

Procesos moleculares involucrados en la protección de las semillas a la desecación

G. Darinka Méndez-Ferreira¹, Alejandra Covarrubias Robles² y Elda Beltrán Peña[✉]

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. UMSNH. Ciudad Universitaria. Francisco J. Múgica s/n. Morelia, Michoacán. C.P. 58030

²Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Resumen

Las semillas se clasifican en ortodoxas y recalcitrantes, debido a las diferencias que presentan a la tolerancia a la desecación. Las semillas ortodoxas son más tolerantes que las recalcitrantes, siendo capaces de ser almacenadas y permanecer viables por años, en cambio las recalcitrantes son generalmente poco tolerantes y mueren cuando se secan. En el caso de las semillas ortodoxas, los mecanismos de tolerancia a la desecación permiten a las plantas sobrevivir a cambios ambientales poco favorables. A lo largo de la evolución, esta tolerancia fue adquirida durante el desarrollo de las semillas y es considerada necesaria para completar el ciclo de vida de las plantas ortodoxas. La tolerancia se ha adquirido por varios métodos, incluyendo la formación de cristales de azúcares, la acumulación de proteínas LEA, sHSP, oleosinas y la actividad de compuestos antioxidantes. En esta revisión se analizan los principales mecanismos de tolerancia a la desecación en semillas.

Palabras Clave: *Latencia de la semilla, tolerancia a la desecación, proteínas LEA, sHSP, oleosinas, antioxidantes.*

Abstract

Seeds are classified in orthodox and recalcitrant, due to differences in desiccation tolerance. Orthodox seeds are much more tolerant than recalcitrant seeds, having the capacity of being stored and to remain viable for years, while recalcitrant seeds are generally not quite tolerant and die during drying. In the case of orthodox seeds, the tolerance mechanisms to desiccation allow plants to survive unfavorable environment changes. Throughout evolution, this tolerance was acquired during seed development, and it is considered necessary to complete the orthodox plants life cycle. The tolerance has been achieved by several methods, including the formation of sugar crystals, accumulation of proteins like LEA and sHSP, and the activity of antioxidant compounds. This review discusses the main mechanisms of seed desiccation tolerance.

Keywords: *Seed dormancy, desiccation tolerance, LEA proteins, sHSP, oleosins, antioxidants.*

Introducción

Las plantas modernas evolucionaron de organismos acuáticos, siendo las algas verdes un probable ancestro de las especies contemporáneas. Los requerimientos de las plantas son relativamente simples, como luz, agua, dióxido de carbono, oxígeno y algunos minerales. En nuestro planeta, la luz es abundante, también el oxígeno y el dióxido de carbono (gases que circulan más libremente en el aire que en el agua) y el suelo es generalmente rico en minerales. Lo anterior sugiere que el factor crítico para la transición de las plantas a la tierra fue el agua, por lo cual las plantas a lo largo de la evolución desarrollaron características que les permitieron afrontar este cambio drástico de ambiente (Raven *et al.*, 2003). Por otra parte, el hábitat de las semillas es el método más complejo y exitoso de reproducción sexual en las plantas vasculares (Linkies *et al.*, 2010). Una semilla consiste de un embrión y una reserva de alimentos empaquetados en un contenedor altamente durable, la testa. En la madurez, la semilla está latente o quiescente, no crece y es capaz de resistir una gran variedad de condiciones ambientales adversas (Fosket, 1994). Una semilla en estado quiescente presenta metabolismo nulo y/o no medible que se mantiene hasta que condiciones favorables y húmedas lo reactiven e induzcan la germinación (Leprince y Buitink, 2010). La latencia se define como un bloqueo necesario en la fase final

de la germinación de una semilla viable, aún en condiciones favorables para la germinación de semillas no-latentes. La latencia de las semillas controla el tiempo de germinación en respuesta a las estaciones del año y desempeña un papel importante en la evolución de las plantas con semillas y en la adaptación al cambio climático (Baskin y Baskin, 2004). El tiempo de germinación influye fuertemente en la distribución de las especies y juega un papel importante en la determinación de la supervivencia o extinción de ellas durante el cambio climático (Donohue, 2005). La tolerancia a la desecación implica la habilidad de una planta o partes de la planta para alcanzar un equilibrio con la humedad relativa atmosférica y sobrevivir en este estado por periodos ecológicamente significantes (Berjak *et al.*, 2007). En el presente artículo se revisarán los principales mecanismos que han adquirido las plantas para tolerar la falta de agua.

Latencia de las semillas

La formación de la semilla involucra tres eventos: embriogénesis, desarrollo de la semilla e inicio de la latencia (Fosket, 1994). En la embriogénesis, el embrión maduro se desarrolla a partir de una célula fertilizada -el óvulo- a través de una serie de procesos que en conjunto se conocen como "morfogénesis" (Fig. 1). El óvulo se divide en una célula basal y una terminal, mientras la basal se divide y elonga para formar el suspensor, la terminal se convierte en el embrión. Este último pasa a través de una etapa globular, en seguida la de corazón (donde los dos cotiledones se asemejan a las protuberancias de un corazón). Conforme el embrión continúa su desarrollo, entra en la etapa lineal, en la cual

