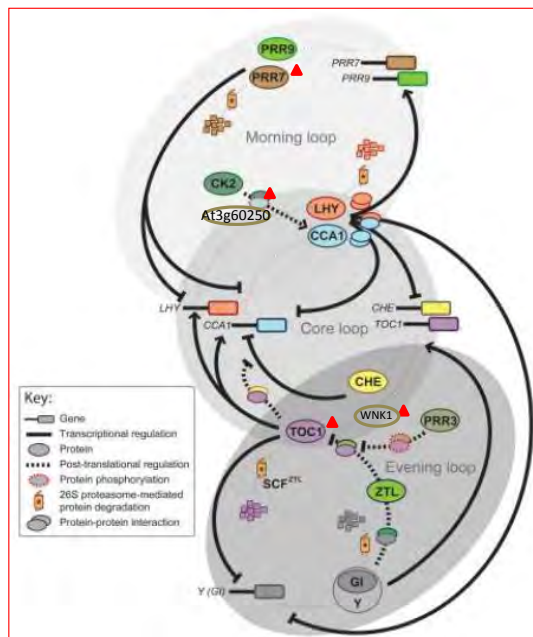


Figura 30: Ciclo circadiano en plantas. Los triángulos rojos indican las proteínas que se encuentran con mayor expresión en el tratamiento de acondicionamiento matricial. Tomado de Pruneda-Paz y Kay, 2010.

La familia de genes que codifican para proteínas con dominios denominados ARMADILLO también presenta un alto valor de enriquecimiento en ambos tratamientos. El dominio ARMADILLO de estas proteínas contiene grupos de 40 aminoácidos repetidos en tándem involucrado en las interacciones con otras proteínas. La importancia de este dominio en el desarrollo animal ha sido



ampliamente descrita. Los genes *At5g18340*, *At4g36550* y *At4g21350* codifican para proteínas que contienen el dominio ARMADILLO y un dominio U-Box involucrado en reconocimiento de ubiquitinas. Ninguno de los 13 genes cuya expresión aumenta en acondicionamiento mátrico ha sido reportado en semilla.

La familia de proteínas con dominio PPR (dominio pentatricopéptido) que intervienen en el transcripción, procesamiento y edición de RNA mitocondriales y cloroplásticos estuvo representada por 23 miembros, todavía no se ha determinado la función específica para ninguno de ellos.

Las proteínas ribosomales son el único grupo que aumenta su expresión exclusivamente en acondicionamiento hídrico. Se trata de 11 proteínas que conforman alguna de las subunidades ribosomales o que interactúan con ellas, forman parte de las subunidades 40S, 50S, 60S o son proteínas que se asocian con él.

**Tabla 3: GENES QUE REDUCEN SU EXPRESIÓN CON RESPECTO AL CONTROL PARA ACONDICIONAMIENTO MÁTRICO (M), HÍDRICO (H) Y COMUNES (M y H)**

Tratamiento	M y H	M	H
Número de genes (2241)	258	1157	826
	<b>VALOR DE ENRIQUECIMIENTO</b>		
modificaciones en pared	0.66	8.33	0.49
		1.33	
almacenamiento de semilla		2.96	
respuesta a factores ambientales		2.86	0.93
almacenamiento de lípidos		2.63	1.32
respuesta a hormonas y señalización	0.06	1.54	
Maduración y latencia de semillas	0.17	1.48	
Dedos de zinc relacionados con <u>primordios de raíces</u>	0.1		2.23
Transporte de aminoácidos	1.42		
Metilación	1.32		
Regulación negativa de la transcripción			1.46

### Genes que reducen su expresión

Los grupos compartidos agrupados funcionalmente para ambos tratamientos fueron analizados. Estos grupos incluyen modificaciones en la pared, transporte de aminoácidos y ácidos orgánicos y metilación. El grupo que muestra mayor valor de enriquecimiento, corresponde a los genes relacionados con modificaciones en la pared celular. Este grupo baja su expresión particularmente en el tratamiento de acondicionamiento mátrico y está compuesto por extensinas, proteínas que se identifican por motivos repetitivos ricos en leucina o en prolina. En este estudio, encontramos que de los 13 genes de extensinas con menor expresión en las semillas tratadas; 11

corresponden a las proteínas con motivos ricos en prolina y 2 contienen motivos repetidos de leucina: *At1g12040* y *At1g62440* (LRX2) están involucradas en la morfogénesis de raíz y *At2g27380* (ATEPR1) se expresa en el endospermo durante la germinación. Existe otro grupo de 41 miembros de proteínas de pared que bajan su expresión en acondicionamiento mátrico, pero con menor valor de enriquecimiento (1.33). En este grupo encontramos glucanasas, hidroxilasas, expansinas, pectin metil esterasas, entre otras proteínas de pared. Seis genes se comparten para ambos tratamientos y son la subunidad catalítica de la celulosa sintetasa 7 (*At5g44830*), endoglucanasa 21(*At4g24260*), expansina A3 (*At2g37640*) y dos probables inhibidores de pectinesterasa 20 Y 42 (*At2g47550*-y *At4g03930*).

Cuatro proteínas que pertenecen a la familia de transportadoras de aminoácidos reducen su expresión en ambos tratamientos: *At2g40420*, *At3g13620*, *At5g04770* y *At5g65990*. Ninguna tiene una función específica reportada.

El grupo de proteínas relacionadas con metilación de DNA también presenta un alto nivel de enriquecimiento y consta de 4 miembros. *At5g11530* está involucrada en la regulación del desarrollo de semilla, *At5g49160* en el tamaño de semilla y *At4g09980* interviene en la instalación de latencias en semillas.

Los grupos funcionales que bajan su expresión y presentan mayores valores de enriquecimiento en acondicionamiento mátrico son: almacenamiento en semilla, respuesta a hormonas, maduración y latencia de semillas y los relacionados con membrana celular.

El grupo de proteínas de almacenamiento de semillas, pertenecen al grupo de albúminas que tienen funciones tanto de almacenamiento en semilla, como de unión y transporte de lípidos. Este grupo está conformado por 15 proteínas que corresponden a 8 albúminas 2S, 4 SESA y 3 oleosinas cuya función está relacionada con el mantenimiento de cuerpos lipídicos. Otro grupo que reduce

su expresión en condicionamiento mátrico es el que corresponde a respuesta a hormonas que consta de 53 miembros, de los cuales 22 responden a auxinas. El grupo relacionado con maduración y latencias que reduce su expresión consta de cuatro miembros: histidina cinasa ATK1 (*At2g17820*) regula los procesos de desecación durante la maduración de la semilla, MARD1 con dominio de histidina (*At3g63210*) responde a ABA y está relacionada con la regulación de la semilla. CYP707A2 (*At2g29090*) interviene en la regulación de ABA durante el desarrollo de la semilla y GEA6 (*At2g40170*) amortigua la pérdida de agua durante la maduración del embrión, esta proteína no se requiere en semillas maduras. 113 genes relacionados con membrana celular reducen su expresión, de ellos encontramos hidrolasas, proteínas cinasas, ATPasas, proteínas transportadoras de Ca, zinc y péptidos, criptocromos, ubiquitininas, expansinas, entre otras (ver anexo 3)

Los grupos funcionales que se reducen de manera importante en los tratamientos mátrico e hídrico con diferentes genes involucrados son: respuesta a factores ambientales y transporte y almacenamiento de lípidos,

