

Tesis Doctoral

# La fotooxidación en la semilla de sauce y sus consecuencias en la imbibición y formación de la plántula

Roqueiro, Gonzalo

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Roqueiro, Gonzalo. (2011). La fotooxidación en la semilla de sauce y sus consecuencias en la imbibición y formación de la plántula. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Roqueiro, Gonzalo. "La fotooxidación en la semilla de sauce y sus consecuencias en la imbibición y formación de la plántula". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

---

**La fotooxidación en la semilla de sauce y sus consecuencias en la imbibición y formación de la plántula**

---

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Licenciado Gonzalo Roqueiro**

**Dirección:** Dr. Horacio Maroder

Dra. Sara Maldonado

**Lugar de trabajo:** Laboratorio de Fisiología de la Conservación del Germoplasma, IRB, CIRN, INTA Castelar y Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEyN, UBA

---

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2011

## La fotooxidación en la semilla de sauce y sus consecuencias en la imbibición y formación de la plántula

### Resumen

A diferencia de lo que ocurre en una semilla ortodoxa típica, los tejidos embrionarios de las semillas de sauce (*Salix nigra* L.) presentan cloroplastos que no desdiferencian durante la maduración del secado, por lo que conservan la clorofila y mantienen su sistema de endomembranas intacto. Debido a que las membranas tilacoides son los principales sitios para la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), resulta inevitable que sean afectadas o dañadas cuando las semillas son expuestas a la luz (fotooxidación). Otra atipicidad que presentan estas semillas es que durante la hidratación controlada (*priming*) ocurre un descenso de la germinación normal (GN) que es seguido por una recuperación de la misma. El objetivo de este trabajo de tesis fue determinar la probable participación de las ERO en los procesos fotooxidativos que afectan las semillas de sauce y estudiar sus consecuencias durante la imbibición y la germinación de las mismas. Las reacciones oxidativas generadas por la clorofila excitada por la luz, inducen un fuerte deterioro principalmente en los tejidos externos más expuestos a dicho agente. En semillas de otras especies se ha reportado que, con la hidratación inicial, se genera un estallido oxidativo. En las semillas de sauce, el alto nivel basal de ERO producido por la fotooxidación potencia el estallido oxidativo provocando el atípico descenso de la GN. Cuando la hidratación es controlada el daño causado por el estallido oxidativo es revertido debido a un mayor tiempo de actuación de los mecanismos de reparación y de las defensas antioxidantes que conduce a la recuperación de la GN. Por el contrario, si los mecanismos de reparación no tienen el suficiente tiempo de actuación, como ocurre cuando la hidratación no es controlada, los daños no se revierten, lo que se ve reflejado en un aumento de la geminación anormal. En este caso, si la fotooxidación no afecta el eje embrionario, la plántula genera diversos mecanismos de recuperación entre los que se destaca un sensible aumento de las defensas antioxidantes, que le permiten superar los daños y continuar con su desarrollo.

**Palabras claves:** semillas, *Salix nigra*, fotooxidación, clorofila, cloroplasto, germinación, priming, estallido oxidativo, especies reactivas del oxígeno (ERO), reversión del daño fotooxidativo

## **Photooxidation in willow seed and its consequences on imbibitions and seedling formation**

### **Abstract**

Contrary to what happens in a typical orthodox seed, in willow seeds (*Salix nigra* L.) the chloroplasts of the embryonic tissues do not dedifferentiate during the maturation drying process, preserving chlorophyll and maintaining intact their endomembrane system. Since the thylakoid membranes are the principal sites of reactive oxygen species (ROS) generation, it is inevitable that they be affected and damaged when seeds are exposed to light (photo-oxidation). Another atypical characteristic presented by these seeds is that during controlled hydration (priming) normal germination (NG) experiences a decrease, followed by a recovery. The objective of this thesis was to confirm the likely participation of ROS in the photo-oxidative processes that affect the willow seeds and to study the consequences of these processes on seed imbibitions and germination. The oxidative reactions produced by light-excited chlorophyll induced a strong deterioration process, principally in the external tissues most exposed to the light. There have been reports of an oxidative burst accompanying initial hydration in seeds of other species. In willow seeds, the high ROS baseline produced by photo-oxidation strengthens that oxidative burst, causing an atypical decrease in NG. Subsequently, under controlled hydration conditions, the damage caused by the oxidative burst is reverted due to the increased exposure to the reparative mechanisms and antioxidant defenses that leads to the recovery of NG. On the other hand, if the reparative mechanisms are not allowed to act long enough, as occurs during non-controlled hydration, the damages are not reverted, which is reflected in an increase in abnormal germination. In this case, if photo-oxidation does not affect the embryonic axis, the seedling generates diverse mechanisms of reparation, particularly a sensitive increase in antioxidant defenses that allow it to overcome damages and continue developing.

**Keywords:** seeds, *Salix nigra*, photo-oxidation, chlorophyll, chloroplast, germination, priming, oxidative burst, reactive oxygen species (ROS), reversion of photo-oxidative damage, seed recovery.

Agradezco enormemente a:

mis queridos directores Sara y Horacio, por su invaluable apoyo y compromiso,

Ester, una gran compañera y mejor amiga, millón de gracias,

María del Carmen, por abrirme las puertas de su laboratorio y hacerme sentir parte de ese hermoso grupo,

Analía, Verónica, Tony, María Inés, Diana, Vicky y Gabriela, por estar siempre dispuestos a dar una mano,

Carolina, Mónica, Graciela y Emilio por su gran aporte al trabajo,

Y a todos los que de una forma u otra hicieron posible esta tesis.

Dedico este trabajo a mí padre por sus sabios consejos y su cariño constante,

a mí madre por haberme transmitido sus valores que hoy marcan mi camino,

y a mi pequeña gran familia, Pety y Pedro, por hacerme tan feliz y enseñarme que las cosas realmente importantes de la vida suceden cuando estoy con ellos.

El trabajo expuesto en esta Tesis es parte de los siguientes artículos:

**Roqueiro G, Facorro G, Huarte MG, Rubín de Celis E, Maldonado S, Maroder H.** 2010. Effects of light and oxygen on membrane integrity in willow seeds. *Annals of Botany* (105): 1027–1034.

**Roqueiro G, Maldonado S, Ríos MC, Maroder H.** Fluctuation of oxidative stress indicators in *Salix nigra* seeds during priming. *Enviado a Journal of Experimental Botany*

**Roqueiro G, Olle Resa C, Causin HF, Maroder H, Maldonado S.** Damages in willow seeds by photo-oxidation are evaluated during germination: *Manuscrito en preparación*

Artículo de divulgación

**Roqueiro G, Maldonado S y Maroder H.** 2008. El rápido deterioro de las semillas de salicáceas y su reversión”, *Ciencia Hoy* (17): 21-27

## Abreviaturas y Acrónimos

$\cdot\text{OH}$	radical hidroxilo
$^1\text{O}_2$	oxígeno singlete
<b>AGPI</b>	ácidos grasos poliinsaturados
<b>APX</b>	ascorbato peroxidaasa
<b>ca</b>	contenido de agua
<b>CAT</b>	catalasa
<b>DAB</b>	<i>3,3'-diaminobenzidine</i> -HCl
<b>DG</b>	días de germinación
<b>ERO</b>	especies reactivas del oxígeno
<b>ESR</b>	<i>electron spin resonance</i>
<b>GA</b>	germinación normal
<b>GN</b>	germinación anormal
<b>GT</b>	germinación total
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrógeno
<b>HR</b>	humedad relativa
<b>MET</b>	<i>microscopy electrony transmision</i>
<b>NBT</b>	<i>nitro blue tetrazolium</i>
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	radical anión superóxido
<b>POX</b>	guaiacol peroxidasa
<b>PSAO</b>	plántulas provenientes de semillas almacenadas en oscuridad
<b>PSF</b>	plántulas provenientes de semillas fotooxidadas
<b>PSF-10</b>	plántulas provenientes de semillas fotooxidadas a $10\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
<b>PSF-2</b>	plántulas provenientes de semillas fotooxidadas a $2\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
<b>PSNF</b>	plántulas provenientes de semillas no-fotooxidadas
<b>RL</b>	radicales libres
<b>RLE</b>	radicales libres estables
<b>SOD</b>	superóxido dismutasa

## ÍNDICE

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....	1
Capítulo 2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
Capítulo 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1.- Análisis de semillas fotooxidadas: Efectos de la fotooxidación sobre la integridad de las membranas.....	17
3.2.-Análisis de semillas fotooxidadas: Fluctuación de indicadores de estrés oxidativo durante el <i>priming</i> .....	29
3.3.- Análisis de plántulas procedentes de semillas fotooxidadas.....	51
Capítulo 4. CONCLUSIONES.....	70
Capítulo 5. BIBLIOGRAFÍA.....	72

## Índice de Figuras

### Capítulo 3.1

<b>Figura 1:</b> Germinación normal (GN), tiempo medio de germinación (TMG) y germinación total (GT) de semillas de <i>Salix nigra</i> L.....	19
<b>Figura 2: A,</b> Espectros de ESR de los tratamientos A y F de la Figura 1. <b>B,</b> Amplitud de las señales de ESR para los tratamientos A-F.....	20
<b>Figura 3:</b> Imágenes de cloroplastos de tejidos embrionarios de semillas de <i>Salix nigra</i> L. que muestran los efectos perjudiciales de la luz. ....	21
<b>Figura 4:</b> Plántulas de siete días de <i>Salix nigra</i> L.....	22
<b>Figura 5:</b> Efecto de la luz sobre la permeabilidad de la membrana de las semillas evaluado tanto por la sonda spin ESR como por la conductividad.....	24

### Capítulo 3.2

<b>Figura 1.</b> Efecto del tratamiento de <i>priming</i> (-1,55 MPa) sobre la germinación (%) de semillas de <i>Salix nigra</i> fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).....	32
<b>Figura 2.</b> Localización de la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ mediante NBT durante la primera hora de imbibición.....	36
<b>Figura 3.</b> Localización de la producción de $\text{H}_2\text{O}_2$ mediante DAB y $\text{CeCl}_3$ .....	37
<b>Figura 4.</b> Efecto del <i>priming</i> sobre la concentración de radicales libres en semillas de <i>Salix nigra</i> fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).....	38
<b>Figura 5.</b> Efecto del <i>priming</i> sobre la permeabilidad de la membrana evaluada por la relación W/L en semillas de <i>Salix nigra</i> fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).....	41
<b>Figura 6.</b> Efecto del <i>priming</i> sobre las actividades enzimáticas de superóxido dismutasa ( <b>SOD</b> ), guayacol peroxidasa ( <b>POX</b> ), ascorbato peroxidasa ( <b>APX</b> ) y catalasa ( <b>CAT</b> ) en semillas de <i>Salix nigra</i> fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).....	43

### Capítulo 3.3

<b>Figura 1.</b> Desarrollo de raíces adventicias ( <b>A</b> ) y de primordios foliares ( <b>B</b> ) en diferentes días de germinación.....	53
<b>Figura 2.</b> Plántulas procedentes de semillas no fotooxidadas, 14 DG.....	54
<b>Figura 3.</b> Plántulas procedentes de semillas fotooxidadas con una intensidad de luz de $2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 14 DG.....	55
<b>Figura 4.</b> Plántulas procedentes de semillas fotooxidadas con una intensidad de luz de $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 14 DG.....	55
<b>Figura 5.</b> Plántulas procedentes de semillas no fotooxidadas s/cotiledón, 14 D.....	55

<b>Figura 6.</b> Sección transversal de cotiledón de plántulas de <i>Salix nigra</i> L., 12 DG.....	57
<b>Figura 7.</b> Célula del mesófilo esponjoso de cotiledón de las PSNF, 14 DG.....	58
<b>Figura 8.</b> Célula del mesófilo esponjoso de cotiledón de las PSF-10, 14 DG.....	59
<b>Figura 9.</b> Célula del mesófilo esponjoso de cotiledón de las PSF-10, 14 DG.....	59
<b>Figura 10.</b> Célula del mesófilo esponjoso de cotiledón de las PSF-10, 14 DG.....	60
<b>Figura 11.</b> Célula del mesófilo esponjoso de cotiledón de las PSF-10, 14 DG.....	61
<b>Figura 12.</b> En <i>S. nigra</i> , actividad enzimática (A-D) y contenido de MDA (E) de semillas fotooxidadas y PSF.....	63
<b>Figura 13.</b> Localización histoquímica de la producción de $O_2^-$ mediante la sonda NBT en plántulas de sauce provenientes de semillas fotooxidadas sometidas a dos intensidades de luz (PSF-2 y PSF-10) y plántulas control (PSNF).....	65
<b>Figura 14.</b> Localización histoquímica de la producción de $O_2^-$ mediante la sonda NBT en plántulas de 14 DG provenientes de semillas fotooxidadas bajo dos intensidades de luz (PSF-2 y PSF-10) y plántulas provenientes de semillas no-fotooxidadas (PSNF).....	65