✉ **Autor de correspondencia:** Elda Beltrán. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. UMSNH. Ciudad Universitaria. Francisco J. Múgica s/n. Morelia, Michoacán. C.P. 58030. e-mail: eldabelt@umich.mx

el meristemo radicular, el meristemo del brote y los cotiledones se hacen visibles (Le *et al.*, 2010). Después de la morfogénesis, la semilla transcurre por una etapa de “maduración”, denominada también “periodo de acumulación de reservas” que incluye la reorganización del metabolismo y la biosíntesis de almidón, proteínas y aceites (Fig. 1) (Angelovici *et al.*, 2010). Para que la semilla entre en fase de latencia debe de haber completado la de maduración, es decir, que el embrión y el endospermo hayan concluido la morfogénesis (Sreenivasulu y Wobus, 2013). La maduración se caracteriza por un arresto en el crecimiento, seguido de la biosíntesis y acumulación de reservas, cuya degradación durante la germinación proveerá los nutrientes para el desarrollo de las plántulas antes de que adquieran su capacidad fotosintética (Baud *et al.*, 2010). La maduración temprana y media son reguladas por el ácido abscísico (ABA) e inician en los tejidos maternos y más adelante, aunque en menor proporción durante el desarrollo del embrión y el endospermo (Nambara y Marion-Poll, 2003). La transcripción de los principales genes de proteínas de almacenamiento ocurre durante el periodo de maduración de las semillas. Subsecuentemente, los niveles del ABA declinan y prosigue la maduración tardía, caracterizada por la síntesis de proteínas abundantes de embriogénesis tardía (LEA, por sus siglas en inglés *Late Embryogenesis Abundant*), las cuales se han asociado al proceso de deshidratación y adquisición de la tolerancia a la desecación (Kamisugi y Cuming, 2005). Durante esta etapa, la acumulación de carbohidratos en el endospermo o de lípidos en el embrión prevalece y de esta forma se llega a un estado quiescente y latente, estableciéndose la inhabilidad de crecer aún bajo condiciones favorables para plantas no latentes (Bassel *et al.*, 2011). La maduración no es obligatoria y si los embriones son removidos de la semilla y los efectos del ABA eliminados puede proceder la germinación y el desarrollo de plántulas normalmente. Incluso, en ciertas plantas, la embriogénesis procede directamente al estado de plántula. Existen otras hormonas además del ABA que son importantes en el desarrollo de la semilla, como las auxinas, citocininas y el ácido giberélico (AG) (White y Rivin, 2000). Está bien establecido en la literatura que en las semillas, el endospermo, que rodea al embrión, regula la germinación. El embrión de *Arabidopsis* está rodeado por dos capas, el endospermo y la testa (Fig. 2) (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Holdsworth *et al.*, 2008). Estudios en semillas morfológicamente similares a *Arabidopsis*, pero más grandes y no latentes indican que esta capa de endospermo controla el término de la germinación bajo la influencia del ABA (Da Silva *et al.*, 2004). Estudios recientes sugieren que la capa del endospermo tiene un papel activo en la regulación del término de la germinación (Hilhorst, 2008). Se ha reportado también que la testa (un tejido muerto en la semilla madura) presenta un papel importante en el control de la germinación (Bensink y Koornneef, 2008). Por lo tanto, en *Arabidopsis* parece ser que el efecto combinado del endospermo y la testa es el responsable de la latencia de esta planta. (Holdsworth *et al.*, 2008). Para que la germinación se lleve a cabo es necesaria la elongación celular para completar la protrusión de la radícula (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Dicho proceso involucra el rompimiento del estado latente y la reanudación del crecimiento del embrión; esto es, que los eventos que llevaron a la latencia sean revertidos.

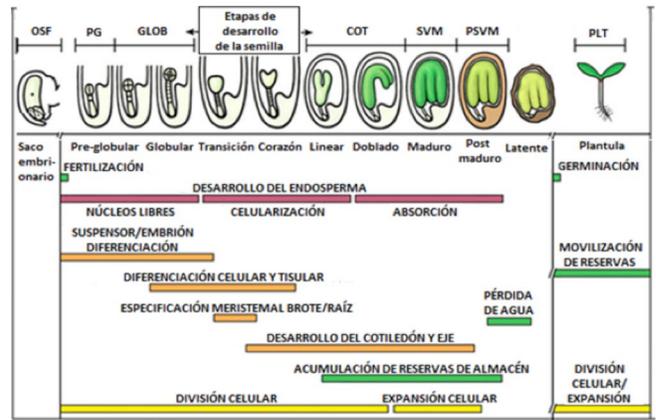


Figura 1. Representación del desarrollo de la semilla de *Arabidopsis*. OSF, óvulo sin fertilizar; PG, pre-globular; GLOB, globular; COT, cotiledón; SVM, semilla verde madura; PSVM, post etapa de semilla verde madura y PLT, plántula (Modificado de Le *et al.*, 2010). a

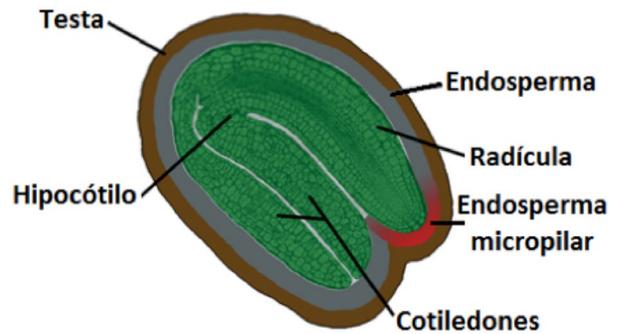


Figura 2. Esquema de la estructura de semillas maduras de *Arabidopsis thaliana*. El embrión diploide está rodeado por dos capas que lo cubren, la testa (cubierta seminal) y el endosperma (tejido nutritivo). Este último, en algunas especies durante el desarrollo de las semillas, es reabsorbido y los cotiledones sirven de almacén de reservas. El endosperma remanente se localiza cerca del micrópilo (endosperma micropilar) y puede restringir la germinación (modificado de Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