El grupo de respuesta a factores ambientales, es un grupo muy amplio de proteínas, contiene 75 genes que reducen su expresión sobre todo en acondicionamiento mátrico y que están involucrados en respuesta a estrés por luz y radiación (37 genes de los cuales 15 corresponden a ondas de luz rojo-rojo lejano), hídrico, salino por anoxia u otros tipos de estrés inespecíficos (ver anexo 3). Los genes que bajan su expresión en acondicionamiento hídrico están relacionados con estrés lumínico y son: *At5g52250*, dos proteínas cloroplásticas de unión a clorofila a-b (CP26 y 29.1), fitocromo A y fitocromo B. Los genes relacionados con el transporte y almacenamiento de lípidos que reducen su expresión en acondicionamiento mátrico son 15 proteínas de las cuales 13 corresponden a albúminas 2S, una a SESA5 (también relacionadas con almacenamiento en semilla y descritas anteriormente) y una relacionada con el transporte de esteres de ácidos

grasos unidos a acetil CoA (*At5g27630*). El grupo de transporte de lípidos en acondicionamiento hídrico corresponde a 14 genes de las cuales dos son GTPasas (*At5g52160*, *At4g27630*), una proteína transportadora de esteres de ácidos grasos unida a acetil CoA (*At3g05420*), tres se unen a fosfatidilinositol (*At4g32160*, *At1g15240*, *At5g12150*) y una albúmina 2S (*At5g52160*).

Los grupos de genes que bajan su expresión de manera específica con alto nivel de enriquecimiento en acondicionamiento hídrico corresponden a genes relacionados con dedos de zinc que promueven la formación de primordios de raíces (*At1g19790*, *At2g18120*, *At3g51060* y *At5g66350*) y con la regulación negativa de la transcripción. Este último grupo consta de 4 genes relacionados con el desarrollo embrionario (*At2g34780*) y con procesos de actividad meristemática (*At3g61515*) y recombinación durante la división celular (*At3g18524* y *At1g75950*).

### ***Arabidopsis thaliana* como planta modelo para el estudio del acondicionamiento natural**

En general, en la mayoría de los estudios moleculares realizados en *A. thaliana*, las semillas son vernalizadas (tratamiento de acondicionamiento hídrico, en oscuridad y a 4°C durante 48 horas) para mejorar los parámetros germinativos. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las semillas de *A. thaliana* responden al acondicionamiento mátrico mejorando el desempeño germinativo de manera equivalente al acondicionamiento hídrico y de manera similar a las semillas de *W. urens* y *B. cordata*. El tratamiento pre-germinativo promovió en las tres especies un adelanto en el inicio y un incremento en la tasa de la germinación. Dado que el acondicionamiento mátrico es el que presenta las características equivalentes al acondicionamiento natural para los estudios moleculares es posible utilizar a *A. thaliana*, la especie modelo de estudios en genética molecular cuyo genoma está totalmente secuenciado.

### **Efectos del acondicionamiento hídrico y mátrico en la expresión de genes**

La descripción de la expresión, a lo largo del desarrollo de la semilla incluyendo la germinación, de cuatro genes de la familia DUF642: *At3g08030*, *At5g25460*, *At5g11420* y *At4g32460* se llevó a cabo como una primera aproximación molecular para el estudio de la función de esta familia de proteínas de pared celular en estos procesos. La expresión diferencial de los genes de la familia DUF642 durante el desarrollo de la semilla en *A. thaliana*,

resumida en la figura 31, concuerda con lo descrito previamente en los resultados de microarreglos de los diferentes estadios de desarrollo de la cebada (Sreenivasulu *et al.*, 2008). La expresión de *At5g25460*, cuyo mRNA no se detectó en semillas secas ni en las semillas tratadas con acondicionamiento hídrico, se indujo con el acondicionamiento mátrico posiblemente como resultado de la reducción en los niveles de ABA al iniciar la imbibición puesto que se ha descrito que la expresión de este gene se inhibe por esta hormona (Xin *et al.*, 2005). La ausencia del mRNA en las semillas tratadas con acondicionamiento hídrico puede estar relacionada con el hecho de que la expresión de *At5g25460* se inhibe con frío (Sun *et al.*, 2009). Con base en este resultado, se propone estudiar al gene *At5g25460* como un posible marcador de acondicionamiento mátrico. *At4g32460* se detectó durante el desarrollo de las semillas pero no así en las semillas recién liberadas ni durante el acondicionamiento natural. La importante expresión de *At4g32460* durante la germinación concuerda con lo descrito por Ogawa *et al.* (2003) quienes determinaron que su expresión es dependiente de ácido giberélico.

El gene *At3g08030* se detectó en todas las etapas del desarrollo de la semilla y la planta incluyendo la semilla seca. Sin embargo, dado que este gene solo se detectó en las semillas almacenadas durante menos de seis meses en condiciones del laboratorio, se propuso como un marcador de envejecimiento (Garza-Caligaris *et al.*, 2012).

## EXPRESIÓN DE GENES DUF642 en *Arabidopsis thaliana*

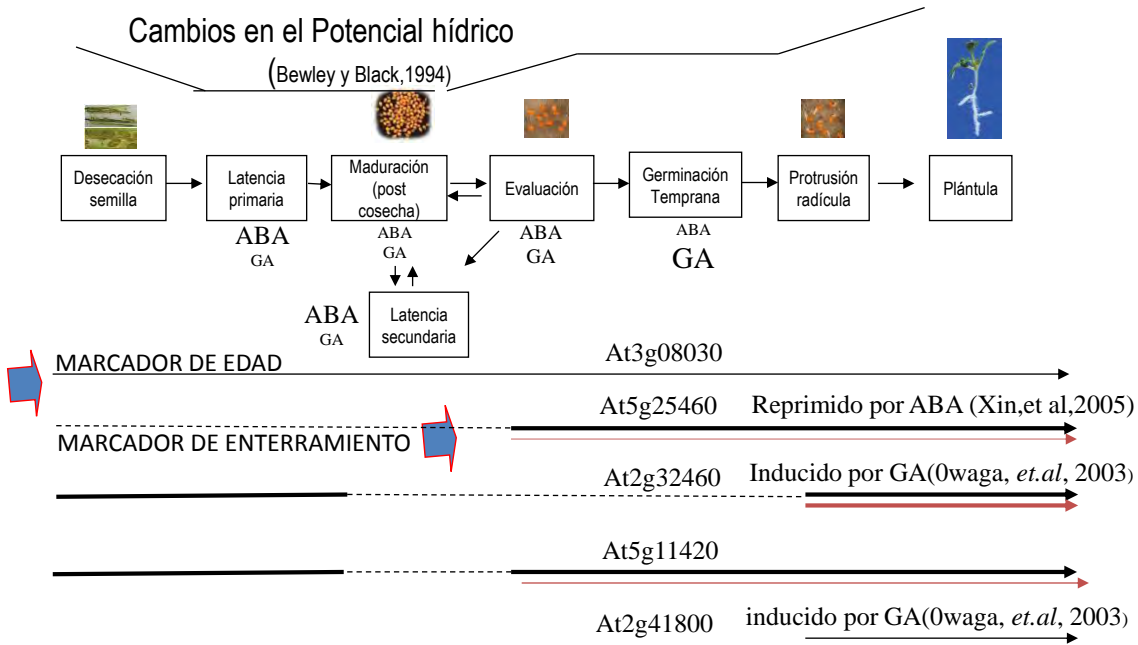


Figura 31: Expresión de genes DUF642 en *A. thaliana* desde la maduración de la semilla, hasta la plántula. Se indica la expresión de semillas con un mes de maduración (líneas negras) y almacenadas durante 6 meses (líneas rojas). La línea punteada indica que no se detectó el transcrito