## Índice de Tablas

### Capítulo 3.1.

<b>Tabla 1.</b> Efecto de la intensidad de la luz en las composiciones de ácidos grasos de los triglicéridos ( <b>TG</b> ), fosfolípidos ( <b>PL</b> ), y glicolípidos ( <b>GL</b> ) de las semillas de <i>Salix nigra</i> L.....	23
---	----

### Capítulo 3.2.

<b>Tabla 1.</b> Efecto del tiempo de <i>priming</i> en la variación de quimioluminiscencia en semillas de <i>Salix nigra</i> fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).....	33
<b>Tabla 2.</b> Efecto de atrapadores de $\text{O}_2^{\cdot -}$ ( $\text{MnCl}_2$ ), $\cdot\text{HO}$ (DMSO), $\text{H}_2\text{O}_2$ (DMTU) e inhibidores de NAD(P)H oxidasa ( $\text{ZnSO}_4$ ) o peroxidasa (KCN y $\text{NaN}_3$ ) sobre la GN y la liberación de $\text{O}_2^{\cdot -}$ en durante los primeros 45 min de imbibición de semillas de <i>Salix nigra</i> fotooxidadas a dos intensidades de luz ( <b>2 y 10 <math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}</math></b> ).....	35
<b>Tabla 3.</b> Efecto del <i>priming</i> en el contenido de clorofila y carotenos en semillas de <i>Salix nigra</i> fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).....	39
<b>Tabla 4.</b> Efecto del <i>priming</i> en la composición de ácidos grasos en semillas de <i>Salix nigra</i> fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).....	40
<b>Tabla 5.</b> Efecto del <i>priming</i> sobre la concentración de malonildialdehído (MDA), el contenido de proteínas solubles y la intensidad de la oxidación proteica en semillas de <i>Salix nigra</i> fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).....	42

## Capítulo 1

### INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes temas abordados últimamente por la ciencia y la tecnología ha sido el de la conservación de los recursos genéticos debido a que la expansión de la frontera agrícola va anexando continuamente áreas originalmente con gran diversidad biológica para destinarlas al cultivo de un número reducido de especies. Sumado a esto, el cambio climático produce cambios en la genética de las plantas en respuesta a procesos de selección y provoca que algunas comunidades de plantas o asociaciones de especies puedan perderse por no tener la capacidad de adaptarse a estos cambios (Rajjou y Debeaujon, 2008). Este accionar implica que algunas especies sean eliminadas con su carga de genes, los cuales podrían ser necesarios en el futuro. La conservación de especies silvestres como así también de especies mejoradas genéticamente resulta evidentemente necesaria para eventuales futuros usos.

El germoplasma vegetal se conserva fundamentalmente como semilla. La semilla constituye el principal vector de propagación de las plantas y su conservación tiene como objetivo principal el mantenimiento de la viabilidad, es decir, que el sistema deshidratado conserve la capacidad de sustentar vida. En cuanto a la conservación de las semillas, una primera clasificación las separó en dos categorías: tolerantes a la deshidratación (u **ortodoxas**) y no tolerantes a la deshidratación (o **recalcitrantes**) (Roberts, 1973a). Las semillas **ortodoxas** son las que naturalmente se deshidratan hasta alcanzar un contenido de agua en equilibrio con la humedad ambiente (10-12 % de contenido de agua) y pueden tolerar un posterior secado artificial hasta aproximadamente 5 % sin perder la viabilidad. Existen marcadas diferencias entre las semillas ortodoxas de distintas especies en cuanto al lapso durante el cual se mantienen viables, el que varía desde algunos años hasta, en algunos casos, centurias (Sallon y col., 2008). La longevidad resulta mayor cuanto menor es el contenido de agua como la temperatura en la que se conservan. Las semillas **recalcitrantes** en cambio, pierden la viabilidad antes de que su contenido de agua se equilibre con la humedad del ambiente. El contenido de agua por debajo del cual pierden la viabilidad se alcanza relativamente en poco tiempo, de ahí que sean muy poco

longevas. Se las puede mantener viables por lapsos relativamente cortos en condiciones de alta humedad, de temperaturas ligeramente superiores a 0 ° C y tratadas con biocidas.

A medida que mayor número de especies se fueron incorporando a estos estudios, se detectaron casos en los que el comportamiento se apartaba de aquellas dos categorías iniciales, por lo que, más recientemente se incluyó una tercera categoría llamada **intermedia**. Esta categoría abarca aquellas semillas que, si bien toleran la deshidratación natural, resultan afectadas en diferente grado por una posterior deshidratación artificial y/o muestran alguna susceptibilidad al frío en estado deshidratado. También incluye a semillas que pierden la viabilidad con contenidos de agua relativamente bajos aunque no tanto como el que alcanzarían deshidratándose naturalmente.

La etapa de deshidratación de las semillas ortodoxas, última fase del desarrollo programado de la semilla, se inicia con la acumulación de reservas en los tejidos del embrión y del endosperma y continúa con la desdiferenciación general de la compleja estructura de las células de esos mismos tejidos. La desdiferenciación implica la desorganización del citoesqueleto y la reducción general de membranas que acompañan la progresiva deshidratación y conducen a una drástica reducción del metabolismo. Los sistemas de membranas, aproximadamente en número de 17, son todos heredables, siendo el tonoplasto la única membrana que puede ser generada de *novo* (Staehelein, 2000). En la última etapa del desarrollo de las semillas ortodoxas, el sistema de membranas queda altamente reducido y las organelas desdiferencian. En el caso de cloroplastos y mitocondrias, la desdiferenciación se visualiza por la reducción de las membranas internas. La desdiferenciación de los cloroplastos y la consecuente degradación de la clorofila hacen que las semillas pierdan el color verde (*degreening*). Se considera que la desdiferenciación de las estructuras o componentes celulares constituye un requisito para que se toleren bajos niveles de contenido de agua sin pérdida de la viabilidad. En contraposición, en las semillas recalcitrantes las organelas no desdiferencian y el metabolismo no cambia.

La familia de las Salicáceas comprende aproximadamente 350 especies que se agrupan en dos géneros *Populus* (los álamos) y *Salix* (los sauces). En la práctica forestal, las especies de sauce y álamo se propagan por estacas (dado la facilidad de éstas para

enraizar) y no por semillas. Obviamente, la propagación por estacas acorta sensiblemente el tiempo requerido para que la planta alcance el tamaño que se desea. Por otra parte, las semillas de las especies de los dos géneros presentan el inconveniente de una rápida pérdida de viabilidad. Si bien las semillas no son requeridas para la propagación, resultan imprescindibles en los trabajos sobre mejoramiento genético dirigidos a mejorar la aptitud papelera y maderera de las Salicáceas, y así diversificar su uso, el que se encontraba restringido hasta no hace tanto tiempo a la fabricación de cajones como combustible. Estas actividades cobran relevancia debido a que el país cuenta con una de las zonas ecológicas más aptas para el cultivo de estas especies, como es el Delta del Paraná. Es probable que, al quedar el uso de las semillas limitado al mejoramiento, ésta haya sido la causa por la que fueran poco estudiadas, existiendo muy escasa información sobre las mismas en sus propiedades físicas, químicas, estructura y fisiología, como en lo que concierne a su rápida pérdida de viabilidad.

La corta longevidad de estas semillas determinó que en un principio se las clasificara como presuntamente recalcitrantes (King y Roberts, 1979). Esta categorización se mantuvo hasta hace relativamente poco tiempo (Pence, 1995). Posteriormente se consideró que correspondían a la categoría de semillas de comportamiento ortodoxo porque toleran la deshidratación (Hong y col., 1996; Maroder y col., 1996) aunque quedaba sin explicar la causa por la cual esa tolerancia no estaba asociada a una longevidad de por lo menos algunos años, como ocurre con las ortodoxas típicas. En estas últimas se considera que el lento envejecimiento está producido principalmente por reacciones de autooxidación y de Maillard, que por ocurrir en estado deshidratado donde la movilidad molecular es baja, son reacciones lentas (Priestley, 1986; Wilson y McDonald, 1986; McDonald, 1999).

Dado que estas semillas pierden su viabilidad en unas pocas semanas a temperatura ambiente (Maroder y col., 2000) cabe preguntarse, entonces, cuáles son los mecanismos que operan en dicho deterioro. Para contestar esta pregunta Maroder y col. (2003) encararon estudios histológicos y subcelulares donde se encontró que los cloroplastos en los tejidos embrionarios no desdiferencian durante la maduración del secado, conservando la clorofila y manteniendo intacto su sistema de endomembranas.

Los cloroplastos son los sitios principales para la generación de ERO bajo condiciones de estrés y sin estrés (Sun y col., 2002). Por lo tanto resulta inevitable que sean afectados o dañados, durante la fotooxidación debido a que éstos son la principal fuente de O<sub>2</sub> activado en las plantas (Asada y Takahashi, 1987; Asada y col., 1998; Asada, 2006).

De acuerdo a Maroder y col. (2000), cuando las semillas de *S. alba* y *S. matsudana* se someten a una atmósfera controlada de humedad (100 % HR) y periódicamente se toman muestras para testear la germinación se comprueba que a medida que aumenta el contenido de agua, primeramente ocurre un descenso de la germinación normal (GN) que posteriormente es seguido por un ascenso de la misma. Este particular comportamiento resulta difícil de comprender y en la bibliografía no ha sido reportado. Si se descarta la posibilidad de daños por imbibición (Maroder y col., 2000), el efecto positivo podría ser explicado por la previa humidificación al 100 % HR, ya que resulta en un proceso de hidratación controlada que, al mismo tiempo que retrasa el inicio de la división celular, prolonga el tiempo durante el cual actúan los procesos de reparación celular (*priming*). Esto podría explicar la razón por la cual los valores finales de la GN en las semillas sometidas a *priming* son mayores a los del control. Además, es posible inferir que la fluctuación de la GN podría ser reflejo de una similar fluctuación en la relación ataque oxidativo/defensa antioxidante.

Por todo lo dicho, la conservación de las semillas de sauce constituye un modelo de estudio interesante ya que no existe prácticamente bibliografía que describa el efecto de los radicales libres (RL) y las especies reactivas de oxígeno (ERO) en los tejidos fotosintéticos deshidratados, como lo son las semillas de Salicaceae y por ende tampoco la consecuencia de la acción de estos agentes oxidantes durante la germinación.

**Objetivo de Trabajo**

Este trabajo de Tesis tuvo como objetivo general confirmar la probable participación de las ERO en los procesos fotooxidativos que afectan la semilla y estudiar sus consecuencias durante la hidratación y la germinación de la misma

## Capítulo 2

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### Materiales

Las semillas de *Salix nigra* L. fueron obtenidas de árboles crecidos en la Estación Experimental INTA-Delta. Las mismas fueron coleccionadas entre los años 2004 y 2010 en el período que va desde mediados de octubre a principio de diciembre. La colección se realizó según el siguiente protocolo: las ramas cargadas de amentos (espigas péndulas) se cortaron de los árboles en el tiempo en que las cápsulas (frutos) se tornaban amarillentas y las semillas comenzaban a liberarse del fruto. Ya en el laboratorio, a temperatura ambiente, los amentos se separaron de las ramas y se distribuyeron sobre rejillas metálicas. Periódicamente, cada 4 h (aproximadamente) se recolectaron las semillas liberadas por explosión de la cápsula y se separaron de la matriz algodonosa que las contiene, usando aire comprimido y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta ser usadas en los diferentes experimentos. El contenido de humedad de las semillas, que es aproximadamente 40 % (base húmeda) en el momento de su liberación del fruto, después de aproximadamente 3 h a temperatura ambiente se reduce a  $11 \pm 2\%$ . Todas las operaciones señaladas se realizaron en condiciones de iluminación de muy baja intensidad.

#### Métodos

##### **(1) Determinación del contenido de agua.**

El contenido de agua de las muestras se determinó gravimétricamente y se calculó en base a la masa antes y después del secado en estufa (1 h a  $130 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), expresándose sobre base seca o húmeda, según los experimentos (ISTA, 1999).