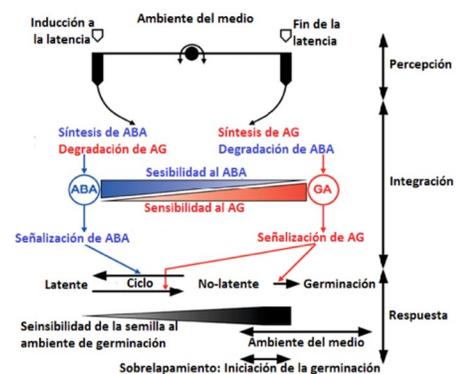


Figura 3. Modelo sobre la regulación de la latencia y germinación por ácido abscísico (ABA) y ácido giberélico (AG) en respuesta al ambiente. De acuerdo a este modelo, los factores ambientales afectan el balance y la sensibilidad de ABA y AG. La síntesis de ABA predomina en el estado latente, mientras que la síntesis y señalización de AG dominan la transición a la germinación. La compleja interacción entre síntesis, degradación y sensibilidad en respuesta a condiciones ambientales resulta en el ciclo de la latencia. Un cambio en la profundidad de la latencia altera los requerimientos para la germinación; cuando éstos se superponen con alteraciones en las condiciones ambientales, procede la germinación hasta completarse (tomado de Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006)

La transcripción de genes es reasumida, la síntesis de proteínas comienza de nuevo y las tasas de respiración y del metabolismo intermediario aumentan dramáticamente, es decir, se reactivan los procesos biosintéticos. (Fosket, 1994). La latencia está determinada genéticamente con una influencia ambiental substancial, que es mediada al menos en parte, por las fitohormonas ABA y AG (Fig. 3). Debido a que la latencia está presente en las plantas superiores de todas las regiones climáticas, la adaptación ha sido la respuesta a los ambientes divergentes. A través de esta adaptación, la germinación se ha temporizado para evitarla en climas desfavorables que afectarían subsecuentemente a la planta y su crecimiento reproductivo (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La mayoría de los genes involucrados en la latencia de la semilla, presentan también una función en la maduración e influyen en el metabolismo y percepción hormonal. Durante los últimos años, varios genes han sido identificados con características diferentes a las antes mencionadas que codifican para proteínas río abajo o arriba de rutas de transducción de señales involucradas en la inducción o liberación de la latencia de la semilla. En los ecotipos de *Arabidopsis*, Landsberg erecta de baja dormancia y la accesión Cape Verde Island (Cvi) que presenta una latencia fuerte, se ha encontrado que el locus DOG (por sus siglas en inglés Delay Of Germination) regula la latencia de las semillas. Mutantes de alelos de pérdida de función DOG1 (codifica para una proteína con función desconocida), son completamente no latentes, sin fenotipos pleiotrópicos obvios, lo que indica que DOG1 juega un papel crucial en la latencia (Holdsworth *et al.*, 2008).

Características de las semillas ortodoxas y recalcitrantes

De acuerdo con Roberts (1973), las semillas se pueden dividir en ortodoxas y recalcitrantes basándose en las siguientes características. Las ortodoxas pasan por una maduración en sequía y son liberadas de la planta parental a un ambiente poco húmedo. Éstas además pueden adquirir tolerancia a la desecación durante su maduración, permitiéndoles alcanzar un rango de humedad del 1-5% sin presentar daños irreversibles. Debido a esta habilidad, estas semillas pueden ser almacenadas por largos periodos en frío y en bóvedas secas. En cambio, las semillas recalcitrantes, no pasan por maduración en sequía y son liberadas al ambiente con contenidos de humedad relativamente altos (25-45%), lo que las hace altamente susceptibles al daño por desecación. Los mecanismos por los cuales las semillas recalcitrantes pierden su viabilidad durante la sequía y/o almacenamiento no están bien entendidos, así que, es un reto determinar cuáles son las condiciones apropiadas para conservar a estas especies (Delahaie *et al.*, 2013). Las semillas recalcitrantes y ortodoxas difieren grandemente en su ecología y morfología, las primeras provienen de árboles perennes de trópicos húmedos, de árboles templados y especies acuáticas. Mientras que la mayoría de las semillas ortodoxas provienen de especies anuales que crecen en campo abierto. Respecto a la morfología, las recalcitrantes difieren de las ortodoxas no solo en tamaño, sino también en complejidad y viabilidad. Una gran cantidad de dichas semillas, por ejemplo, no son verdaderas, sino existen como frutos cubiertos de capas arílicas carnosas o jugosas envueltos por testas impermeables. Los embriones de las semillas ortodoxas representan el 1.4% del peso seco de la semilla

completa, a diferencia de las recalcitrantes cuyo peso corresponde al 0.25% (Chin y Krishnapillay, 1989).