### El transcrito ***At3g08030*** como un marcador de envejecimiento de semillas

Las semillas almacenadas en el laboratorio no se encuentran en condiciones controladas ni de temperatura ni de humedad, que son dos de los factores más importantes que determinan el deterioro de las semillas. Con el objeto de obtener resultados reproducibles, se implementó el proceso de deterioro controlado para el estudio del efecto del acondicionamiento matricio sobre la tasa y el porcentaje de germinación final de las semillas. El acondicionamiento matricio promovió la germinación de las semillas deterioradas tal como ha sido descrito para semillas de betabel (Catusse et



*al.*, 2011). Debido a que existe una asociación positiva entre el desempeño germinativo y los niveles de detección de *At3g08030* en las especies estudiadas se plantea su uso como un posible marcador de envejecimiento para diferentes especies de plantas (Fig. 21). El impacto del acondicionamiento dependió del orden, antes o después del deterioro corroborando la propuesta que indica que el grado del efecto del acondicionamiento está íntimamente relacionado con la edad de las semillas (Butler *et al.*, 2009).

El alto grado de conservación de los genes de la familia DUF642 y en particular del gene *At3g08030* en espermatofitas permitió la clonación de sus ortólogos en otras especies de plantas para generalizar su uso como marcador de envejecimiento de semillas. En particular, el acondicionamiento mátrico promovió el desempeño de las semillas almacenadas de *C. aesculifolia* y *W. urens*. Dado que el transcrito de los ortólogos de *At3g08030* no fue detectado en las semillas deterioradas pero sí en semillas recién liberadas o en semillas almacenadas tratadas con acondicionamiento natural, *At3g08030* puede ser usado como un marcador molecular para envejecimiento en otras especies vegetales.

Un marcador molecular para el envejecimiento de las semillas puede proporcionar una herramienta importante para estudios ecofisiológicos de semillas, debido a que en ecosistemas naturales, la obtención de colectas de semillas para su uso en programas de restauración es en muchas ocasiones un factor limitante. Para predecir el desempeño germinativo de un lote en particular se requieren pruebas de germinación específicas, por ello el mantenimiento de colecciones de semillas implica realizar pruebas a intervalos variables (Probert *et al.*, 2009). En este estudio se utilizan bajas cantidades de semillas o tejido para determinar la expresión de genes. En general es posible detectar el transcrito con sólo 100 mg de tejido, lo cual puede significar utilizar muy pocas semillas para especies con semillas grandes como *C. aesculifolia*.

Las sustancias de almacenamiento que dificultan o impiden la extracción del RNA o las pruebas enzimáticas, se encuentran, en muchos casos, en el endospermo de las semillas. Sin embargo, para la detección de *At3g08030* se pueden utilizar los ejes embrionarios, ya que este transcrito se encuentra en el embrión. Por el contrario, los estudios enzimáticos que se han propuesto como marcadores de edad, como son la catalasa o el superóxido dimutasa, o las pruebas de germinación requieren muchas semillas (Evensen y Loy, 1978; Bailly *et al.*, 2000) El hecho de que la detección de los ortólogos de *At3g08030* se encuentren exclusivamente en semillas con alta viabilidad y no en semillas con baja germinación como en *A thaliana* o *C. aesculifolia*, o con intolerancia al estrés salino, como en *W. urens* sugiere que este marcador molecular puede ser incorporado como un método utilizado en programas de reforestación o restauración.

### **Estudio preliminar de la función de los genes *At3g08030* y *At5g25460* en la germinación utilizando las plantas sobre expresas**

La función de los diferentes genes puede ser estudiada utilizando plantas que sobreexpresen los genes en cuestión. La participación de proteínase pared celular en la germinación ha sido ampliamente estudiada con esta estrategia.

El mRNA de *At3g08030* presenta dos formas alternativas que podrían codificar para dos proteínas; con péptido señal que se localiza en la pared celular y sin péptido señal de la que se desconoce su localización. Los oligonucleótidos utilizados para detectar a *At3g08030* en las semillas con diferente grado de deterioro no permiten discernir a cuál de las dos formas corresponde. Las plantas transgénicas utilizadas en este trabajo corresponden a la proteína sin péptido. La germinación de las semillas control de las plantas homocigotas que sobre expresan *At3g08030* (SE08030) fue

similar pero el tratamiento de acondicionamiento hídrico sí promovió un incremento en la tasa de germinación.

Estudios recientes en el laboratorio, que no forman parte de esta tesis, demuestran que el acondicionamiento mátrico a las semillas SE08030 que han sido deterioradas de manera controlada, promueve un mejor desempeño germinativo, ya que muestran mayor porcentaje y velocidad de germinación. Estos resultados sugieren que al menos la proteína sin péptido tiene una función relacionada con la longevidad de la semilla de *A. thaliana*.

La sobreexpresión del transcrito *At5g25460* corresponde a la proteína que se moviliza a la pared celular. Para esta proteína no se ha reportado un uso alternativo del primer exón, por lo que su función está relacionada con su localización en la pared celular. Los resultados obtenidos indican un incremento en la tasa de germinación (ver figura 26), tanto de semillas control como las que recibieron acondicionamiento hídrico y mátrico. Sin embargo, estos resultados se basan en una sola línea de sobreexpresión, por lo que es necesario seguir trabajando en estas líneas para obtener generalizaciones sobre el efecto de esta proteína en la germinación de las semillas.

### **Expresión de genes de *A. thaliana* en los tratamientos de acondicionamiento a través de microarreglos**

La semilla de *A. thaliana* es rica en lípidos y se ha descrito que la movilización de estas macromoléculas es fundamental para la germinación (Theodoulou *et al.*, 2012). Se ha descrito que muchos de los procesos metabólicos que se llevan a cabo durante el acondicionamiento son los que ocurren durante la etapa temprana de la germinación previa a la protrusión de la radícula (Gallardo *et al.*, 2001; Soeda *et al.*, 2005). El análisis de los microarreglos de semillas con acondicionamiento descrito en resultados sugiere que los ácidos

grasos movilizados son utilizados principalmente como fuente de esqueletos carbonados para la síntesis de oxoglutarato y de oxalacetato posiblemente para ser utilizados para la síntesis de purinas y pirimidinas (ver fig 28 y 29 y tabla 1), respectivamente. El posible incremento en la síntesis de las bases nitrogenadas y de la producción de ribosa como consecuencia del acondicionamiento sugiere un aumento en los procesos relacionados con la reparación de DNA. Este proceso ha sido ampliamente documentado, en el acondicionamiento de semillas y en la germinación (Nonogaki *et al.*, 2007). Así mismo, encontramos otras 12 enzimas, que pueden tener funciones en la reparación de DNA en el tratamiento mátrico (tabla 1). Por ello, concluimos que la reparación de ácidos nucleicos es un proceso importante que se llevó a cabo durante los tratamientos de acondicionamiento.

La vía genética que podría caracterizar al acondicionamiento mátrico es la del ciclo circadiano, ya que únicamente en este tratamiento se estimula esta vía. Es necesario llevar a cabo análisis de expresión de los 4 genes de esta vía para poder comprobar la importancia del acondicionamiento mátrico en el reinicio del ciclo circadiano, proceso fundamental para la germinación adecuada y establecimiento de la plántula.