## **(2) Pruebas de germinación**

En todos los casos las pruebas de germinación se hicieron de acuerdo con el siguiente protocolo: se colocaron las semillas sobre papel humedecido (3 hojas) con 3.5 cm<sup>3</sup> de agua destilada-desionizada en cajas de Petri de 6-cm de diámetro a 25 ± 1° C y 16 h bajo luz fluorescente/8 h de oscuridad por 7 d. La germinación se considera normal si la plántula desarrolla los cotiledones, el hipocótilo y la raíz y está erecta; las plántulas que no reúnen estos criterios son clasificadas como anormales. La germinación normal (GN) fue evaluada usando 3 réplicas de 30 semillas para cada tratamiento. En algunos experimentos también se estimaron la germinación anormal (GA) y la germinación total (GT) (semillas con germinación normal más semillas no-germinadas). Aunque las semillas frescas germinan dentro del período de 12 a 24 h (hasta 72 h para semillas con vigor bajo), el recuento definitivo se llevó a cabo el sexto día desde el momento de la siembra, de modo de poder reconocer sin dudas las plántulas anormales. En algunos experimentos se determinó además el tiempo medio de germinación (TMG), que fue calculado según la fórmula:  $\sum (n_i \cdot t_i) / \sum n_i$ , en la que  $n_i$  es el número de semillas germinadas en el tiempo  $t_i$  desde el comienzo de la imbibición.

La germinación a 24 h desde el momento de la siembra es considerada como un indicador del vigor; en este caso el criterio de germinación fue la protrusión del hipocótilo, teniendo en cuenta que (a diferencia de otras semillas) el primer signo visible de la germinación de las semillas de sauce es la extensión del hipocótilo (Pólya, 1961).

## **(3) Fotooxidación**

Las semillas se colocaron en una placa de Petri formando una monocapa, se almacenaron durante tres días en oscuridad o bajo luz fluorescente blanca-fría (1,75, 2, 10 y 16,1  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Las placas de Petri se colocaron sobre una solución saturada de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (45 % de humedad relativa) contenida en una caja plástica. Durante los tres días de almacenamiento, el contenido de agua de semillas se estabilizó a un 9 %. Los

tratamientos se llevaron a cabo a 25° C en una incubadora refrigerada MIR-153 SANYO, en aire o en atmósfera de nitrógeno (el nitrógeno se burbujea con anterioridad en una solución saturada de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Las semillas control corresponden a semillas mantenidas a -80° C (semillas no fotooxidadas).

#### **(4) Análisis de resonancia de espín electrónico (Electron Spin Resonance -ESR)**

Se realizaron cuatro réplicas de 150 mg de semillas para cada tratamiento. Las semillas fueron transferidas a un tubo de cuarzo ESR. Los espectros de ESR fueron realizados a 20° C en un espectrómetro ESR (X-band ESR Spectrometer Bruker ECS 106-Brucker Instruments, Inc., Berlin, Germany). Las condiciones del espectrómetro fueron: poder de microonda 1 mW, campo central 3445, amplitud de barrido de 1000 G, tiempo de conversión 5,12 min, constante de tiempo 5,12 m, frecuencia de modulación 50 KHz, amplitud de modulación 0,1 G, ganancia 2,104, y resolución 1024 puntos. El número de registros varió entre 100 a 400 dependiendo de la intensidad de la señal. La intensidad de la señal radical fue medida como la altura total del pico de radical libre en la intensidad de la señal del primer espectro derivativo. Todos los espectros ESR tuvieron formas lineales y amplitud de línea equivalentes, con la intensidad de la señal de ESR fueron considerados proporcionales a las concentraciones radicales. Por lo tanto, las concentraciones radicales fueron estimadas a partir de las alturas totales de los picos respectivos y expresadas como medidas relativas, relacionando dentro de cada espectro la interrelación entre la altura del pico de radical libre y la altura del pico de campo bajo de manganeso.

#### **(5) Clorofilas y carotenos**

El análisis de clorofilas y carotenos se hizo según los siguientes protocolos: las semillas pulverizadas fueron embebidas en cloroformo:metanol (2:1 en volumen) (Arnon, 1949) y Lichtenthaler (1987). La mezcla fue sonicada durante 10 min y luego centrifugada a 8000 x g. La extracción se repitió tres veces y el extracto fue secado en corriente de nitrógeno, re-disuelto en N,N-dimetilformamida y centrifugado durante 10 min a 8000 x

g. La absorbancia fue leída con un espectrofotómetro. Para la conversión de las lecturas a contenidos de clorofila y carotenos, se utilizaron las siguientes ecuaciones (Inskeep y Bloom, 1985; Lichtenthaler, 1987):

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g/mg de peso seco)} = 12,70 A_{664.5} - 2,79 A_{647}$$

$$\text{Chl } b \text{ (}\mu\text{g/mg de peso seco)} = 20,70 A_{647} - 4,62 A_{664.5}$$

$$\text{Total Chl (}\mu\text{g/mg de peso seco)} = 17,90 A_{647} - 8,08 A_{664.5}$$

$$\text{Carotenos tot (}\mu\text{g/mg de peso seco)} = (1000 \cdot A_{470} - 1,82 \cdot \text{Chl } a - 85,02 \cdot \text{Chl } b) / 198$$

A = Absorbancia

#### **(6) Microscopía de campo claro y microscopía electrónica de transmisión**

Semillas enteras (diámetro 10 x 0.5 x 0.3 mm) fueron fijadas en glutaraldehído 2,5 % en *buffer* fosfato 0,1 M, pH 7,5 a 4º C, durante 2 h. Para los estudios de microscopía de campo claro los tejidos fijados fueron deshidratados mediante una serie de etanol hasta llevarlos a acetona, luego tratados en una serie creciente de acetona-resina y finalmente embebidos en esta última (resina JB4 2-butoxiethanolmethacrylate-Polyscience, Warrington, Pa). Para realizar los estudios subcelulares, las semillas fijadas en glutaraldehído fueron post-fijadas en OsO<sub>4</sub> 1 % en el mismo *buffer* durante 1 h, deshidratadas en una serie etanol-acetona y embebidas en resina Spurr (Sigma – Aldrich, USA) según el protocolo descrito en Maldonado y Lott (1991). Los tejidos frescos y los tejidos embebidos en resina Spurr fueron usados para los análisis histoquímicos. Las secciones semi-finas se tiñeron con azul de toluidina, (O’Brien y McCully, 1981), sudan black B (Bronner, 1975) Las secciones se montaron sobre grillas cubiertas con Formvar y luego carbón, teñidas en acetato de uranilo seguido por citrato de plomo y analizadas con microscopía electrónica de transmisión (Zeiss M109).

### **(7) Extracción de lípidos y análisis de ácidos grasos analizados por GLC**

El análisis de los ácidos grasos se llevó a cabo usando semillas liofilizadas. El material fue transferido a tubos *ependorf* de 1,5 ml y los lípidos totales fueron extraídos usando la mezcla cloroformo–metanol usando el procedimiento descrito por Folch y col. (1957). Los extractos de lípidos totales fueron secados y pesados, suspendidos en 2 ml de una solución fresca de 10 % KOH en etanol y saponificados durante 60 min a 80° C usando tubos de vidrio con tapa esmerilada. Se agregaron 2 ml de hexano y los ácidos grasos se extrajeron por agitación. La fase superior orgánica (no-saponificable) fue descartada. La capa acuosa fue acidificada con 1,5 ml de HCl concentrado y los ácidos grasos se extrajeron dos veces con 1,5 ml hexano. Los extractos conteniendo los ácidos grasos libres fueron secados bajo una corriente de nitrógeno, disueltos en 1,5 ml BF<sub>3</sub> (10 % en metanol) y 1,5 ml de benceno y esterificados por calentamiento y agitación a 100° C durante 1 h. Los ésteres de ácidos grasos (Fatty Acid Methyl Esters -FAME) se extrajeron dos veces con hexano y lavados con agua destilada. Después de un lavado, la fase orgánica fue evaporada bajo una corriente de nitrógeno, re-disuelta en hexano, y analizada por Gas-Líquido Cromatografía (GLC). Luego, 1 µl de la solución FAME fue inyectada en una columna capilar (30 mm x 0,25 mm, 0,25 µm film) (Omegawax X250 - Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania) en un cromatógrafo Hewlett Packard HP-6890 equipado con un detector *flame ionization*. La temperatura de la columna fue programada para un incremento lineal de 3° C/min desde 175 a 230° C. Los picos cromatográficos de FAME fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con estándares bajo las mismas condiciones.

### **(8) Estudios de sonda de espín (*Spin probe ESR*)**

La detección de los espectros de resonancia de ESR usando la técnica de *Spin Probe* y un agente amplificante, con el objeto de estudiar los cambios en las propiedades de barrera de las membranas, han sido descritos en Golovina y Tikhonov (1994) y en Golovina y col. (1997).

Brevemente, las semillas fueron tratadas con una solución de TEMPONE (4-oxo-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidyneloxo)(Sigma). TEMPONE es un radical nitróxido anfifílico y estable que permeabiliza la membrana plasmática y separa las fases hidrofílica e hidrofóbica del citoplasma, dando a cada fase una señal ESR específica. El ferrocianuro es soluble en agua y no atraviesa la membrana plasmática excepto cuando las áreas dañadas están presentes decreciendo la amplitud de la señal (amplificante) correspondiendo a la fase hidrofílica, siendo el decrecimiento de la señal proporcional al daño de la membrana. La razón entre amplitud de ambas señales cuantifica el daño de la membrana. Ambas sustancias actúan como sondas paramagnéticas, permitiendo su detección por resonancia de espín electrónico. Para cada tratamiento, tres réplicas de 150 mg de semillas cada una fueron embebidas durante 6 h a 4º C en 1 ml de agua. Después de eso, 0,5 ml se extrajeron de agua y se agregó 2 ml de la solución TEMPONE, se mezcló y luego se agregaron 0,5 ml de ferrocianuro de potasio hasta una concentración final de 120 mM y las semillas incubadas durante 15 min. Luego, se extrajo el solvente y las semillas se secaron a 20º C durante 2 h a humedad relativa ambiente. Las semillas secas fueron selladas en un capilar de 2 mm de diámetro. Las mediciones de ESR fueron realizadas a temperatura ambiente con el espectrómetro X-band ESR arriba mencionado. Las condiciones estándar del espectrómetro para los radicales nitróxidos fueron: campo central 3483 Gauss; amplitud de barrido 80 Gauss; poder de microonda  $6,35 \cdot 10^{-1}$  mW; frecuencia de la micro-onda 9,62 GHz; el tiempo de conversión 2,56 min; constante de tiempo 2,56 min, frecuencia de modulación 50 KHz; amplitud de modulación  $9,52 \cdot 10^{-2}$  Gauss; y ganancia  $1,12 \cdot 10^4$ . Se acumularon 20 espectros para mejorar la relación señal/ruido.

### ***(9) Conductividad eléctrica***

La conductividad del filtrado se determinó según el siguiente protocolo: 300 mg de semillas se sumergieron en 8 ml de agua destilada, durante 3 h a 20º C. Se hicieron tres réplicas. La conductividad del medio acuoso se midió con un Conductivímetro Altronix Modelo CTX-II. Para la calibración del equipo se empleó una solución de KCl 3M. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{S mg}^{-1}$  de semillas secas. Los valores correspondieron a

los valores promedio  $\pm$  DE.

### **(10) Priming osmótico**

El tratamiento de *priming* se llevó a cabo mediante la colocación de las semillas fotooxidadas en una solución de polietilenglicol 6000 (-1,55 MPa) (Merck) a 17° C, durante diferentes tiempos (0, 2, 4, 6 y 8 h) de acuerdo al tratamiento. Las semillas fueron lavadas brevemente con agua destilada y secadas en papel filtro a temperatura ambiente.