Mecanismos de tolerancia a la desecación en semillas ortodoxas

Durante las últimas etapas del desarrollo de las semillas ortodoxas se presenta una reducción del volumen de agua de las vacuolas, pérdida de identidad de orgánulos y un “apagado” del metabolismo, características todas ellas necesarias para la tolerancia a la desecación (Pammenter y Berjak, 1999). La adquisición de la tolerancia a la desecación implica procesos celulares como la acumulación de disacáridos y oligosacáridos, biosíntesis de proteínas (LEA y de choque térmico “heat-shock”), la activación de defensas antioxidantes, cambios en la estructura física de la célula y un incremento gradual en la densidad (Angelovici *et al.*, 2010).

Los azúcares

La acumulación de azúcares no reductores como la sacarosa y ciertos oligosacáridos, se ha correlacionado con la tolerancia a la desecación de las semillas (Koster y Leopold, 1988). La sacarosa se encuentra implicada en mecanismos que ayudan a soportar la sequía a las semillas; por ejemplo, se ha sugerido que la biosíntesis de rafinosa a bajas concentraciones de agua, es importante para prevenir la cristalización de la sacarosa (Farrant y Moore, 2011) o para la estabilización de membranas secas (Crowe *et al.*, 2005). Por otra parte, el disacárido trehalosa, presenta un gran potencial para proteger membranas contra los efectos adversos de la deshidratación completa (Burke, 1986; Iturriaga *et al.*, 2009), debido a su habilidad para formar cristales acuosos a bajas concentraciones de agua (Fait *et al.*, 2006). Además se ha observado que un incremento en los niveles de trehalosa-6-fosfato (T6F), regula negativamente la expresión de genes involucrados en la señalización y percepción de auxinas (como Aux/AIA y TIR1, respectivamente) (Paul *et al.*, 2010). Otros oligosacáridos que se acumulan durante la sequía son la estaquiosa y galactosil ciclitol (Berjak *et al.*, 2007), que forman puentes de hidrógeno, substituyendo así la función de mantenimiento de estructuras hidrofílicas en orientación hidratada, incluso cuando el agua ya no está presente (Crowe *et al.*, 2005). Cuando una solución se concentra durante la sequía, los solutos pueden cristalizarse o la solución queda sobresaturada, lo que incrementa su viscosidad. Cuando la viscosidad alcanza el punto en que la difusión del agua es imposible, la solución asume las propiedades mecánicas de un sólido plástico. En este estado, la solución se conoce como un cristal que es en realidad un líquido supercongelado cuya existencia depende de la temperatura (Franks, 1985). Los beneficios de la formación de cristal -o vitrificación- en un organismo que pierde agua son los siguientes: i) los cristales impiden reacciones químicas que requieran difusión, así aseguran su estabilidad durante el periodo de latencia; ii) llenan el espacio y así por su volumen previenen el colapso celular; iii) pueden atrapar solutos caotrópicos (que rompen la red de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua, reduciendo la estabilidad del estado nativo de las proteínas), previniendo que se acumulen (Salvi *et al.*, 2005) y iv) los cristales pueden permitir que se sigan formando puentes de hidrógeno en la interface del cristal y las superficies hidrofílicas de la célula. Todas las propiedades antes mencionadas aseguran la supervivencia

de un organismo durante un periodo de desecación (Leprince y Walters-Vertucci, 1995).

Proteínas

Se ha reportado que las proteínas de las semillas no solo funcionan como reservas nutritivas, sino que participan en la protección contra el estrés por desecación (Berjak *et al.*, 2007). Las principales proteínas involucradas en dicho proceso son “small heat shock proteins” (sHSP), LEA y las oleosinas. A continuación se describirán brevemente las propiedades de las proteínas antes mencionadas.

Proteínas pequeñas de choque térmico “small Heat Shock Proteins” (sHSP)

Las sHSP varían en un rango que va de 15 a 30 kDa, funcionan como chaperonas moleculares, cuya expresión se ha reportado ampliamente en todos los organismos en respuesta al estrés. Las sHSP de plantas son las proteínas más abundantes en respuesta a estrés y han sido agrupadas en base a su composición de aminoácidos en seis clases. La expresión de las sHSP ocurre intracelularmente en todos los tejidos embrionarios durante la sequía, lo que sugiere un papel protector general en las células durante la deshidratación y en el estado deshidratado (Waters, 2013); la acumulación empieza en las fases media a tardía de la maduración de la semilla, alcanza un máximo en la semilla deshidratada y declina durante la imbibición y germinación (zur Nieden *et al.*, 1996). Las sHSP son chaperonas que interactúan con otras proteínas, contrarrestando las interacciones proteína-proteína inapropiadas lo que permite que se conserve la estructura nativa de las proteínas en estado deshidratado y facilitan el repliegamiento apropiado en la hidratación (Buitink *et al.*, 2002). En el desarrollo de semillas ortodoxas hay una expresión coordinada de los transcritos de sHSP y LEA en respuesta al ABA durante dicho proceso. A pesar de estar implicadas las sHSP en la protección intracelular, son las proteínas LEA las que han sido más investigadas (Alpert y Oliver, 2002).