El análisis de los transcritos cuya detección disminuye en respuesta a los tratamientos es complejo, especialmente para los genes involucrados en metabolismo, puesto que puede ser también consecuencia de un deterioro de la semilla. En el caso particular de los genes de proteínas de pared celular, la disminución de la detección puede ser explicada puesto que el acondicionamiento también se caracteriza por impedir la protrusión de la radícula y este tratamiento se llevó a cabo en ausencia de luz, por lo que no se encontró un aumento en el ácido giberélico, hormona que promueve los cambios en la pared celular durante la germinación temprana (Ogawa *et al.*, 2003). Por otro lado, la disminución de los genes relacionados con los procesos de acumulación de reservas, maduración y latencia de la semilla

incluyendo procesos de metilación del DNA, sí podría estar relacionada con un aumento en los parámetros germinativos. Tal como se mencionó previamente, es necesario comprobar estos resultados con análisis de expresión específicos.

## CONCLUSIONES

---

La presente tesis representa uno de los primeros esfuerzos por avanzar en el conocimiento de la familia de proteínas DUF642. El acondicionamiento mátrico que promovió la germinación de las semillas deterioradas así como la expresión *At3g08030* determinó el posible uso como un marcador de envejecimiento para diferentes especies de plantas.

La expresión del gene *At5g25460* durante el acondicionamiento y la ausencia de transcrito en semillas secas liberadas, sugiere que *At3g25460* pudiera ser un indicador de acondicionamiento mátrico.

Los resultados preliminares sugieren que la sobreexpresión de *At3g08030* y de *At5g25460* aumenta la velocidad de germinación.

Los resultados preliminares indican que acondicionamiento mátrico induce la activación de ciclo circadiano, mientras que esta activación no se presentó en el acondicionamiento hídrico.

## PERSPECTIVAS

---

En este trabajo se sentaron algunas bases para otros estudios que se están llevando a cabo en el Laboratorio de Ecología Fisiológica del Instituto de Ecología, UNAM. El cambio en la expresión de transcritos de semillas de *Ceiba aesculifolia* tratadas con acondicionamiento mátrico se está estudiando utilizando microarreglos heterólogos que, junto con este trabajo, permitirá profundizar en el conocimiento de las bases moleculares del acondicionamiento natural. Así mismo, en este laboratorio se sigue profundizando en la caracterización de los fenotipos de las semillas con sobreexpresión de los genes estudiados en este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Aiko S, Ranta E, Kaitala V, Lundberg P. 2002. Seed bank in annuals: competition between banker and non-banker morphs. *J. Theor. Biol.* 217: 341-349.
- Alvarado López S. 2012. Respuesta al acondicionamiento natural de semillas de plantas del Estado de Veracruz. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias, UNAM
- Bailly CH, Benamar A, Corbineau F, Côme D. 2000. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. *Seed Sci. Res.* 10:35-42.
- Bailly C, Benamar A, Corbineau F, Côme D. 1998. Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. *Physiol Plant.* 104: 646-652
- Baskin CC, Baskin JM. 1998. *Seeds. Ecology, biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination.* Academic Press. 666 pag
- Bassel G, Fung P, Freeman CT, Foong J, Provart N, Cutler SR. 2008. Elucidating the germination transcriptional program using small molecules. *Plant Physiol.* 147:143–155.
- Bradford K, Cheng Z. 1999. Hydrothermal time analysis of tomato seed germination responses to priming treatments. *J.Exp. Bot.* 50:89-99.
- Bradford F, Trewavas A. 1994. Sensitivity thresholds and variable time scales in plant hormone action. *Plant Physiol.* 105:1029-1036.
- Brusslan J, Alvarez-Canterbury A, Nair N, Rice J, Hitchler M, Pellegrini M. 2012. Genome-wide evaluation of histone methylation changes associated with leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plos One* 7: e33151.
- Butler LH, Hay FR, Ellis RH, Smith RD, Murray TB. 2009. Priming and re-drying improve the survival of mature seeds of *Digitalis purpurea* during storage. *Ann. Bot.* 103:1261–1270.
- Carrera E, Holman T, Medhurst A, Dietrich D, Footit S, Theodoulou F, Haldsworth M. 2008. Seed after-ripening is a discrete developmental

- pathway associated with specific gene networks in Arabidopsis. *Plant J.* 53:214-224.
- Catusse J, Meinhard J, Job C, Strub JM, Fischer U, Pestsova E, Westhoff P, Van Dorsselaer A, Job D. 2011. Proteomics reveals potential biomarkers for seed vigor in sugarbeet. *Proteomics* 11: 1569-1580
- Cayuela E, Pérez-Alfocea F, Caro M, Bolarín MC. 1996. Priming of seeds with NaCl induces physiological changes in tomato plants grown under salt stress. *Physiol. Plant.* 96:231-236.
- Chiu KY, Chen CL, Sung JM. 2003. Partial vacuum storage improves the longevity of primed *sh-2* sweet corn seeds. *Scientia Hort* 98:99-111.
- Colville L, Bradley EL, Lloyd AS, Pritchard HW, Castle L, Kranner I. 2012. Volatile fingerprints of seeds of four species indicate the involvement of alcoholic fermentation, lipid peroxidation and Maillard reactins in seed deterioration durin ageing and desiccation stress. *J Exp Bot* 63 (18): 6519-6530.
- Dawidowicz-Grezegorzewska A. 1997. Ultrastructure of carrot seeds during matriconditioning with micro-cel E. *Ann. Bot.* 79:535-545.
- Demir I, Okcu G. 2004. Aerated hydration treatment for improved germination and seedling growth in aubergine (*Solanum melongena*) and pepper (*Capsicum annuum*). *Ann. Appl. Biol.* 144:121-123.
- Demir I, Ermis S, Okcu G. 2005. Effect of dehydration temperature and relative humidity after priming on quality of pepper seeds. *Seed Sci. Tech.* 33:563-569.
- Downie B, Gurusinghe S, Dahal P, Thacker R Snyder J, Nonogaki H, Yim K Fukanaga K, Alvarado V, Bradford K. 2003. Expression of a galactinol synthase gene in tomato seeds is up regulated before maturation desiccation and again after imbibition whenever radicle protrusion is prevented. *Plant Physiol.* 131:1347-1359.
- Endo A, Tatematsu K, Hanada K, Duermeyer L, Okamoto M Yonekura-Sakakibara K, Saito K, Toyoda T, Kawakami N, Kamiya N Seki M, Nambara E. 2012. Tissue-specific transcriptome analysis reveals cell wall metabolism, flavonoid biosynthesis and defense responses are activated in endosperm of germinating *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Physiol.* 53:16-27.