### **(11) Quimioluminiscencia (SCL)**

Para medir la quimioluminiscencia, hemos modificado la técnica descrita por Causin y col. (2009). En pocas palabras, los viales se cargaron con 2 ml de 100 mM *buffer* fosfato (pH 7,0) y se midió dos veces la quimioluminiscencia. Posteriormente se agregaron las semillas (50 mg) y después de 30 min se leyó nuevamente quimioluminiscencia dos veces (siempre en condiciones de oscuridad). La quimioluminiscencia se midió en un contador de centelleo líquido Beckman LS-3150P operado en el modo *out-of-coincidence* con el programa que trae el dispositivo. Los valores fueron expresados como cuentas por minuto (cpm). La quimioluminiscencia se calcula según la fórmula:

$$\text{SCL (cpm)} = (\text{SCLs} - \text{SCL}_0)$$

Donde SCLs es el promedio de lecturas de las muestras del vial que contiene las semillas y SCL<sub>0</sub> es el promedio de las lecturas del vial con *buffer*

### **(12) Producción de $O_2^{\cdot-}$**

La producción del radical  $O_2^{\cdot-}$  se determinó mediante una versión modificada de Liskay y col. (2004). Para estudiar el efecto metabólico de las ERO al comienzo de la imbibición sobre la GN y la producción del radical  $O_2^{\cdot-}$  se preincubaron en un tubo tipo *ependorf* 0,1 g de semillas de sauce con 1 ml las diferentes soluciones: cloruro de manganeso ( $MnCl_2$ ), N, N'-dimetiltiourea (**DMTU**), dimetilsulfóxido (**DMSO**), sulfato de zinc ( $ZnSO_4$ ), cianuro de potasio (**KCN**) y azida sódica (**NaN<sub>3</sub>**). En el caso del control se colocó 1 ml de agua. Pasados 5 min se agregó 0,5 ml de la sonda  $Na_2,3'$ -[1-[(*phenylamino*)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate (**XTT**) 1,5 mM (0,5 mM en el medio de reacción) y se incubó durante 40 min más (45 min en total). Para lograr el mayor contacto de las semillas con las diferentes soluciones, la reacción se hizo en un homogenizador modelo Sang (Laboratorios IPE, Argentina). La absorbancia de la mezcla de reacción (1,5 ml totales) incrementó debido a la formación del compuesto coloreado formazán y fue medida espectofotométricamente a 470 nm. La absorbancia fue transformada en concentración molar usando un coeficiente de extinción de  $2,16 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Sutherland and Learmonth, 1997). Los lotes de semillas destinados al cálculo de la GN se les agregó agua en lugar de XTT.

### **(13) Localización de ERO**

#### *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> citoquímica*

El método utilizado para localización citoquímica del  $H_2O_2$  se basó en la generación de precipitados de peróxidos de cerio (Bestwick y col. 1997). Las semillas fueron embebidas en una solución 5 mM de  $CeCl_3$ , 50 mM buffer MOPS (3-morpholinopropanesulfonic acid, 3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid) pH 7,2 durante 1 hora. El  $CeCl_3$  en presencia de  $H_2O_2$  forma peróxido de Ce (IV) el cual precipita. Como control negativo, previo a la imbibición con  $CeCl_3$  las semillas se incubaron con DMTU (15 mM), un atrapador de  $H_2O_2$ . Como control positivo se utilizó KCN (1 mM), un inhibidor de las peroxidasas. Los cortes histológicos de las semillas son analizados mediante un

microscopio ambiental de barrido (*Environmental Scanning Electron Mycroscopy-ESEM*) provisto de un analizador EDAX el cual permite la detección de Ce en los diferentes compartimentos celulares.

#### *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> histoquímica*

El método usado para detección *in situ* del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue basado en la generación de un precipitado marrón en presencia de 3,3'-*diaminobenzidine*-HCl (DAB) (Romero y col., 2004). Las semillas se embebieron en una solución de DAB del 0,1 %. Luego de una hora de incubación las semillas se lavaron con agua destillada y se decoloraron con alcohol 80 % durante toda la noche. El control positivo y negativo utilizado fue el mismo que el del tratamiento anterior.

#### *O<sub>2</sub><sup>•-</sup> histoquímica*

La presencia del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se determinó mediante el precipitado azul que forma el radical con el NBT (*nitroblue tetrazolium chloride*) (Romero y col., 2004). Las semillas se incubaron durante 1 hora en una solución 0,1 % de NBT. Las semillas se lavaron con agua destillada y se decoloraron con alcohol 80 % durante toda la noche. Como control negativo las semillas se incubaron previamente con una solución 12 mM de MnCl<sub>2</sub>, un atrapador radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

#### **(14) Proteínas solubles y oxidadas**

El contenido de proteínas solubles se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) y se expresa como mg de proteína por gramo de peso seco.

La medición de las proteínas oxidadas (carbonilos) se realizó de acuerdo a la técnica descrita en Reznick y Packer (1994). Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente la formación de dinitrofenilhidrazona unida a proteínas a través de la reacción de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPh) y los carbonilos de las proteínas oxidadas. Este compuesto tiene un pico de absorción entre 355 y 390 nm y su coeficiente de extinción es 22.000 M<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>. Las semillas se homogenizaron en una

solución de buffer de fosfato de potasio 50 mM pH 7,6 conteniendo 1 mM EDTA, 1 % (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP), 0,5 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), y 0,2 mM benzamidine EDTA disódico 1 mM. El homogenato se centrifugó 15.000 x g durante 20 min. Se extrajo el sobrenadante el cual se incubó 15 min con 10 % de sulfato de estreptomicina a temperatura ambiente para eliminar restos de DNA los cuales interfieren en el reacción. Nuevamente las muestras fueron centrifugadas 15.000 x g durante 20 min. El sobrenadante fue incubado 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad con 2,4-Dinitrophenylhydrazine 10 mM + HCl 2,5 N. Al cabo de ese tiempo se agregó TCA 20 % y se dejó 10 min en hielo permitiendo así la precipitación de las proteínas. Se centrifugó la muestra (15.000 x g durante 10 min) conservándose esta vez el pellet que es donde se encuentran las proteínas. El pellet se lavó con etanol:acetato de etilo (1:1) hasta que el sobrenadante perdió el color. Por último se disolvió el pellet en clorhidrato de guanidina 6 M. La absorbancia se leyó con un espectrofotómetro a 370 nm.

#### **(15) Malondialdehido (MDA)**

Este compuesto se evalúa por medio de una técnica colorimétrica donde el ácido tiobarbitúrico (TBA) se une al MDA formando una base de Schiff que absorbe a 532 nm (Yagi, 1976).

Con un mortero se homogenizaron las semillas en un buffer fosfato 30 mM pH 7,4 KCl 120 mM y PVP. El homogenizado se centrifugó a 3000 x g 10 min y se descartó el pellet. Paralelamente se preparó un blanco con buffer en vez de muestra. Se tomó una alícuota del sobrenadante a la cual se le agregó BHT 100 mM y TCA al 20 % p/v lo que luego de una incubación de 20 min y una centrifugación produjo la precipitación de las proteínas. El sobrenadante se colocó en tubos hermético y se adicionó TBA 0.7 % . Los tubos tapados se pusieron a baño maría 100° C durante 1 h, pasado ese tiempo, se enfriaron en hielo y se realizó la lectura espectrofotométrica. La concentración se determinó por la ecuación de Hodges y col. (1997).

### **(15) Actividad enzimática**

Cuatro réplicas de las semillas (30 mg) se homogeneizaron con 1,5 ml de *buffer* fosfato de potasio (pH 7,8) conteniendo 1 mM EDTA, 1 % (w/v) de polivinilpirrolidona (PVP), 0,5 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), y benzamidina 0,2 mM . El homogenato se centrifuga a 16.000 g (4° C) durante 30 min y el sobrenadante se utilizó para los ensayos de actividad enzimática. La actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidasa (APX) (EC 1.11.1.11), guayacol peroxidasa (POX) (EC 1.11.1.7), y la catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) se evaluó de acuerdo a Beauchamp y Fridovich (1971), Nakano y Asada (1987), Prochazkova y col. (2001), y Aeibi (1984), respectivamente. La actividad enzimática se expresó como porcentaje de las actividades de las semillas no fotooxidadas.

### **(15) Análisis estadístico**

Todos los resultados los valores corresponden a la media  $\pm$  el desvío estándar (DE). Las diferencias entre tratamientos se determinaron usando el *test* de Tukey con  $P \leq 0.05$

## **Capítulo 3.1**

### **Análisis de semillas fotooxidadas:**

#### **Efectos de la fotooxidación sobre la integridad de las membranas**

##### **INTRODUCCIÓN**

Las semillas ortodoxas típicas presentan longevidades de varios años (Roberts, 1973a). Durante ese tiempo un proceso de envejecimiento se produce muy lentamente, siendo la autooxidación la principal causa (Priestley, 1986; Wilson y McDonald, 1986; McDonald, 1999). Este proceso genera radicales libres (RL) y especies reactivas del oxígeno (ERO) que producen daños a moléculas y membranas y, en consecuencia, las organelas celulares se ven afectadas (Priestley y Leopold, 1983; Priestley, 1986; Wilson y McDonald, 1986; Ponquett y col., 1992). Las semillas de sauce poseen la capacidad de tolerar la desecación a contenidos de agua muy bajos, al igual que las semillas ortodoxas típicas, pero se diferencian de estas últimas en dos aspectos: (1) pierden la viabilidad en unas pocas semanas a temperatura ambiente (Maroder y col., 2000), y (2) las células de los tejidos embrionarios no desdiferencian sus membranas durante el secado de maduración, y los cloroplastos conservan la clorofila manteniendo intacto su sistema de endomembranas (Maroder y col., 2003).

En tejidos verdes y frescos (por ejemplo el parénquima clorofílico de una hoja), la clorofila excitada por la luz puede activar el oxígeno molecular ya sea directamente mediante la transferencia de energía de excitación, formando el oxígeno singlete, o indirectamente por la transferencia de electrones, formando el radical superóxido. Ambos tipos de oxígeno generan RL y ERO y el proceso es definido como una fotooxidación (Asada, 1994; Dalton, 1995; Foyer, 1996). Pocos estudios sobre la activación del oxígeno se han llevado a cabo en tejidos verdes y secos, como lo son los tejidos embrionarios de las semillas de Salicaceae. Aún así, es posible suponer que en estos tejidos la transferencia de electrones no se produce, dado que el fotosistema I no es

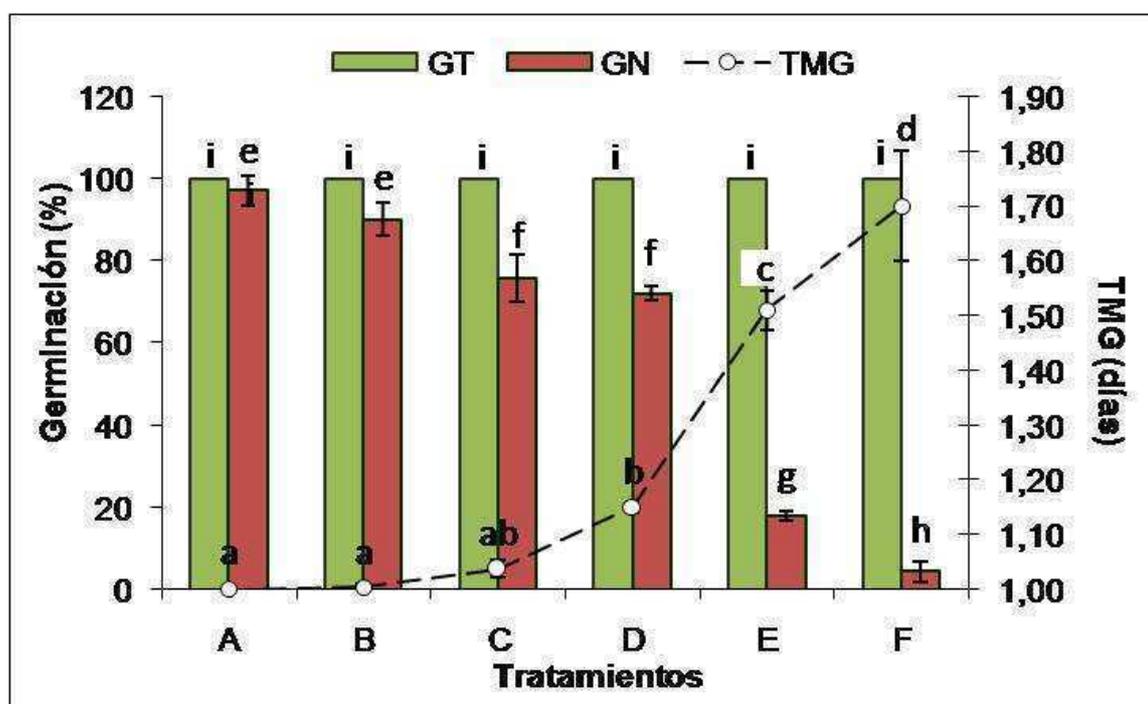
operativo en un estado deshidratado. Sin embargo, es importante destacar que la activación del oxígeno molecular mediante la transferencia de energía, junto con la emisión de luz con mayor longitud de onda y la liberación de calor, constituyen las posibles vías de disipación de energía de activación de luz activados por la clorofila (Golbeck, 1992; Chitnis, 1996).