Proteínas LEA

El paradigma clásico que indica que “la función de la proteína depende de su estructura” puede actualizarse a que “la función depende de los dominios”, debido a que en los últimos 10 años se han encontrado proteínas que presentan dominios desordenados o carecen completamente de estructura secundaria. Ejemplos de ellas son las 4EBP1, 2, 3 (secuestran al factor de inicio de la traducción eIF4E), la MAP2 (involucrada en la polimerización de microtubulos), la p53 (supresora de tumores) (Tompa, 2002; Gsponer y Babu, 2009) y las proteínas LEA. Las modificaciones post-transcripcionales esenciales para la complejidad y diversidad biológica de las proteínas pueden afectar la estabilidad, recambio, localización sub-celular o las propiedades de interacción y por lo tanto tienen un impacto significativo en la función de las proteínas de regulación y señalización. En este contexto, la flexibilidad conformacional de las regiones desordenadas en las proteínas intrínsecamente desestructuradas le proporciona dos ventajas: i) permite la exposición de uno o varios motivos cortos de péptidos lineales, cuyas cadenas laterales pueden ser expuestas a los sitios catalíticos de enzimas modificadoras y por lo tanto estas últimas

puedan introducir o remover una modificación dada; y ii) que el péptido modificado o sin modificar pueda fácilmente ser reconocido por proteínas efectoras (que reconozcan un motivo de péptidos específicos o modificados) para mediar los distintos efectos (Gsponer y Babu, 2009). Las LEA de plantas, al igual que otras proteínas de eucariontes son codificadas por familias multigénicas que se originaron por duplicación de una secuencia de ADN ancestral, con una divergencia subsecuente en la secuencia y especificidad de la expresión (Hundermark y Hinche, 2008). Miembros diferentes de cada familia presentan patrones característicos de expresión, tanto en términos de etapa de desarrollo como de estímulos ambientales y hormonales (Cuming, 1999). Las LEA que se acumulan en el inicio de la desecación de la semilla y en respuesta al déficit hídrico en tejido vegetativo de las plantas, son altamente hidrofílicas e intrínsecamente desordenadas (Battaglia *et al.*, 2008; Iturriaga, 2008; Kovacs *et al.*, 2008). Estas proteínas carecen de cisteínas y predominantemente presentan aminoácidos polares cargados y no cargados, característica que las hacen no tolerantes al calor (Dure *et al.*, 1989; Cuming, 1999; Tompa y Kovacs, 2010). Las LEA pertenecen además a la familia de las hidrofílicas, proteínas altamente hidrofílicas e intrínsecamente desordenadas con una composición enriquecida de glicinas y otros aminoácidos de residuos pequeños que les permiten adquirir una conformación flexible en soluciones acuosas. Aunque estas características las tienen la mayoría de las LEA, su composición específica de aminoácidos ha permitido agruparlas en siete grupos, siendo el cinco el único atípico. Cuando empieza a escasear el agua, las LEA se ordenan y adquieren una estructura secundaria, lo que sugiere un papel funcional para dichas proteínas en estado de sequía más que en condiciones de hidratación (Goyal *et al.*, 2003; Tolleter *et al.*, 2007; Li y He, 2009). Existen evidencias que indican que las LEA son capaces de proteger a las membranas cuando se someten a fases perjudiciales durante el congelamiento, pero la función de estas interacciones no ha sido clara (Chakrabortee *et al.*, 2012). También se ha reportado que los cristales de azúcares son estabilizados en presencia de las proteínas LEA (Wolkers *et al.*, 2001). Su función como chaperonas moleculares se ha probado, ya que previenen cambios conformacionales en condiciones de déficit hídrico, pero a diferencia de las chaperonas moleculares típicas (como las sHSP), si estas proteínas se añaden después de la deshidratación, son incapaces de recuperar la conformación nativa o actividad de las enzimas reporteras (Reyes *et al.*, 2005; Olvera-Carrillo *et al.*, 2011).

Las oleosinas

En la mayoría de las semillas, los triacilglicerolos (TAGs) almacenados en cuerpos oleicos estables, cuya superficie está protegida por una capa de oleosinas (Siloto *et al.*, 2006; Huang, 2009), sirven como reserva alimenticia durante la germinación y el crecimiento post-germinativo. Las oleosinas son proteínas de 15-26 kDa que rodean a las gotas de lípidos en las células vegetales (Huang, 2009), éstas presentan tres dominios: anfipático localizado en el extremo N-terminal que junto con el C-terminal facilitan la interacción con la matriz citoplasmática; y un dominio central hidrofóbico que interactúa con la periferia de los lípidos. La frontera entre los cuerpos lipídicos y las oleosinas permite a estas masas hidrofóbicas, acomodarse como entidades discretas

en la matriz citoplasmática acuosa bajo condiciones hidratadas. Se ha sugerido que su papel durante la deshidratación previene la coalescencia de los cuerpos oleicos en semillas ortodoxas (Sadeghipour y Bhatla, 2002; Shimada *et al.*, 2008).