- Evensen KJ, Loy JB. 1978. Effects of gibberellic acid and gold light on germination, enzyme activities, and amino acid pool size in a dwarf strain of watermelon. *Plant Physiol.* 62: 6–9.
- FAO. Departamento de Agricultura, 1993. Manual sobre las semillas de acacias de zonas secas. En <http://www.fao.org/DOCREP/006/Q2190S/Q2190S00.HTM>
- Farooq M, Basra SMA, Khan MB. 2007. Seed priming improves growth of nursery seedlings and yield of transplanted rice. *Arch. Agron. Soil Sci.* 53:315-326.
- Farooq M, Aziz T, Hussain M, Rehman H, Jabran K, Khan MB. 2008a. Glycinebetaine improves chilling tolerance in hybrid maize. *J. Agron. Crop Sci.* 194:152-160.
- Farooq M, Aziz T, Basra SMA, Cheema MA, Rehman H. 2008b. Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. *J. Agron. Crop Sci.* 194: 152-160.
- Fenner M (edit) 2000. The ecology of regeneration in plant communities (2da Ed) CAB International
- Feurtado JA, Xia JH, Ma Y, Kermod AR. 2003. Increasing the temperature of the water soak preceding moist-chilling promotes dormancy-termination of seeds of western white pine (*Pinus monticola* Dougl.). *Seed Sci. Tech.* 31:275-288.
- Foyer CH, Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17:1866–1875.
- Gallardo K, Job C, Groot SP, Puype M, Demol H, Vanderkerckhove J, Job D. 2001. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiol.* 126: 835-848.
- Gallardo et al., 2006
- Gamboa-deBuen A, Cruz-Ortega R, Martínez-Barajas E, Sánchez-Coronado ME, Orozco-Segovia A. 2006. Natural priming as an important metabolic event in the life history of *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae) seeds. *Physiol. Plant.* 128: 520-530.
- Gao Y, Badejo A, Sawa Y, Ishikawa T. 2012. Analysis of two L-Galactono-1,4-Lactone-responsive genes with complementary expression during the development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 53: 592–601.
- Garwood N. 1989. Tropical soil seed banks: A review. En: *Ecology of Soil*

- Seed Banks. Alessio LM, Thomas PV, Simpson RL (editores). Academia Press. p 149-209.
- Garza-Caligaris LE, Avendaño-Vázquez AO, Alvarado-López S, Zúñiga-Sánchez E, Orozco-Segovia A, Pérez-Ruiz RV, Gamboa-deBuen A. 2012. *At3g08030* transcript: a molecular marker of seed ageing. *Ann Bot.* 110:1253-1260.
- Goel A, Goel AK, Sheoran IS. 2003. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *J. Plant Physiol.* 160:1093-1100.
- González-Zertuche L, Orozco-Segovia A, Vázquez-Yanes C. 2000. El ambiente de la semilla en el suelo; su efecto en la germinación y en la sobrevivencia de la plántula. *Bol. Soc. Bot. México* 65: 73-81.
- González-Zertuche L, Vázquez-Yanes C, Gamboa A, Sánchez-Coronado ME, Aguilera P, Orozco-Segovia A. 2001. Natural priming of *Wigandia urens* seeds during burial: effects on germination, growth and protein expression. *Seed Sci Res.* 11:27-34.
- González-Zertuche L. 2005. Tratamientos de endurecimiento en semillas de *Buddleja cordata* (Loganiaceae) y *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae), dos especies útiles para reforestar o restaurar áreas perturbadas. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Gray D, Steckel JRA, Hands LJ. 1990. Responses of vegetable seeds to controlled hydration. *Ann. Bot.* 66:227-235.
- Gutterman Y. 1993. Seed Germination in Desert Plants. Adaptations of Desert Organism. Springer-Verlag. 253 pp.
- Halmer P. 2004. Methods to improve seed performance in the field. En *Handbook of Seed Physiology. Applications to Agriculture*. Benech-Arnold R, Sánchez R (editores) New York. Haworth. Pags125-149
- Harris D, Pathan AK, Gothkar P, Joshi A, Chivasa W, Nyamudeza P. 2001. On-farm seed priming: using participatory methods to revive and refine a key technology. *Agricul. Systems* 69:151-164.
- Hundertmark M, Buitink J, Leprince O, Hinch D, 2011. The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Seed Sci. Res.* 211:165-173.

- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 4:44-57.
- Iqbal M, Ashraf M, Jamil A. 2006. Seed enhancement with cytokinins: changes in growth and grain yield in salt stressed wheat plants. *Plant Growth Regul.* 50: 29-39.
- Irshad M, Canut H, Borderies G, Pont-Lezica R, Jamet E. 2008. A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: Confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biol.* 8:94.
- Kanai M, Nishimura M, Hayashi M. 2010. A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by inducing pectin degradation under the control of ABI5. *Plant J.* 62: 936-947.
- Karthikeyan B, Jaleel CA, Gopi R, Deiveekasundaram M. 2007. Alterations in seedling vigor and antioxidant enzyme activities in *Catharanthus roseus* under seed priming with native diazotrophs. *J. Zhejiang Univer Scientia B* ISSN 1673-1581
- Kaur S, Gupta AK, Kaur N. 2005. Seed priming increases crop yield possibly by modulating enzymes of sucrose metabolism in chickpea. *J. Agron. Crop Sci.* 191: 81-87.
- Kikuti PAL, Marcos-Filho J. 2008. Drying and storage of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) hydroprimed seeds. *Seed Sci. Tech.* 36:396-406.
- Kimura M, Nambara E. 2010. Stored and neosynthesized mRNA in Arabidopsis seeds: effects of cycloheximide and controlled deterioration treatment. *Plant Mol. Biol.* 73:119–129.
- Lanteri S, Nada E, Belletti P, Quagliotti L, Bino RJ. 1996. Effects of controlled deterioration and osmoconditioning on germination and nuclear replication in seeds of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Ann. Bot.* 77:591-597.
- Lee Y, Baek K, Lee H, Kwak, Bang J y Kwon S. Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn-superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions. *J. Exp Bot.* 61(9): 2499–2506.
- Leggat CW. 2011. A further note on catalase activity as a measure of seed viability. *Can. J. Res.* 9: 571-573.
- Li W, McDonald MB, Bennett MA, Kwong FY. 2005. Hydropriming of differing sized impatiens 'Expo Wine' seeds. *Seed Sci. Tech.* 33: 639-646.

- Li Z, Trick, H. 2005. Rapid method for high-quality RNA isolation from seed endosperm containing high levels of starch. *BioTechniques* 38:872-876.
- Liu Y, Hilhorst HWM, Groot SPC, Bino RJ. 1997. Amounts of nuclear DNA and internal morphology of gibberellin- and abscisic acid-deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds during maturation, imbibition and germination. *Ann. Bot.* 79:161-168.
- Ma Y, Feurtado JA, Kermodé AR. 2003. Effect of solid matrix priming during moist chilling on dormancy breakage and germination of seeds of four fir species. *New Forests* 25: 67-81.
- Maarouf-Bouteau H, Mazuy C, Corbineau F, Bailly C. 2011. DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. *J. Exp. Bot.* 62: 5003–5011.
- Martínez-Orea Y, Castillo-Aguero S, Guadarrama MP y Sánchez I. 2010. Post-fire seed bank in a xerophytic shrubland. *Bol Soc Bot Mex* 86:11-21.
- Modi AT. 2005. Assessment of pepper seed performance using desiccation sensitivity. *Seed Sci. Tech.* 33: 19-30.
- Murungu FS, Nyamugafata P, Chiduza C, Clark LJ, Whalley WR. 2003. Effects of seed priming, aggregate size and soil matric potential on emergence of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and maize (*Zea mays* L.). *Soil Tillage Res.* 74:161-168.
- Mwale SS, Hamusimbi C, Mwansa K. 2003. Germination, emergence and growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to osmotic seed priming. *Seed Sci. Tech.* 31:199-206.
- Nakaune M, Hanada A, Yin YG, Matsukura C, Yamaguchi S, Ezura H. 2012. Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 52:28-37.
- Nascimento WM, Pereira RS. 2007. Preventing thermo-inhibition in carrot by seed priming. *Seed Sci. Tech.* 35: 504-507.
- Nonogaki H, Chen F, Bradford KJ. 2007. Mechanisms and genes involved in germination *sensu strictu*. En: *Seed Development, Dormancy and Germination*. Bradford K, Nonogaki H (editores) Blackwell Publishing. Pag 264-304.
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwalhara A, Kamiya A, Yamaguchi S. 2003. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed

- germination. *Plant Cell* 15: 1591-1603.
- Ogé L, Bourdais G, Bove J, Collet B, Godin B, Granier F, Boutin J, Job D, Jullien M, Grappin P. 2008. Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase1 is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 3022–3037.
- Oh E, Yamaguchi S, Hu J, Yusuke J, Jung B, Paik I, Lee H, Sun T, Kamiya Y, Coi G. 2007. PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 19:1192–1208.
- Oñate-Sánchez V, Vicente-Carbajosa J. 2008. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Res. Notes* 1:93.
- Osbingol N, Corbineau F, Groot SPC, Bino RJ, Come D. 1999. Activation of the cell cycle in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds during osmoconditioning as related to temperature and oxygen. *Ann. Bot.* 84: 245-251.
- Pandita VK, Anand A, Nagarajan S. 2007. Enhancement of seed germination in hot pepper following presowing treatments. *Seed Sci. Tech.* 35: 282-290.
- Powell AA, Yule LJ, Jing HC, Groot SPC, Bino RJ, Pritchard HW. 2000. Regulation of growth, development and whole organism physiology. The influence of aerated hydration seed treatment on seed longevity as assessed by the viability equations. *J. Exp. Bot.* 51: 2031-2043.
- Probert R, Daws R, Hay F. 2009. Ecological correlates of *ex situ* seed longevity: a comparative study on 195 species. *Ann Bot* 104:57-69.
- Pruneda-Paz J y Kay S. 2010. An expanding universe of circadian networks in higher plants. *Trends Plant Sci.* 15:259–265.
- Rajjou L, Gallardo K, Debeaujon I, Vandekerckhove J, Job C, Job D. 2004. The effect of  $\alpha$ -Amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiol.* 134:1598–1613.
- Rajjou L, Lovigny Y, Groot SP, Belghazi M, Job C, Job D. 2008. Proteome-wide characterization of seed ageing in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural ageing protocols. *Plant Physiol.* 148: 620–641.

- Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C, Job D. 2012. Seed germination and vigor. *Ann. Rev. Plant Biol.* 63:3.1–3.27.
- Ren CH, Kermod AR. 2000. An increase in methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of Bellow cedar seeds. *Plant Physiol.* 124: 231-242.
- Sánchez J, 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.
- Schaffer R, Landgraf J, Accerbi M, Simon V, Larson M, Wisman E. 2001. Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:113–124.
- Sivritepe HO, Dourado AM. 1995. The effect of priming treatments on the viability and accumulation of chromosomal damage in aged pea seeds. *Ann. Bot.* 75: 165-171.
- Soeda Y, Konings MCJM, Vorst O, van Houwelingen AMML, Stoopen GM, Maliepaard CA, Kodde J, Bion RJ, Groot SPC, van der Geest AHM. 2005. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiol.* 137; 354-368.
- Shen-Miller M. 2002. Sacred lotus, the long-living fruits of China Antique. *Seed Sci. Res.* 12:131-143.
- Sreenivasulu N, Usadel B, Winter A, Radchuk V, Scholz U, Stein N, Weschke W, Strickert M, Close T, Stitt M, Graner A, Wobus U. 2008. Barley grain maturation and germination: Metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiol.* 146:1738-1758.
- Sun L, Wang S, Xi J, Yang S, Liu X, Chai X, Xin H, An B, Hao D. 2009. A fractionation procedure for identifying novel proteins induced by chill stress in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Lett* 31:1289–1295.
- Tajbakhsh M, Brown PH, Gracie AJ, Spurr CJ, Donovan N, Clark RJ. 2004. Mitigation of stunted root abnormality in onion (*Allium cepa* L.) using seed priming treatments. *Seed Sci. Tech.* 32:683-692.
- Tenner C, Cochrane A, Crawford A, Davila P, Davis K, Kamondo B, Kolberg H, Gold K, Khairallah S, Leon P, Manger K, Pearce T, Probert R, Pritchard H, Slageren M, Smith P, Smith R, Spurrier C, Sweedman L, van Wyk E, Way

- M. Wolfson A. 2003. Technology transfer under the convention on Biological Diversity: The Millennium Seed Bank Experience. Royal Botanic Gardens RBG Kew, UK.
- Tesnier K, Strookman-Donkers HM, van Pijlen JG, van der Geest AHM, Bino RJ, Groot SPC. 2002. A controlled deterioration test of *Arabidopsis thaliana* reveals genetic variation in seed quality. *Seed Science and Technology* 30: 149–165.
- Thompson K. 2000. The functional ecology of soil seed banks. En *The ecology of regeneration in plant communities* (2da Ed). Fenner M (editor). CAB International
- F, Eastmond P. 2012. Seed storage oil catabolism: a story of give and take. *Curr. Op. Plant Biol.* 15:322–328
- Vázquez-Yanes C, Orozco-Segovia A. 1993. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 24:69-87.
- Vázquez-Yanes C, Orozco-Segovia A, 1996. Physiological ecology of seed dormancy and longevity. En *Tropical Forest Ecophysiology*. Mulkey (editor). Chapman and Hall.
- Vázquez-Lobo A, Roujol D, Zúñiga E, Pinero D, Albenne C, Gamboa de Buen A, Jamet E. 2012. The highly conserved spermatophyte cell wall DUF642 protein family: phylogeny and first evidence of interaction with cell wall polysaccharides *in vitro*. *Mol. Phyl. Evol.* 63:510–520.
- Waterworth WM, Masnavi G, Bhardwaj RM, Jiang Q, Bray CM, West CE. 2010. A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *Plant J.* 63: 848–860.
- Weitbrecht K, Muler K, Leubner-Metzger G. 2011. First off the mark: early seed germination. *J Exp. Bot.* 62: 3289-3309.
- Wu L, Hallgren SW, Huang Y, Ferris DM, Baker G, Pan Y, Conway KE, Tauer CG. 2003. Storage protein mobilization and thiol protease up-regulation by solid matrix priming in loblolly pine (*Pinus taeda*) seed embryos. *Seed Sci. Tech.* 31: 667-680.
- Xin Z, Zhao Y, Zheng Z. 2005. Transcriptional analysis reveals specific modulation of abscisic acid signalling by Rop10 small GTPase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139:1350-1365.
- Yeh YM, Sung JM. 2008. Priming slows deterioration of artificially aged bitter melon seeds by enhancing anti-oxidative activities. *Seed Sci. Tech.*

36:350-359.

Zhang X, Chen Y, Wang Z, Chen Z, Gu H, Qu L. 2007. Constitutive expression of *CIR1 (RVE2)* affects several circadian-regulated processes and seed germination in *Arabidopsis*. *Plant J.* 55:512-525.