En este capítulo, se han seleccionados semillas de sauce de la especie *Salix nigra* L. y empleado varios métodos, entre sí complementarios, para estudiar el posible papel de la clorofila en la corta viabilidad que caracteriza a estas semillas. Se propone que los RL y ERO generados por la clorofila activada por la luz producirían, en primer lugar, una intensa peroxidación lipídica en las membranas tilacoides, ya que ahí se encuentran localizados los complejos fotosintéticos conteniendo clorofila. En segundo lugar, el daño oxidativo difundiría a otras membranas y estructuras celulares. En el estado de deshidratación, las defensas moleculares contra estos agentes serían insuficientes y/o apenas eficientes, y las defensas enzimáticas, inactivas (Nandi y col., 1997; Bailly, 2004). Por lo que se conoce, no existen estudios similares en semillas verdes maduras, o en semillas que muestren un deterioro tan rápido. Para probar esta hipótesis, las semillas se envejecieron en diferentes condiciones de intensidades de luz (fotooxidación) y composiciones atmosféricas y la intensidad del daño se determinó mediante las mediciones de germinación normal (GN), germinación total (GT), y tiempo medio de germinación (TMG). La producción de RL se evaluó por espectroscopía de resonancia de espín electrónica (ESR); los cambios en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos, glicolípidos y triglicéridos se analizaron mediante cromatografía gas-líquido (GLC). Con el fin de conocer los efectos sobre la integridad de la membrana, un amplio estudio se llevó a cabo utilizando diferentes métodos como una sonda spin ESR, conductividad eléctrica y microscopía electrónica de transmisión (MET).

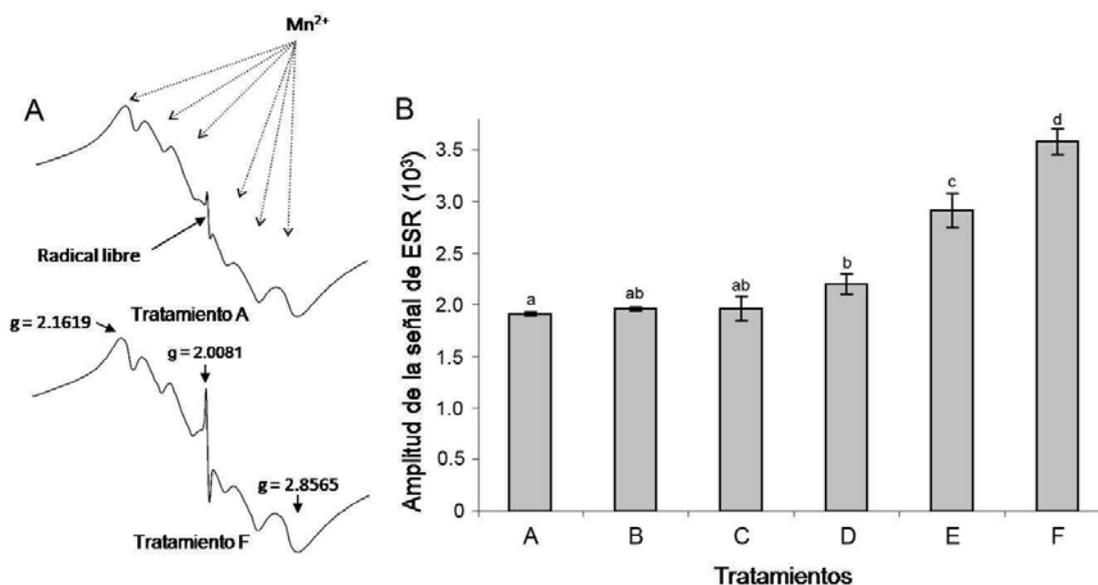
## RESULTADOS

Cuando las semillas fueron fotooxidadas en presencia de luz y oxígeno hubo una disminución en la GN y un aumento de la TMG (Fig. 1).

Los RL fueron detectados tanto en semillas control como en los diferentes tratamientos. Las semillas control, con casi el 100 % de GN (Fig. 1), revelaron una cantidad significativa de RL, aproximadamente 50 % respecto de cantidad presente en las semillas en donde la GN se redujo a casi 0 % (Fig. 2, tratamientos A y F). En estas semillas, el efecto del tratamiento de oscuridad y nitrógeno (tratamiento B) en GN como en RL no fue significativamente diferente al del control. Cuando el tratamiento se llevó a cabo en oscuridad y aire (tratamiento C) sólo hubo una pequeña disminución en la GN, mientras que el nivel de RL se mantuvo sin cambios (Fig. 1 y 2). Sin embargo, en el tratamiento D (luz y nitrógeno), hubo una disminución de la GN, que se asoció con un aumento en el nivel de RL (Fig. 1 y 2). Un incremento aún mayor en los RL fue claramente evidente en las semillas fotooxidadas (tratamientos E y F, Fig. 2) y esto se asoció con una reducción en la GN. En el tratamiento E, la GN se redujo a 18 % (Fig. 1) mientras que con una intensidad de la luz aproximadamente diez veces mayor ( $16,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , tratamiento F) resultó en una gran disminución de la GN, pero no logró reducirla a cero y la GT no se vio afectada (Fig. 1).

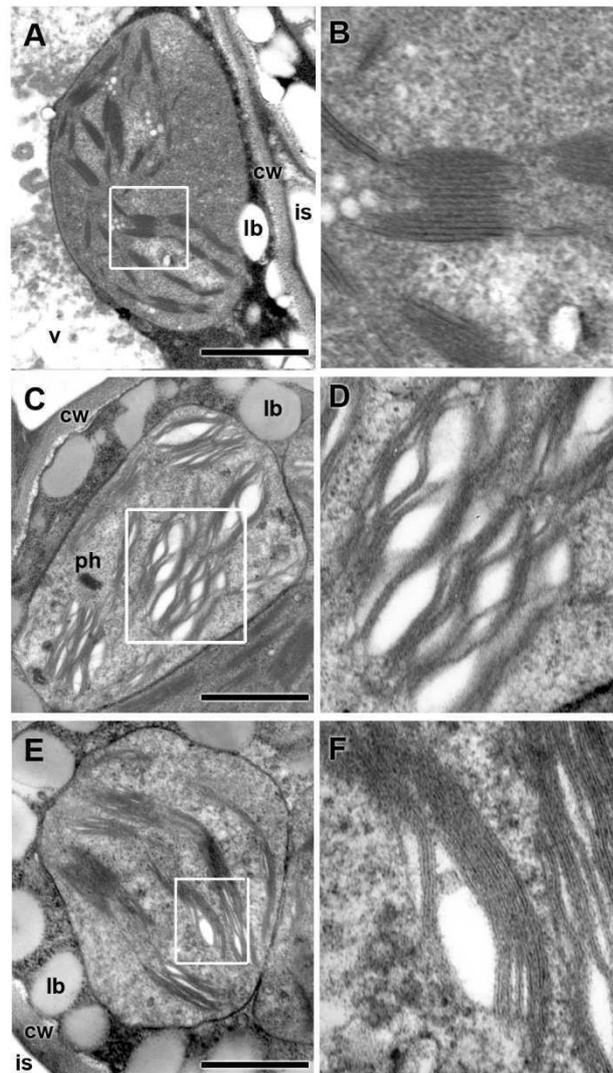


**Figura 1:** Germinación normal (GN), tiempo medio de germinación (TMG) y germinación total (GT) de semillas de *Salix nigra* L. después de 3 días a 45 % HR, 25 °C y diferentes condiciones de almacenamiento: A, control; B, oscuridad y atmósfera de N<sub>2</sub>; C, oscuridad y aire; D, luz ( $1,75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y atmósfera de N<sub>2</sub>, E, luz ( $1,75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y aire; F, luz ( $16,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y aire. Los tratamientos con las mismas letras no varían significativamente en  $P = 0,05$  de acuerdo a la prueba de Tukey.



**Figura 2:** **A**, Espectros de ESR de los tratamientos A y F de la Figura 1. La señal se corresponde con el sexteto de iones naturales de manganeso ( $Mn^{2+}$ ) con valores de  $g$  comprendidos entre 1,8565 y 2,1619. El espectro del radical es una señal con un valor de  $g$  de 2,0081 lo que sugiere que deriva de la quinona (Nandi y col., 1997). **B**, Amplitud de las señales de ESR para los tratamientos A-F (Fig. 1). Los tratamientos con las mismas letras por encima de las columnas no son significativamente diferentes en  $P = 0,05$  de acuerdo a la prueba de Tukey.

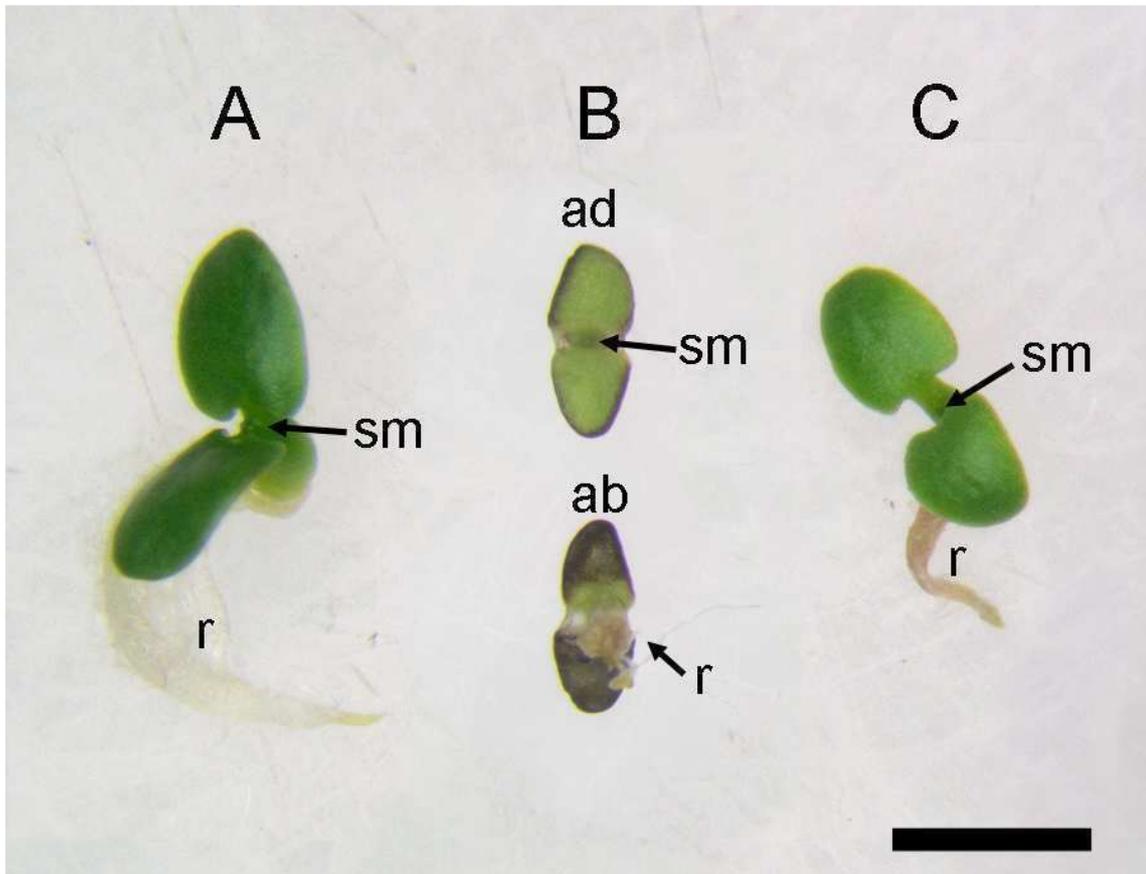
Estudios de MET mostraron que en las semillas expuestas a  $16,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 3 días, los efectos perjudiciales de la luz fueron especialmente evidentes en los tejidos superficiales, es decir, en la epidermis y en las capas subyacentes de parénquima. El daño fue claramente visible en los cloroplastos de las células de estos tejidos, especialmente en las membranas tilacoides (Fig. 3): esencialmente las membranas tilacoides de los granos se separan y por ende los espacios intramembrana se expanden y las membranas pierden su nitidez. Asimismo, se formaron vesículas intergranales (Fig. 3 A-F). En contraste, sólo pequeñas alteraciones se detectaron en los cloroplastos del mesófilo central y adaxial de los cotiledones (Fig. 3 E y F), no observándose daños en los tejidos del eje central y en el meristema apical del brote. En las semillas sometidas a intensidades de luz de  $1,75$  y  $16,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , el contenido de clorofila total se redujo significativamente de  $1373 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  (contenido de clorofila de las semillas control) a  $1113$  y  $890 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 3:** Imágenes de cloroplasto de tejidos embrionarios de semillas de *Salix nigra* L. que muestran los efectos perjudiciales de la luz. Las imágenes fueron obtenidas con MET. **A**, En una semilla no-fotooxidada, cloroplasto de una célula subepidérmica (abaxial) del cotiledón; **B**, detalle de **A**. **C** y **E**, Semilla envejecida durante 3 días a 25 °C y  $16,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ : **C**, cloroplasto de una célula subepidérmica (abaxial); **D**, detalle de **C**; **E**, cloroplastos de una célula del mesófilo central del cotiledón; **F**, detalle **E**. Note las diferencias en las membranas tilacoides entre las células subepidérmicas y las centrales. **Abreviaturas:** **cw**, pared celular; **ie**, espacio intercelular; **lb**, cuerpo lipídico; **ph**, depósito de fitoferritina; **v**, vacuola. **Escala** = 1  $\mu\text{m}$ .