Antioxidantes

Uno de los mecanismos que induce la muerte de células sensibles a la sequía implica la reacción de los radicales libres sobre los fosfolípidos, el ADN y las proteínas. Los síntomas detectados en tejidos secos por la actividad de los radicales libres son diversos e incluyen la peroxidación y desesterificación de fosfolípidos, el rompimiento del ADN, la acumulación de derivados carbonilos en las proteínas y finalmente la muerte celular programada y aborto de semillas y frutos (Inzé y Montagu, 1995; Dionisio-Sese y Tobita, 1998; Oliver *et al.*, 2001; Mittler, 2002; Liu *et al.*, 2013). Es probable que el origen del daño oxidativo inducido por la desecación, sea la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (formas activadas de oxígeno parcialmente reducidas, transitorias y altamente reactivas). Para hacer frente a la presencia de las ERO, las células cuentan con mecanismos antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos. Los primeros incluyen a la ascorbato peroxidasa (APO), guaiacol peroxidasa (GPO), catalasa (CAT), deshidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD). Los no enzimáticos consisten de ácido ascórbico (Asc) (vitamina C), glutatión reducido (GSH), glutatión di-oxidado (GSSG), retinol (vitamina A) y tocoferoles α , β , γ (vitamina E) (Ntuli, 2012). Como fuente de carbono y energía primaria en las plantas, la glucosa puede alimentar a la ruta de las pentosas fosfato para producir poder reductor que se utiliza en la biosíntesis de antioxidantes no enzimáticos como los GSH, Asc, compuestos fenólicos y flavonoides (Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010) los cuales pueden eficientemente capturar ERO. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6FDH) es una enzima limitante en la vía de las pentosas fosfato. Un estudio en soya mostró que la G6FDH juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasis de ERO bajo estrés por sequía al incrementar las actividades de las enzimas GR, DHAR, y MDHAR (monodeshidroascorbato reductasa) y el contenido de GSH y Asc (Liu *et al.*, 2013). En plantas, los radicales libres producidos por el metabolismo de cloroplastos, mitocondrias, pared celular, membrana plasmática, retículo endoplásmico, apoplasto y peroxisomas (Sharma *et al.*, 2012) son atrapados por antioxidantes (Bailly, 2004). Los principales antioxidantes solubles en lípidos son el GSH, el Asc, los tocoferoles y los α -carotenos (Noctor y Foyer, 1998; Munné-Bosch y Alegre, 2002; Hernández *et al.*, 2009). La función de los tocoferoles por ejemplo en semillas secas es limitar la oxidación de lípidos no enzimáticos (Sattler *et al.*, 2004; Méne-Saffrané *et al.*, 2010). En un estudio de Kranner y Birtic (2005) con GSH, se encontró que cuando los procesos oxidativos prevalecen durante la desecación a largo plazo o el envejecimiento en el estado seco, los antioxidantes se rompen. Cuando la mayor parte del GSH es convertido en GSSG, el potencial de reducción (GSSG/2GSH) incrementa y se convierte en una señal que inicia la muerte celular programada. A nivel celular, esto ayuda al organismo a eliminar las células dañadas, pero si este proceso ocurre repetidamente, todo el organismo pierde viabilidad.

Fenómeno de la desecación en las semillas recalcitrantes

Las semillas recalcitrantes son altamente susceptibles al daño por desecación y bajas temperaturas y por lo tanto no pueden almacenarse en las mismas condiciones que las ortodoxas. Cabe mencionar que dentro del grupo de las semillas recalcitrantes existe un amplio espectro de comportamientos, desde las que presentan larga vida útil y son bastante tolerantes a la desecación, hasta (la mayoría de las recalcitrantes) semillas con una vida útil corta y muy sensibles a la desecación (Song *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012). Las semillas recalcitrantes tolerantes a la desecación y al frío son las que cuentan con elementos de protección anteriormente mencionados (LEA, sHSP, azúcares, etc.) y en presencia de un contenido hídrico óptimo, estos elementos no son pertinentes para el desarrollo y germinación de las semillas recalcitrantes (Pammenter y Berjak, 1999; Song *et al.*, 2003; Berjak *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012). Interesantemente, en un análisis comparativo de perfiles de proteoma de LEA entre semillas ortodoxas (*Medicago truncatula*) y recalcitrantes (*Castanospermum australe*), se encontró que el programa de desarrollo que permite la tolerancia a la desecación involucra la síntesis de una gran variedad de proteínas LEA (pobrementemente caracterizadas) y parcialmente a la proteína ABI3 (cuyas mutantes de *M. truncatula* son insensibles al ABA). Este programa de desarrollo se entrelaza con la síntesis de las dehidrinas, lo que sugiere una necesidad de mantener cierta tolerancia frente al estrés osmótico moderado durante la maduración (Delahaie *et al.*, 2013).

Conclusión

En los tejidos vegetativos la sensibilidad a la desecación es probablemente el estado ancestral y la tolerancia una característica que ha evolucionado más de una vez en las plantas superiores, lo que indicaría que los mecanismos de tolerancia no son necesariamente los mismos en todas las especies de semillas (Pammenter y Berjak, 1999). La participación de fitorreguladores como el ABA y el AG en el desarrollo de las semillas es de gran relevancia, debido a que una alteración en la síntesis o degradación de estas hormonas, afecta directamente la acumulación de las proteínas de estrés como las LEA o sHSP, sin las cuales las semillas se vuelven sensibles a la desecación y mueren. De manera general se abordaron los principales mecanismos para la protección a la desecación en semillas, sin embargo, la función de varios de estos elementos aún no es clara. Un ejemplo son las proteínas LEA, que a pesar de ser numerosas (7 grupos) y de acumularse durante periodos de estrés por sequía, sólo se ha determinado *in vitro* un par de funciones y se han estudiado solamente dos grupos que incluyen a las dehidrinas, por lo que esta familia de proteínas requiere de una amplia investigación que permita la caracterización de la función específica de cada uno de sus miembros.

Agradecimientos

Agradecimientos al Conacyt por el apoyo al proyecto 132258-Q y la beca 275351 para estudios de posgrado y a la CIC de la UMSNH.