Zúñiga Sánchez E. 2007. Análisis de expresión de una familia de proteínas de función desconocida, DUF642, en *Arabidopsis thaliana* y su posible papel en las vías de transducción de señales durante el desarrollo”. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM

Zúñiga-Sánchez E, Gamboa-deBuen A. 2009. Proteins involved in cell wall dynamic during different plant reproduction processes. En. *Functional Diversity of Plant Reproduction*. Gamboa-deBuen A, Orozco-Segovia A, Cruz-García (editors). Research Signpost. Kerala, India. ISBN: 978-81-308-0360-9



## ANEXOS

---

### Anexo 1

Incluido como archivo pdf: artículo original derivado de esta tesis en una revista internacional arbitrada e indexada

Garza-Caligaris LE, Ann Bot. Avendaño-Vázquez AO, Alvarado-López S, Zúñiga-Sánchez E, Orozco-Segovia A, Pérez-Ruiz RV, Gamboa-deBuen A. 2012. *At3g08030* transcript: a molecular marker of seed ageing. Ann Bot. 110(6):1253-60

### Anexo 2

Incluido como archivo de Excel: Listado de genes que modifican su expresión obtenidos a través de microarreglos

### Anexo 3

**Genes dentro de algunos grupos que modificaron su expresión, obtenidos a través del análisis de microarreglos con DAVID Bioinformatic Resources 6.7**

**Proteínas tipo cinasas y de unión a nucleósidos con aumento en expresión en ambos tratamientos de acondicionamiento**

ID TAIR	NOMBRE	ID TAIR	NOMBRE	ID TAIR	NOMBRE
AT1G14460	AT1G14460	AT2G07671	Subunidad 9, ATP sintasa mitocondrial	AT3G28600	AT3G28600
AT1G15340	AT1G15340	AT2G18960	ATPase 1	AT3G44190	AT3G44190

AT1G24030	AT1G24030	AT5G59370	Actina-4	AT4G16130	AT4G16130
AT1G53430	AT1G53430	AT1G13180	Proteína relacionada con Actina 3	AT5G13580	AT5G13580
AT2G24990	AT2G24990	AT4G08920	Criptocromo-1	AT5G37350	AT5G37350
AT2G26700	AT2G26700	AT5G42810	Inositol-pentafofato 2-cinasa	AT5G48940	AT5G48940
AT2G37160	AT2G37160	AT1G60440	Pantotenato cinase 1	AT3G27580	Probable Cinasa Serina/treoni na PK7
AT2G44980	AT2G44980	AT5G28080	Probable Cinasa Serina/treoni na WNK9	AT5G41990	Probable Cinasa Serina/treoni na WNK8
AT3G09080	AT3G09080	AT3G48010	Probable canal iónico nucleotide dependiente	AT5G05200	Proteína Cinasa con dominio aaRF, cloroplastica
AT1G17500	Posible ATPasa transportador a de fosfolípidos	AT4G23280	Posible Proteína Cinasa receptora rica en cisteína	AT1G69730	Posible protein cinasa receptora asociada a pared

Los colores indican el proceso en el que están involucradas: **citoesqueleto**,

**metabolismo, Proteínas-cinasas serina/treonina, DNA.**

**Proteínas tipo cinasas y de unión a nucleósidos con aumento en expresión en acondicionamiento mátrico**

TAIR ID	NOMBRE	TAIR ID	NOMBRE	TAIR ID	NOMBRE
AT5G38120	4-coumarato--CoA ligasa-l8	<b>AT2G39360</b>	AT2G39360	<b>AT4G14330</b>	AT4G14330 Kinesina
<b>AT5G61580</b>	6-fosfofructonasa 4, cloroplástica	<b>AT2G41700</b>	AT2G41700 Transportador ABC	<b>AT4G05380</b>	AT4G05380 ATPasa
<b>AT1G03920</b>	AT1G03920	AT4G14340	AT4G14340	AT4G09950	AT4G09950
<b>AT1G06840</b>	AT1G06840	AT3G02530	AT3G02530	<b>AT4G21390</b>	AT4G21390
<b>AT1G12580</b>	AT1G12580	AT3G02660	AT3G02660	AT4G23050	AT4G23050
AT1G17540	AT1G17540	AT3G09910	AT3G09910	<b>AT4G28650</b>	AT4G28650
<b>AT1G20060</b>	AT1G20060	<b>AT3G13100</b>	AT3G13100 Transportador ABC	<b>AT4G29380</b>	AT4G29380
<b>AT1G23540</b>	AT1G23540	<b>AT3G14840</b>	AT3G14840	<b>AT4G30520</b>	AT4G30520
AT1G27180	AT1G27180	<b>AT3G22750</b>	AT3G22750	<b>AT4G39050</b>	AT4G39050 Kinesina
<b>AT1G50610</b>	AT1G50610	AT3G24550	AT3G24550	<b>AT5G08470</b>	AT5G08470 PEX1
AT1G53705	AT1G53705	<b>AT3G28040</b>	AT3G28040	AT5G11410	AT5G11410
<b>AT1G71830</b>	AT1G71830 SERK1	<b>AT3G43210</b>	AT3G43210	AT5G11480	AT5G11480

<b>AT1G73110</b>	AT1G73110 RUBISCO ACTIVASA	<b>AT3G44730</b>	AT3G44730 Kinesina	AT5G16000	AT5G16000
AT1G73860	AT1G73860	<b>AT3G45920</b>	AT3G45920	AT5G16810	AT5G16810
<b>AT1G76370</b>	AT1G76370	<b>AT3G51270</b>	AT3G51270	AT5G18570	AT5G18570
<b>AT2G02800</b>	AT2G02800	AT3G51560	AT3G51560	AT5G36930	AT5G36930
AT2G14080	AT2G14080	<b>AT3G55100</b>	AT3G55100 Transportador ABC	<b>AT5G38830</b>	AT5G38830
<b>AT2G19230</b>	AT2G19230	<b>AT3G59110</b>	AT3G59110	AT5G39620	AT5G39620
AT2G38700	AT2G38700	AT3G63480	AT3G63480	AT5G39960	AT5G39960
AT5G56500	AT5G56500	<b>AT2G28560</b>	proteína de reparación DNA RAD51	AT2G43130	Proteína relacionada con Ras ARA- 4
<b>AT5G58940</b>	AT5G58940	<b>AT3G20780</b>	DNA topoisomerasa 6 subunidad B	<b>AT5G20930</b>	Proteína- Cinasa Serina/treonin a  TOUSLED
<b>AT5G62710</b>	AT5G62710	AT1G07930	factor 1-alfa de Elongación	<b>AT3G04910</b>	Proteína- cinasa Serina/treonin a WNK1
<b>AT5G63410</b>	AT5G63410	AT2G40940	Respuesta a Etileno	AT5G48600	Proteína 4 de mantenimient o de cromosomas
<b>AT5G64840</b>	AT5G64840 Transportad or ABC	<b>AT3G20040</b>	Hexocinasa-4	<b>AT5G61560</b>	Proteína 51 con dominio U-box
<b>AT3G42640</b>	ATPase 8	<b>AT5G03290</b>	Isocitrato deshidrogenasa [NAD] Subunidad	AT1G45050	Enzima de conjugación a

			catalítica mitocondrial		Ubiquitina 15
AT2G05710	Aconitato hidratasa 2 mitocondrial	AT1G59990	DEAD-box ATP-dependiente RNA helicasa 22	AT4G23310	Proteína cinasa 23
AT1G10760	Alfa-glucan dicinasa 1, cloroplastica	AT2G31970	Proteína de reparación a DNA RAD50	AT5G15250	Proteasa ftsH6, cloroplastica
AT2G30360	Proteína-Cinasa serina/treonina 11 de interacción a CBL-	AT1G70520	Proteína-Cinasa receptora 2	AT4G11730	ATPase,
AT2G34180	Proteína-Cinasa serina/treonina 13 de interacción a CBL-	AT3G06480	DEAD-box ATP-dependiente RNA helicasa 40	AT2G03670	Proteína reguladora de división celular 48
AT4G30120	ATPase 4 de cadmio/zinc	AT5G42990		AT4G01800	secA, cloroplástica
AT2G35890	proteína cinasa dependiente de calcio 25	AT1G36340	Proteína acarreadora de ubiquitin E2 31		
AT4G26100	Caseína cinasa I delta	AT4G39400	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1		

Los colores indican el proceso en el que están involucradas: **citoesqueleto**, **metabolismo**, **Proteínas-cinasas serina/treonina**, **DNA**.