Durante la germinación los daños producidos en las semillas fotooxidadas a  $16,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  se reflejaron en: (a) menor tamaño de las plántulas, (b) radículas subdesarrolladas, y (c) cotiledones de color verde claro con áreas marrón y rojo tanto en su superficie abaxial como en los bordes. Todos estos aspectos han sido tenidos en cuenta en la evaluación de la GN (Fig. 4 A-B). Las semillas envejecidas en la oscuridad

produjeron plántulas de menor tamaño que las que provenían de semillas no-fotooxidadas y sus cotiledones mostraron color verde pálido (Fig. 4 C). Los efectos de luz fueron más débiles en las semillas expuestas a  $1,75 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (datos no mostrados).



**Figura 4:** Plántulas de siete días de *Salix nigra* L. **A**, Plántulas de semilla no-fotooxidada; **B**, plántulas de una semilla envejecida durante 3 días a  $16,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . **C**, plántulas de semillas fotooxidadas en oscuridad durante 3 días a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . **Abreviaturas:** **ab**, plántulas vistas desde abajo (cara abaxial de los cotiledones), **ad**, plántulas vistas desde arriba (superficie adaxial de los cotiledones), **r**, radícula, **sm**, meristema apical. **Escala** = 2 mm.

La luz produjo cambios significativos ( $P = 0,05$ ) en la composición de ácidos grasos. Los cambios más importantes detectados en las semillas expuestas tanto a  $1,75$  y  $16,1 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  correspondieron a los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) derivado de fosfolípidos y glicolípidos, sobre todo estos últimos (Tabla 1). La intensidad de  $1,75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  fue suficiente para producir una gran disminución en los AGPI (Tabla 1). La composición de ácidos grasos de los triglicéridos no fue significativamente ( $P = 0,05$ ) afectada por la luz (Tabla 1).

**Tabla 1.** Efecto de la intensidad de la luz en las composiciones de ácidos grasos de los triglicéridos (TG), fosfolípidos (PL), y glicolípidos (GL) de las semillas de *Salix nigra*

		Composición de ácidos grasos* (%)						
		C14:00	C16:00	C18:00	C18:1w9	C18:2 w6	C18:3 w3	Otros
<b>No-fotooxidada</b>	<b>TG</b>	1,2±0,9	31,5±2,4	4,5±0,4	12,8±1,1	<b>44,6±1,5</b>	<b>4,6±0,2</b>	0,8
	<b>PL</b>	0,1±0,2	30,8±0,3	0,7±1,2	3,6±0,1	<b>55,4±1,6</b>	<b>9,3±0,3</b>	0,1
	<b>GL</b>	0,5±0,5	18,3±1,1	2,2±1,6	4,3±1,2	<b>56,5±2,2</b>	<b>18,2±2,8</b>	ND†
<b>1,75 <math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}</math></b>	<b>TG</b>	1,0±0,4	32,4±2,3	4,8±0,1	13,0±0,3	<b>43,6±0,5</b>	<b>3,8±0,5</b>	1,4
	<b>PL</b>	2,3±1,4	32,3±1,2	5,3±1,4	4,3±0,1	<b>46,3±2,8</b>	<b>6,1±0,9</b>	3,4
	<b>GL</b>	3,0±0,2	32,3±5,6	4,8±0,7	4,1±1,1	<b>38,6±3,4</b>	<b>12,6±0,4</b>	4,6
<b>16,1 <math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}</math></b>	<b>TG</b>	2,0±2,8	33,4±5,7	4,8±1,4	14,0±2,2	<b>40,6±1,2</b>	<b>1,5±2,2</b>	3,7
	<b>PL</b>	3,6±1,9	34,6±0,6	7,2±1,8	7,0±1,0	<b>40,0±0,2</b>	<b>4,0±1,2</b>	3,6
	<b>GL</b>	7,8±1,4	38,2±2,9	5,5±1,1	7,9±2,7	<b>27,4±3,6</b>	<b>7,5±0,8</b>	5,7

Las semillas fueron fotooxidadas por 3 días a 25 °C y dos diferentes intensidades de luz.

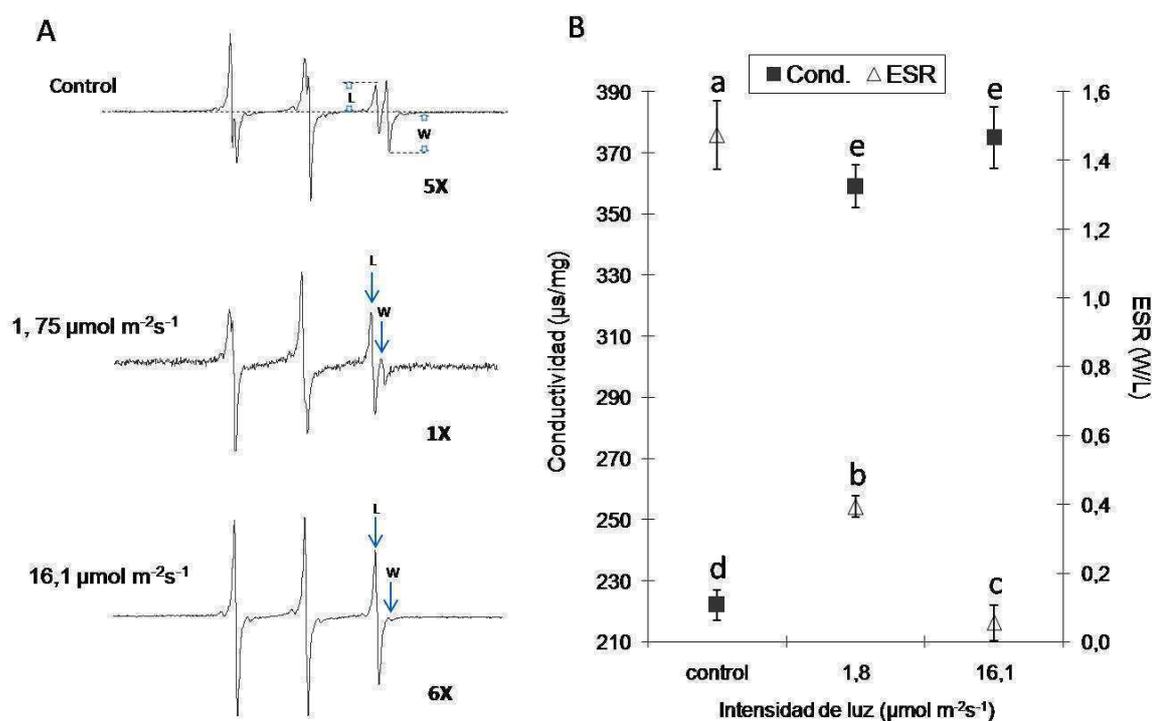
Los valores corresponde a la media  $\pm$  DE ( $n=3$ )

\*Notación de ácidos grasos: C14:00 mirístico; C16:00 palmítico; C18:00 estearico; C18:1w9 oleico; C18:2w6 linoleico; C18:3w3 linolénico.

†ND, no determinado

El daño de la membrana plasmática, evaluado por ESR y conductividad, fue evidente en las semillas fotooxidadas. La Figura 5 A representa los espectros de resonancia paramagnética de Tempone; las señales del lado derecho del espectro representan los componentes L y W correspondientes a la señal de la sonda que se encuentra en las fases hidrofílicas e hidrofóbicas del citoplasma, respectivamente. Estos espectros muestran claramente que, a altas intensidades de luz, la señal W fue prácticamente cero debido a que el agente fue capaz de penetrar la membrana plasmática dañada y anular la señal hidrofílica (Fig. 5 A). La relación W/L, un índice de daño de la membrana plasmática, disminuye de 1,47 a 0,39 con  $1,75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y sólo

un 21 % adicional con  $16,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 6 B). La disminución de la W/ L fue asociada con un aumento en la conductividad (Fig. 6 B).



**Figura 5:** En semillas de *Salix nigra* L., el efecto de la luz sobre la permeabilidad de la membrana fue evaluado tanto por la sonda spin ESR como por la conductividad. Las semillas fueron fotooxidadas durante 3 días a 25 °C y dos diferentes intensidades de luz ( $1,75$  y  $16,1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). **A**, espectros de ESR de la sonda spin Tempone; **B**, gráfico de comparación entre ESR y la conductividad. Los valores corresponden a medias  $\pm$  DE

## DISCUSIÓN

Este estudio apoya la hipótesis que en semillas de *Salix nigra* la luz y el oxígeno promueven fuertes procesos fotooxidativos mediados por ERO y RL. La producción de estos agentes oxidantes está bien documentada para tejidos frescos (Asada, 1994; Dalton, 1995; Foyer, 1996), pero es casi inexistente la información disponible sobre la presencia de estos procesos en los tejidos verdes secos, como los de los embriones de las semillas de sauce. Las semillas no-fotooxidadas, con GN cercanas al 100 % (Fig. 1), contenían 50 % de los RL que estaban presentes en las semillas en las que la GN se redujo a casi 0 % (Fig. 2, tratamientos A y F). Esto sugiere que: (a) esta cantidad de RL no afecta la GN, y (b) durante la imbibición y al principio de la germinación de las semillas control, esta

cantidad de RL podrían ser eliminados y los daños reparados como consecuencia de la respuesta de las defensas moleculares y la activación de las defensas enzimáticas antioxidantes, las cuales según Bailly (2004) operan cuando las semillas se hidratan.

En cuanto al origen de los RL en las semillas control, una hipótesis sostiene que la mayoría de los RL podría haber sido generado por el radical superóxido formado como consecuencia de la desregulación del transporte de electrones de la cadena respiratoria producida durante la deshidratación, lo que naturalmente ocurre en las últimas etapas de desarrollo de las semillas ortodoxas (Vertucci y Farrant, 1995; Bailly, 2004). Dado que estas semillas muestran una alta sensibilidad a la luz, no se puede descartar la posibilidad que los RL podrían haberse formado durante el tiempo transcurrido entre la expulsión de las semillas del fruto y su almacenamiento, aun cuando en el laboratorio donde se manipulaban los frutos y las semillas, la intensidad de la luz siempre se mantuvo en un nivel muy bajo.