Referencias

Alpert P, Oliver MJ. 2002. Drying without dying. *In: Desiccation and*

- Survival in Plants: Drying Without Dying*, pp. 3–43. Black M, Pritchard HW, (eds.) CABI Wallingford and New York.
- Angelovici R, Galili G, Fernie AR, Fait A.** 2010. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci.* 15: 211–218
- Bailly C.** 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 14: 93–107
- Baskin JM, Baskin CC.** 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14: 1–16
- Bassel GW, Lan H, Glaab E, Gibbs DJ, Gerjets T, et al.** 2011. Genome-wide network model capturing seed germination reveals coordinated regulation of plant cellular phase transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 9709–9714
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA.** 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.* 148: 6–24
- Baud S, Feria Bourrellier AB, Azzopardi M, Berger A, Dechorgnat J, et al.** 2010. PII is induced by WRINKLED1 and fine-tunes fatty acid composition in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 64: 291–303
- Bentsink L, Koornneef M.** 2008. Seed dormancy and germination. *Arabidopsis Book.* 6:e0119.
- Berjak P, Farrant JM, Pammenter NW.** 2007. Seed Desiccation-Tolerance Mechanisms. In *Jenks M A., Wood AJ. (Eds.), Desiccation Tolerance of Pollen, Spores, and Seeds (First.)*. Iowa: Blackwell Publishing.
- Bolouri-Moghaddam MR, Le Roy K, Xiang L, Rolland F, Van den Ende W.** 2010. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS J.* 277: 2022–2037
- Buitink J, Hoekstra FA, Leprince O.** 2002. Biochemistry and biophysics of tolerance systems. In *Black M., Pritchard H. (Eds.), Desiccation and survival in plants: Drying without dying* (pp. 293–318). Wallingford: CABI.
- Burke MJ.** 1986. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In *Membranes, Metabolism and Dry Organisms* pp. 358–363. Leopold AC. (Ed.) Comstock, Ithaca London.
- Chakrabortee S, Tripathi R, Watson M, Schierle GS, Kurniawan DP, et al.** 2012. Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Mol. Biosyst.* 2012. 8: 210–219
- Chin HF, Krishnapillay B.** 1989. Recalcitrant vs. *Orthodox Seeds*. In *Seed Moisture*. Stanwood PC, McDonald MB (Eds.) (CSSA Speci.). Madison: Crop Science Society of America.
- Crowe JH, Crowe LM, Wolkers WF, Oliver AE, Ma X, et al.** 2005. Stabilization of dry mammalian cells: lessons from nature. *Integr. Comp. Biol.* 45:810–820
- Cuming AC.** 1999. LEA Proteins. In *Seed Proteins* (pp. 753–780). Dordrecht / Boston / London: Kluwer Academic.
- Da Silva EAA, Toorop PE, van Aelst AC, Hilhorst HW.** 2004. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. *Rubi*) seed germination. *Planta* 220: 251–261
- Delahaie J, Hundertmark M, Bove J, Leprince O, et al.** 2013. LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. *J. Exp. Bot.* 64: 4559–4
- Dionisio-Sese ML, Tobita S.** 1998. Antioxidant responses of rice seedling to salinity stress. *Plant Sci.* 135: 1–9
- Donohue K.** 2005. Niche construction through phenological plasticity: life history dynamics and ecological consequences. *New Phytol.* 166: 83–92
- Dure LI, Crouch M, Harada J, Ho TD, Mundy J, et al.** 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12: 475–486.
- Fait A, Angelovici R, Less H, Ohad I, Urbanczyk-Wochniak E, et al.** 2006. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiol.* 142: 839–854
- Farrant JM, Moore JP.** 2011. Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 340–345
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G.** 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171: 501–23
- Fosket DE.** 1994. Plant Growth and Development (United Kin., p. 580). London: Academic Press Limited.
- Franks F.** 1985. Biophysics and Biochemistry at Low Temperatures. Cambridge: Cambridge University Press.
- Goyal K, Tisi L, Basran A, Browne J, Burnell A, et al.** 2003. Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein. *J. Biol. Chem.* 278: 12977–84
- Gsponer J, Babu MM.** 2009. The rules of disorder or why disorder rules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 99: 94–103
- Hernández I, Alegre L, Van Breusegem F, Munné-Bosch S.** 2009. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. *Trends Plant Sci.* 14:125–132
- Hilhorst HWM.** 2008. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Sci. Res.* 5: 61–73
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJJ.** 2008. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol.* 179: 33–54
- Holdsworth MJ, Finch-Savage WE, Grappin P, Job D.** 2008. Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. *Trends Plant Sci.* 13: 7–13.
- Huang CY, Chung CI, Lin YC, Hsing YI, Huang AH.** 2009. Oil bodies and oleosins in *Physcomitrella* possess characteristics representative of early trends in evolution. *Plant Physiol.* 150:1192–1203
- Hundertmark M, Hinch DK.** 2008. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics.* 9: 118–125
- Inzé D, Montagu MV.** 1995. Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotech.* 6: 153–158
- Iturriaga G.** 2008. The LEA proteins and trehalose loving couple: a step forward in anhydrobiotic engineering. *Biochem. J.* 410:e1–2. Koster KL, Leopold AC. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 88: 829–32
- Iturriaga G, Suárez R, Nova-Franco B.** 2009. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 10:3793–3810
- Kamisugi Y, Cuming AC.** 2005. The evolution of the abscisic acid response in land plants: comparative analysis of group 1 LEA gene