**Genes que aumentan su expresión y que están relacionados con  
hormonas para ambos tratamientos**

<b>AT1G25560</b>	Represor de la transcripción TEM con dominios AP2/ERF y B3	<b>AT5G53590</b>	AT5G53590
<b>AT1G05710</b>	AT1G05710	<b>AT5G48170</b>	F-box proteína SNE SLY-2
<b>AT2G19560</b>	AT2G19560	<b>AT3G51770</b>	Proteína de sobreproducción de etileno
<b>AT3G20220</b>	AT3G20220	<b>AT2G36450</b>	Factor de transcripción de respuesta a etileno ERF024

Los colores indican la hormona a la que responden: **auxinas, ácido giberélico y etileno**

**Proteínas que responden a hormonas con aumento en expresión en  
acondicionamiento mátrico**

TAIR ID	NOMBRE	TAIR ID	NOMBRE	TAIR ID	NOMBRE
AT1G16540		AT3G15540	Proteína de respuesta a auxinas IAA19	AT5G13350	AT5G13350
AT1G54060	AT1G54060 ASIL1	AT5G47100	Calcineurin B 9	AT5G13350	AT5G13350
AT1G62380	AT1G62380	AT5G37770	proteína de unión a calcio CML24	AT1G19220	Proteína de respuesta a auxinas
AT1G74430	AT1G74430 MYB95	AT5G58550	ETO1	AT5G50760	AT5G50760
AT1G75580	AT1G75580	AT3G51810	GEA1	AT5G62470	AT5G62470
AT1G75590	AT1G75590	AT2G40940	Respuesta a Etileno 1	AT5G01240	LAX1
AT1G71830	AT1G71830 SERK1	AT5G47220	Factor de transcripción en respuesta a etileno 2	AT5G15230	proteína regulada por GA 4
AT2G37630	Factor de transcripción AS1	AT2G35700	Factor de transcripción en respuesta a etileno 2 ERF038	AT4G15910	AT4G15910 LEA
AT3G61460	AT3G61460	AT4G28140	Factor de transcripción en respuesta a etileno 2 ERF054		

Los colores indican: **auxinas**, **ABA**, **ácido jasmónico o salicílico**, **ácido giberélico**, **etileno** y **brassinosteroides**

**Genes que aumentan su expresión y que están relacionados con la respuesta a hormonas en acondicionamiento hídrico**

AT1G31930	AT1G31930	AT4G15900	PP1/PP2A fosfatasa
AT1G71930	AT1G71930	AT2G21200	AT2G21200
AT2G21210	AT2G21210	AT5G03310	AT5G03310
AT2G45210	AT2G45210	AT2G37220	Ribonucleoproteína, cloroplástica
AT3G23250	AT3G23250 MYB15	AT1G64060	Oxidasa
AT3G43120	AT3G43120	AT1G22640	MYB3
AT4G08950	AT4G08950	AT4G16420	ADA2b
AT5G02310	AT5G02310	AT1G05470	Inositol-1,4,5-trisfosfato 5-fosfatasa CVP2
AT5G23720	AT5G23720	AT5G65790	AT5G65790 MYB68
AT5G59845	AT5G59845	AT3G50970	Dehidrina Xero 2

Los colores indican la hormona a la que responden: auxinas, ácido abscisico, ácido jasmónico o salicílico, ácido giberélico, etileno y brassinoesteroides



**Genes relacionados con respuesta a hormonas que disminuyen su expresión en tratamiento mátrico**

AT5G60120	Factor de transcripción TOE2 AP2-like	AT5G14920	AT5G14920
AT1G17950	AT1G17950 MYB52	AT5G18080	AT5G18080
AT1G22690	AT1G22690	AT5G44420	AT5G44420
AT1G29510	AT1G29510	AT1G04240	Proteína de respuesta a auxina IAA3
AT1G68765	AT1G68765	AT1G34390	Factor de respuesta a auxina 22
AT2G34680	AT2G34680	AT2G46990	Proteína de respuesta a auxina IAA20
AT2G36210	AT2G36210	AT2G38340	proteína 2E
AT2G47000	AT2G47000	AT2G25490	Proteína F-box de unión a EIN3
AT1G79460	Ent-kaur-16-ene sintasa, cloroplástica	AT2G40170	Proteína GEA6
AT3G59900	AT3G59900	AT4G23750	Factor de transcripción de respuesta a etileno CRF2
AT3G60690	AT3G60690	AT1G06160	Factor de transcripción de respuesta a etileno ERF094
AT3G63210	AT3G63210	AT4G34410	Factor de transcripción de respuesta a etileno ERF109
AT4G28520	AT4G28520 Cruciferina	AT2G42680	factor 1a
AT4G34790	AT4G34790	AT5G46050	Transportador de péptidos PTR3-A
AT4G38840	AT4G38840	AT4G32880	"Homeobox-leucine zipper" ATHB-8
AT5G06650	AT5G06650	AT2G22430	"Homeobox-leucine zipper" ATHB-6
		AT5G59220	Probable proteína fosfatasa 2C 78
AT4G26080	Proteína fosfatasa 2C 56	AT3G06380	F-box proteína 9
AT1G34410	Factor de respuesta a auxinas 21	AT4G31920	ARR10

Los colores indican la hormona a la que responden: **auxinas**, **ácido absísico**, **ácido jasmónico o salicílico**, **ácido giberélico**, **etileno** y **brassinosteroides**

**Genes relacionados con respuesta a hormonas que disminuyen su expresión en tratamiento hídrico**

AT1G13430	AT1G13430	AT5G18050	AT5G18050
AT1G19840	AT1G19840	AT5G66350	AT5G66350
AT1G27730	AT1G27730	AT5G57090	Transportador de Auxinas
AT1G36160	AT1G36160	AT2G36530	Enolasa
AT1G73687	AT1G73687	AT1G19210	Factor de transcripción de respuesta a etileno ERF017
AT1G74840	AT1G74840	AT1G53940	GDSL esterasa/lipasa 2
AT1G78240	AT1G78240	AT4G27630	GPCR-tipo G proteína 2
AT2G15970	AT2G15970	AT5G03740	Histone deacetilasa HDT3
AT2G39550	AT2G39550	AT4G36410	Ubiquitin E2 17
AT3G05420	AT3G05420	AT1G75950	SKP1
AT3G53250	AT3G53250	AT1G47510	Inositol-1,4,5-trisfosfato 5-fosfatasa 11
AT3G63150	AT3G63150	AT4G18010	Inositol-1,4,5-trisfosfato 5-fosfatasa 2
AT4G21540	AT4G21540		