La disminución de la GN en el tratamiento C (oscuridad y aire) podría reflejar el daño producido por la reacción del oxígeno con los radicales preexistentes, como lo sugieren Ohlrogge y Kernan (1982) y Justin y Bass (1978), sobre todo teniendo en cuenta que las semillas fueron tratadas durante 3 días a 25 °C, una temperatura propicia para la autooxidación (Maroder y col., 2000). De acuerdo con Benson (1990), la disminución de la GN producida en el tratamiento D (luz y nitrógeno) puede ser atribuida a la clorofila activada por la luz la cual reacciona directamente con el sustrato para formar RL, excluyendo al oxígeno de la reacción. Sin embargo, la formación de oxi-radicales no es del todo imposible, ya que la sustitución del oxígeno por parte del nitrógeno podría haber sido parcial. Un aumento en la acción de deterioro de los RL se demostró claramente con la presencia de la luz y el aire (tratamientos E y F; Fig. 1). Esto sugiere que un fuerte proceso fotooxidativo ocurrió a pesar de la baja intensidad de luz (tratamiento E), que redujo la GN a valores muy bajos. Dado que estas semillas tienen un tegumento fino y transparente (Maroder y col., 2003), el ataque de los RL inducido por la luz en presencia de oxígeno comenzó en los tejidos superficiales del embrión, que son los del lado abaxial de los cotiledones y los del ápice de la raíz. Estos tejidos fueron los más dañados en estas condiciones (Fig. 3 y 4). Durante la germinación, el daño producido en las semillas se

manifestó como un desarrollo anormal de las raíces y los cotiledones, resultando en irregularidades en el tamaño y el color de los últimos, aspectos considerados en la evaluación de la GN. Se pudo comprobar que el daño oxidativo se extiende desde el exterior a los tejidos más internos de tal manera que el meristema apical del brote se mantiene protegido, lo que retrasó la disminución de la GT (comienzo de la mortalidad de las semillas). En el momento en que la GT se vio afectada por el daño, la GN ya se había reducido a cero, es decir, la disminución de los parámetros se produjo de forma independiente. En las semillas ortodoxas típicas, las cuales no son susceptibles a la luz (debido a la ausencia de clorofila), el proceso de autooxidación se produce de forma simultánea en todos los tejidos con sólo una leve variación en la intensidad, lo que resulta en una disminución casi simultánea de los dos parámetros (GT y GN) y, en consecuencia, las curvas de disminución se superponen (Ellis y Roberts, 1981). Esta interpretación de los resultados, basados en un proceso de oxidación que se inicia en los tejidos exteriores y que se extiende hacia el interior, también podría explicar la causa por la cual, como se ve en la Figura 1, una intensidad de luz de  $1,75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  reduce a 20 % la GN, mientras que una intensidad aproximadamente diez veces mayor, no sólo no reduce la GN a cero, sino que tampoco afecta la GT (Fig.1). Del mismo modo una intensidad de luz de  $16,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  dañó los tejidos externos de los embriones hasta tal punto de destruir la clorofila y reducir la penetración de la luz y la capacidad que tienen los tejidos de fotoactivarse. Esto demuestra que no habría ninguna relación entre la intensidad de la luz, la presencia de los RL y su efecto sobre la GN. Esta interpretación del proceso fotooxidativo ocurrido en estas semillas es apoyada por una disminución en el contenido de clorofila, el estudio de MET y las observaciones de las plántulas (Fig. 3 y 4, respectivamente). Asimismo, estos estudios demostraron que las partes más externas de la semilla, es decir, la superficie abaxial de los cotiledones y la radícula (caliptra y meristema apical de la raíz), son las más expuestas a la acción perjudicial de la luz y por lo tanto, las más afectadas y también que los tejidos más internos, es decir, la superficie adaxial de los cotiledones (epidermis adaxial y mesófilo subyacente), la parte central del eje, y el meristema apical del brote, no fueron prácticamente afectados. Esto explica porque la GT no mostró cambios a los 3 días (Fig. 1).

Un indicador metabólico estrechamente asociado con el deterioro de los RL sobre los lípidos es la peroxidación (Wilson y McDonald, 1986). Dado que los AGPI (importantes componentes de la membrana de lípidos) son los más fácilmente oxidables, una mayor reducción de éstos en la fracción lipídica proporciona evidencias de este proceso (Wilson y McDonald, 1986). En este estudio, la peroxidación no se evaluó utilizando el malondialdehído (MDA), ya que la cantidad de ácido linolénico (de la cual deriva el MDA) fue baja, por lo que la determinación de los cambios en AGPI por GLC resultó un mejor indicador de la peroxidación (Tabla 1). En este sentido, Chiu y col. (1995) no consideran la determinación del MDA un método apropiado cuando el contenido de ácido linolénico es bajo.

Las observaciones utilizando MET revelaron daños causados por la luz en las membranas tilacoides. A partir de allí, los estudios se concentraron en los cambios en la composición de los ácidos grasos de los glicolípidos, principal componente de las membranas tilacoides, que se encuentran exclusivamente en los cloroplastos (Wintermans, 1960; Shibuya y col., 1965). La fuerte disminución en la fracción glicolipídica de los AGPI (Tabla 1) apuntó a las membranas tilacoides como un blanco potencial de la peroxidación debido seguramente a la íntima relación entre los AGPI y la clorofila contenida en los receptores de la luz (Halliwell y Gutteridge, 1999). En este sentido, las membranas tilacoides serían el primer blanco de ataque del oxígeno activado, lo que lleva a la peroxidación de los ácidos grasos de las membranas. Los RL y ERO podrían extender el daño oxidativo a otras membranas lo que es consistente con la disminución de los AGPI correspondiente a la fracción fosfolipídica (Tabla 1), un componente distintivo de membranas (Pukacka y Kuiper, 1988; Corbineau y col., 2002).

El significativo daño inducido por la baja intensidad de luz y mediado por RL sugiere que una gran cantidad de moléculas de clorofila activa están involucradas en ese proceso. En cotiledones de semillas secas de arveja, Vertucci y col. (1985) encontraron que la cantidad de energía transferida a la clorofila desde otros pigmentos captadores de luz es limitada. Sin embargo, en las semillas de *Salix nigra* el fuerte proceso de fotooxidación que se produce se podría explicar, al menos en parte, por su alto contenido de clorofila. De hecho, la cantidad de clorofila en las semillas de *Salix nigra* es

aproximadamente diez veces mayor que en los cotiledones de la arveja (Cheng y col., 2004).

Por otra parte, los daños en el plasmalema evaluados por los cambios en su permeabilidad, corresponden a una disminución de los AGPI. En semillas sometidas al secado, Leprince y col. (1999) encontraron que el ESR es un indicador más sensible y preciso que la conductividad eléctrica cuando se trata de evaluar la integridad de las membranas. Sin embargo, en el presente caso ambos métodos estrechamente correlacionan entre sí (Fig. 5).

De acuerdo con Smith y Berjak (1995), la MET puede detectar los cambios producidos en las membranas de las células meristemáticas del ápice radicular (como la separación de la membrana plasmática de la pared celular) cuando las semillas son embebidas. El presente estudio también reveló una separación incipiente de la membrana plasmática de las paredes celulares, que en estado seco y debido al proceso de fotooxidación intenso, podría causar graves daños en los tejidos embrionarios (Fig. 3). Vale la pena mencionar que la separación de la membrana plasmática de la pared celular se detectó en las semillas secas.

En conclusión, los resultados de diferentes tratamientos de luz revelaron que el aumento de la intensidad de la luz fue acompañada por la formación de RL, dando lugar a una disminución de los AGPI. Este último se asoció con un daño significativo en las membranas tilacoides y una alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, todo lo cual constituye una secuencia de procesos estrechamente vinculados que se ve reflejada en la disminución de la GN. Estos resultados contrastan con los observados en *Tortula ruraliformis* (Seel y col., 1991), una especie de musgo que contiene clorofila y que tolera la desecación, y, por tanto, en estas características similar a las semillas de sauce aquí estudiadas. Sin embargo, en esta especie de musgo la acción de la luz produce RL sin causar daños. Esta diferencia puede atribuirse al alto nivel de las defensas moleculares antioxidantes, que en estado seco, protegen los tejidos.

## Capítulo 3.2

### Análisis de semillas fotooxidadas:

#### Fluctuación de indicadores de estrés oxidativo durante el *Priming*

##### INTRODUCCIÓN

Una de las formas de revertir los daños ocasionados por las ERO, es la de someter las semillas a tratamientos de *priming* (Burgass y Powell, 1984, Dell’Aquila y Spada, 1992). Este tratamiento consiste en la hidratación parcial de la semilla, la cual mantiene el contenido de agua (ca) en valores que resultan insuficientes para que se inicie la división y elongación celular en el meristema apical de la raíz (inicio de la germinación). Sin embargo, esta hidratación parcial permite que operen procesos pregerminativos de reparación de los daños ocurridos durante la última etapa de secado de la semilla como los propios del envejecimiento, entre los que se incluyen los ocasionados por ERO. Evitar que se alcance ese valor de contenido de agua que permite el inicio de la germinación equivale entonces a prolongar el lapso en que actúan esos mecanismos y así mejorar la calidad fisiológica de la semilla (Bradford, 1986; Chojnowski y col., 1997; Taylor y col., 1998). Un método usado para controlar el nivel de hidratación es mantener las semillas embebidas en una solución osmótica de polietilenglicol (PEG). Si bien las semillas maduras poseen defensas contra las ERO, tanto moleculares como enzimáticas, estas últimas en el estado deshidratado no serían operativas, recuperando su actividad durante la imbibición de la semilla al principio del proceso germinativo (Bailly, 2004). Las principales enzimas que cumplen esta función son la superóxido dismutasa (SOD) y las peroxidases, entre las que se encuentra la catalasa (CAT), la ascorbato peroxidasa (APX) y la guayacol peroxidasa (POX), esta última específica de plantas. Cabe destacar que las ERO, a pesar de los efectos nocivos durante el almacenamiento de la semilla, juegan un papel vital en la germinación, facilitando entre otras cosas la elongación celular (Passardi y col., 2004; 2006).

De acuerdo a Maroder y col. (2000), si las semillas de *S. alba* y *S. matsudana* se someten a una atmósfera controlada de humedad (100 % humedad relativa) y periódicamente se toman muestras para testear la germinación se comprueba que a medida que aumenta el contenido de agua en los tejidos, primeramente ocurre un descenso del porcentaje de la germinación normal (GN) que posteriormente es seguido por un ascenso de la misma (Maroder y col., 2000). Esta fluctuación es difícil de explicar ya que en la abundante literatura donde se utilizó el *priming* en diferentes especies con el fin de mejorar el comportamiento de la germinación, no se ha hecho mención de las posibles fluctuaciones en la GN o de otro tipo de comportamiento de la germinación en las primeras horas de imbibición. Si se descarta la posibilidad que ocurran daños por imbibición (Maroder y col., 2000), el efecto positivo podría ser explicado por la humidificación al 100 % de humedad relativa (HR), ya que resulta en un proceso de hidratación lento que al mismo tiempo que retrasa el inicio de la división celular, prolonga el tiempo durante el cual actúan los procesos de reparación celular (*priming*). Esto podría explicar la razón por la cual el porcentaje de GN en las semillas sometidas a *priming* es mayor al del control. Es posible inferir que la fluctuación de la GN podría ser reflejo de una similar fluctuación en la relación ataque oxidativo/defensa antioxidante. Al respecto cabe mencionar que uno de los primeros procesos bioquímicos que ocurren al comienzo de la imbibición de una semilla es el estallido oxidativo, (Boveris y col., 1984) lo que podría sugerir que el mismo se reflejase en el descenso de la GN. Una significativa contribución en cuanto a la identificación de las ERO que intervienen en este proceso la realizaron Chen y col. (2002) quienes observaron un aumento importante en la producción de oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) durante los primeros momentos de la imbibición en granos de arroz. Recientemente Kranner y col. (2010) demostraron que durante los primeros 30 min de imbibición de las semillas de arveja ocurre un considerable y transitorio aumento del radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) y del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Si un evento oxidativo similar también ocurriese en las semillas de sauce probablemente resultaría más intenso debido al alto nivel basal de ERO en semillas secas (ver capítulo 3.1). Por otra parte el hecho que en las semillas hidratadas los procesos oxidativos coexistan con una actividad antioxidante que los regula, reforzaría la suposición de que no solo el descenso inicial de la GN sino además su posterior

recuperación son reflejos de una fluctuación similar de la relación ataque oxidativo/defensa antioxidante.

El objetivo en este capítulo es verificar en qué medida la fluctuación de la GN y la relación ataque oxidativo-defensa antioxidante están relacionados entre sí.