- expression in moss and cereals. *Plant Mol. Biol.* 59: 723–737
- Koster KL, Leopold AC.** 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 88: 829–832
- Kovacs D, Agoston B, Tompa P.** 2008. Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones. *Plant Signal. Behav.* 3: 710–713
- Kranner I, Birtic S.** 2005. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integ. Comp. Biol.* 45: 734–40
- Le BH, Cheng C., Bui A Q, Wagmaister JA, Henry KF, Pelletier J, et al.** 2010. Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 8063–70
- Leprince O., Buitink J.** 2010. Desiccation tolerance: from genomics to the field. *Plant Sci.* 179: 554–564
- Leprince O, Walters-Vertucci C.** 1995. A Calorimetric study of the glass transition behaviors in axes of bean seeds with relevance to storage stability. *Plant Physiol.* 109: 1471–1481
- Li D, He X.** 2009. Desiccation induced structural alterations in a 66-amino acid fragment of an anhydrobiotic nematode late embryogenesis abundant (LEA) protein. *Biomacromol.* 10: 1469–77
- Linkies A, Graeber K, Knight C, Leubner-Metzger G.** 2010. The evolution of seeds. *New Phytol.* 186: 817–831.
- Liu Y-H, Offler CE, Ruan Y-L.** 2013. Regulation of fruit and seed response to heat and drought by sugars as nutrients and signals. *Front. Plant Sci.* 4: 1-12.
- Mène-Saffrané L, Jones AD, DellaPenna D.** 2010. Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:17815-17820
- Mittler R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410
- Munné-Bosch S, Alegre L.** 2002. The Function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 31–57
- Nambara E, Marion-Poll A.** 2003. ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci.* 8: 213–217
- Noctor G, Foyer CH.** 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249–279.
- Ntuli TM.** 2012. Drought and Desiccation-Tolerance and Sensitivity in Plants. In *Mworia JK (ed.) Botany. In Tech, Johannesburg, pp 29-60*
- Oliver A E, Leprince O, Wolkers WF, Hinch DK, Heyer A G, Crowe JH.** 2001. Non-disaccharide-based mechanisms of protection during drying. *Cryobiology* 43: 151–167
- Olvera-Carrillo Y, Reyes JL, Covarrubias AA.** 2011. Late embryogenesis abundant proteins: Versatile players in the plant adaptation to water limiting environments. *Plant Signal. Behav.* 6: 586–5
- Pammenter NW, Berjak P.** 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation tolerance mechanisms. *Seed Sci. Res.* 9: 13–37.
- Paul MJ, Jhurreca D, Zhang Y, Primavesi LF, Delatte T, et al.** 2010. Upregulation of biosynthetic processes associated with growth by trehalose 6-phosphate. *Plant Signal. Behav.* 5: 386–392
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE.** 2003. Biology of Plants (Sixth edit., p. 944). New York, USA: W.H. Freeman and Company.
- Reyes JL, Rodrigo M.-J, Colmenero-Flores JM, Gil J-V, Garay-Arroyo A, et al.** 2005. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant Cell Environ.* 28: 709–718
- Roberts EH.** 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci. Tech.* 1: 499–514.
- Sadeghipour HR, Bhatla SC.** 2002. Differential sensitivity of oleosins to proteolysis during oil body mobilization in sunflower seedlings. *Plant Cell Physiol.* 43: 1117–1126.
- Salvi G, De Los Rios P, Vendruscolo M.** 2005. Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 61: 492–9.
- Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Pollard M, DellaPenna D.** 2004. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination *Plant Cell* 16: 1419–1432
- Sreenivasulu N, Wobus U.** 2013. Seed-development programs: a systems biology-based comparison between dicots and monocots. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64:189-217
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M.** 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012: 1–26
- Shimada TL, Shimada T, Takahashi H, Fukao Y, Hara-Nishimura I.** 2008. A novel role for oleosins in freezing tolerance of oilseeds in Arabidopsis thaliana. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 55: 798–809
- Siloto RMP, Findlay K, Lopez-Villalobos A, Yeung EC, Nykiforuk CL, et al.** 2006. The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in Arabidopsis. *Plant Cell* 18: 1961–1974
- Song S-Q, Berjak P, Pammenter N, Ntuli TM, Fu J-R.** 2003. Seed recalcitrance: A current assesment. *Acta Bot. Sin.* 45: 638–643
- Tolleter D, Jaquinod M, Mangavel C, Passirani C, Saulnier P, et al.** 2007. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell* 19: 1580–1589
- Tompa P.** 2002. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* 27: 527–33
- Tompa P, Kovacs D.** 2010. Intrinsically disordered chaperones in plants and animals. *Biochem. Cell Biol.* 88:167-174
- Wang WQ, Cheng HY, Möller IM, Song SQ.** 2012. The role of recovery of mitochondrial structure and function in desiccation tolerance of pea seeds. *Physiol Plant.* 144: 20-34
- Waters ER.** 2013. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *J. Exp. Bot.* 64: 391-403
- White CN, Rivin CJ.** 2000. Gibberellins and seed development in maize. II. *Gibberellin synthesis inhibition enhances abscisic acid signaling in cultured embryos.* *Plant Physiol.* 122: 1089–97
- Wolkers WF, McCready S, Brandt WF, Lindsey GG, Hoekstra FA.** 2001. Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* 1544: 196–206
- Zur Nieden U, Neumann D, Bucka A, Nover L.** 1996. Tissue-specific localization of heat-stress proteins during embryo development. *Planta* 196: 530–538