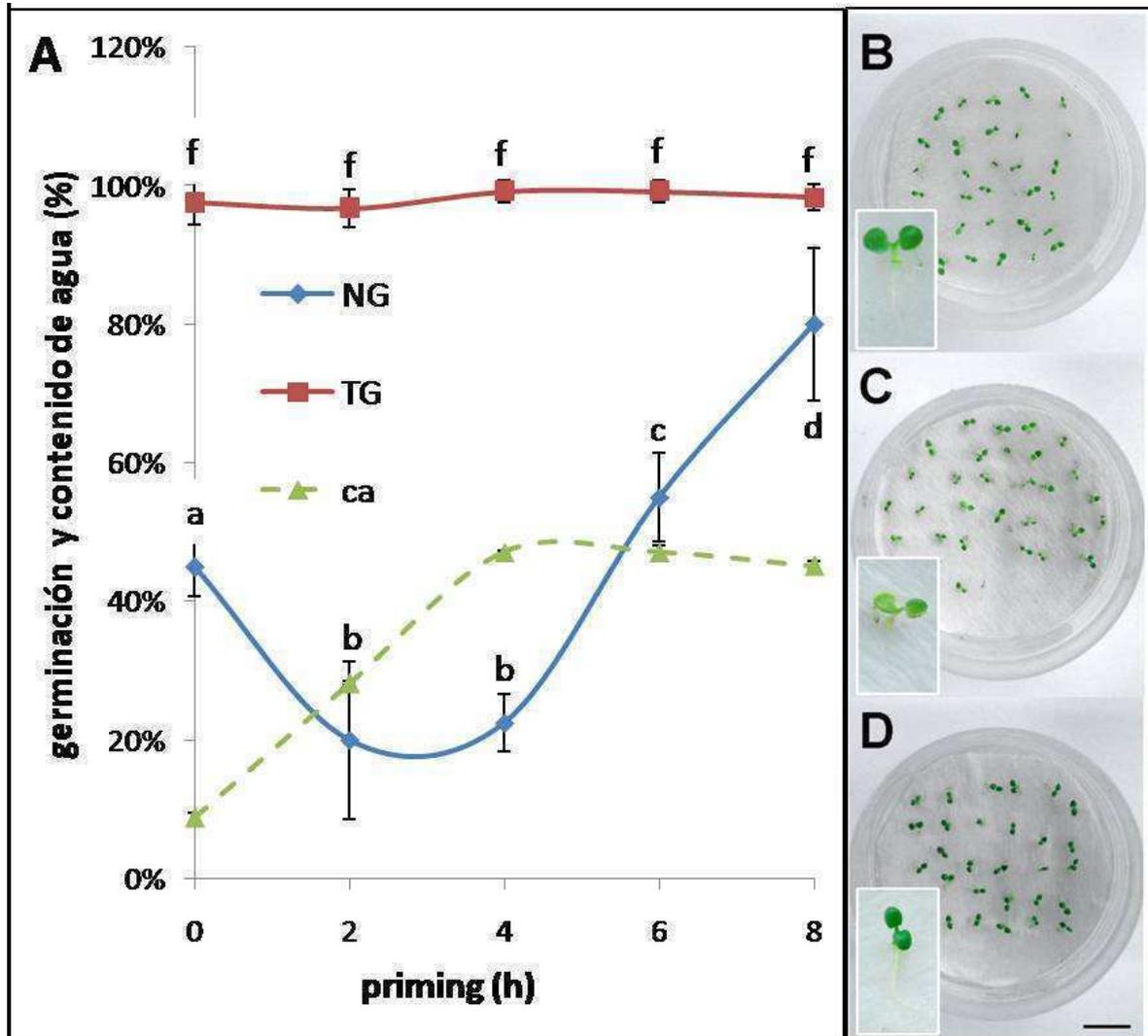
Para tal fin se utilizaron lotes de semillas de *Salix nigra* fotooxidadas y posteriormente sometidas a diferentes tiempos de hidratación controlada (*priming*). Se investigó la producción de RL (radicales libres) y ERO por espectroscopía de resonancia de espín electrónico (Electronic Spin Resonance Spectroscopy-ESR), quimioluminiscencia, espectofotometría y mediante técnicas histoquímicas y citoquímicas. Tres indicadores de daños moleculares fueron monitoreados: peroxidación lipídica, destrucción de pigmentos y oxidación de proteínas; se evaluó también la integridad de las membranas por una sonda de espín electrónico. La actividad antioxidante se evaluó mediante los cambios en las enzimas SOD, CAT, APX y POX. Estos ensayos fueron acompañados por la determinación de la germinación normal (GN). Estudios previos han demostrado que las semillas de *Salix nigra* tienen un comportamiento y características similares a las de *S. alba* y *S. matsudana*, ambas especies utilizadas en trabajos anteriores por lo que las conclusiones de este estudio podrían ser hipotéticamente propuestas como características del género *Salix*.

## RESULTADOS

### Germinación Normal

Semillas de *Salix nigra* con un 95% GN fueron fotooxidadas ( $2 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) durante 3 d y posteriormente sometidas a diferentes tiempos de priming. El efecto del priming sobre la GN se evaluó a los 7 días de germinación. Previo al tratamiento de priming presentaron una disminución del 50 % en la GN con respecto a las no-fotooxidadas (datos no mostrados) exhibiendo clorosis incipiente en sus cotiledones (Fig. 1A, B). Durante las primeras dos horas del tratamiento, la GN se redujo al 20% y la mayoría de los cotiledones cambió su color de verde a verde-amarillento (Fig. 1A, C).

Después de 8 h de priming el porcentaje de GN mostró una recuperación (alrededor del 80 %) y los cotiledones se recuperaron el color verde de las plántulas no fotooxidadas (Fig. 1A, D).



**Figura 1.** A, Efecto del tratamiento de *priming* (-1,55 MPa) sobre la germinación (%) de semillas de *Salix nigra* fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Los valores corresponden a la media  $\pm$  DE ( $n = 4$ ). B-D, Germinación en placas de Petri de semillas fotooxidadas sin *priming* (B), y previamente sometidas a *priming* durante 2 h (C) y 8 h (D). **Abreviaturas:** GN, germinación normal; GT, germinación total; ca contenido de agua. **Escala:** 1 cm. Los datos designados con la misma letra no difieren significativamente en  $P \leq 0,05$ .

### Quimioluminiscencia

La quimioluminiscencia mide los fotones producidos durante las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica (Flecha y col., 1991). Según se muestra en la Tabla 1 y

al igual que lo observado en RLE los valores de quimioluminiscencia aumentaron considerablemente (75 %) en semillas fotooxidadas. Durante el *priming*, con el incremento del contenido de agua (ca) se produjo primeramente un aumento de la luminiscencia seguido por una disminución de la misma (Tabla 1), coincidiendo con el descenso inicial de la GN y la posterior recuperación (Fig. 1).

**Tabla 1.** Efecto del tiempo de *priming* en la variación de quimioluminiscencia en semillas de *Salix nigra* fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Tratamiento	Quimioluminiscencia (cpm) $10^3$
No-fotooxidadas	$24,6 \pm 1,3^a$
Fotooxidadas	$41,6 \pm 2,4^b$
Fotooxidadas + 2 h <i>priming</i>	$49,2 \pm 1,8^c$
Fotooxidadas + 4 h <i>priming</i>	$39,4 \pm 3,1^b$
Fotooxidadas+ 6 h <i>priming</i>	$33,2 \pm 0,9^d$
Fotooxidadas + 8 h <i>priming</i>	$35,3 \pm 3,2^d$

Los datos designados con la misma letra no difieren significativamente en  $P \leq 0,05$ . Los valores corresponden a la media  $\pm$  DE (n=4).

### Producción de ERO

Kranner y col. (2010) determinan que las principales ERO responsables del golpe oxidativo al comienzo de la imbibición de semillas de arveja son el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para establecer la implicancia que tienen estas ERO en el aumento de la quimioluminiscencia y por consiguiente en la eventual disminución inicial de la GN, se cuantificó la generación del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  mediante la sonda **XTT** como así también la localización del mismo por medio del precipitado que forma con la sonda NBT. Estas sondas presentan una gran similitud ya que ambas son compuestos del tetrazolio, el cual en presencia del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  se reduce formando productos coloreados (formazan). Ambas técnicas se complementan, y la diferencia entre ellas radica en que el XTT, al ser soluble, permite que el radical sea cuantificado espectrofotométricamente mientras que el NBT en presencia del radical produce un precipitado insoluble que permite su localización *in situ*.

### *Cuantificación de $O_2^{\cdot-}$*

La Tabla 2 muestra la cuantificación del  $O_2^{\cdot-}$  en semillas embebidas en presencia de diferentes atrapadores de ERO e inhibidores enzimáticos. La comparación del nivel de daño fotooxidativo bajo distintas intensidades de luz con la producción del  $O_2^{\cdot-}$  (Tabla 2), muestra que existe una correlación negativa entre éste y la disminución de la GN. Cuando se produce una disminución de la generación del  $O_2^{\cdot-}$  tanto por efecto del  $MnCl_2$  (atrapador del  $O_2^{\cdot-}$ ) como del  $ZnSO_4$  (inhibidor de NAD(P)H oxidasa, responsable de la reducción del  $O_2$  a  $O_2^{\cdot-}$ ) la GN aumenta. Por el contrario, cuando la generación del  $O_2^{\cdot-}$  aumenta por efecto del KCN (inhibidor de las peroxidasa y también de la SOD) la GN disminuye (Tabla 2). Por otra parte ni el DMSO (atrapador de  $\cdot HO$ ) y ni el DMTU (atrapador de  $H_2O_2$ ) mostraron algún efecto significativo ( $P \leq 0,05$ ) en la producción del  $O_2^{\cdot-}$  y la GN (Tabla 2). La producción del  $O_2^{\cdot-}$  no resultó afectada por  $NaN_3$  mientras que sí se produjo un importante descenso de la GN. Esto puede atribuirse a algún efecto tóxico de  $NaN_3$  debido a que además de su efecto como atrapador de  $H_2O_2$  presenta múltiples funciones en las células como la de inhibir la producción de ATP (Muneyuki y col., 1993).

Cabe mencionar que la GN de las semillas no-fotooxidadas no resultó afectada por ninguno de los diferentes atrapadores de ERO ni por los inhibidores de SOD (datos no mostrados).

**Tabla 2.** Efecto de atrapadores de  $O_2^{\cdot -}$  ( $MnCl_2$ ),  $\cdot HO$  (DMSO),  $H_2O_2$  (DMTU) e inhibidores de NAD(P)H oxidasa ( $ZnSO_4$ ) o peroxidasa (KCN y  $NaN_3$ ) sobre la GN y la liberación de  $O_2^{\cdot -}$  durante los primeros 45 min de imbibición de semillas de *Salix nigra* fotooxidadas a dos intensidades de luz (**2 y 10  $\mu mol m^{-2} s^{-1}$** ).

Tratamiento de las semillas	GN (%)	Liberación de $O_2^{\cdot -}$ ( $\mu mol g^{-1} PS$ )
No-fotooxidadas	92 ± 8 <sup>a</sup>	63 ± 5 <sup>a</sup>
Fotooxidadas 10 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$	14 ± 2 <sup>b</sup>	92 ± 6 <sup>b</sup>
Fotooxidadas 2 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$	<b>39 ± 5 (100 %)<sup>c</sup></b>	<b>78 ± 6 (100%)<sup>c</sup></b>
Fotooxidadas 2 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ + $MnCl_2$ (12 mM)	54 ± 5 (140 %) <sup>d</sup>	53 ± 4 (69 %) <sup>ad</sup>
Fotooxidadas 10 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ + $ZnSO_4$ (10 mM)	53 ± 7 (137 %) <sup>d</sup>	45 ± 3 (58 %) <sup>d</sup>
Fotooxidadas 2 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ + KCN (1 mM)	22 ± 13 (57 %) <sup>b</sup>	117 ± 9 (151 %) <sup>e</sup>
Fotooxidadas 2 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ + DMSO (0,45 %)	47 ± 6 (120 %) <sup>cd</sup>	72 ± 9 (93 %) <sup>ac</sup>
Fotooxidadas 2 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ + DMTU (15 mM)	43 ± 7 (111 %) <sup>c</sup>	74 ± 6 (96 %) <sup>ac</sup>
Fotooxidadas 2 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ + $NaN_3$ (10 mM)	17 ± 9 (43 %) <sup>b</sup>	83 ± 4 (107 %) <sup>bc</sup>

Los datos designados con la misma letra no difieren significativamente en  $P \leq 0,05$ . Los valores corresponden a la media ± DE (n=3)

### Localización

En presencia del  $O_2^{\cdot -}$ , el NBT se reduce formando un producto coloreado insoluble que permite visualizarlo. Después de 1 h de imbibición, la presencia del radical pudo detectarse en la radícula del embrión y en la región basal del hipocótilo (Fig. 2), donde se originan los primeros pelos radicales (Polya, 1961). La coloración en la radícula resultó más intensa en las semillas no-fotooxidadas (Fig. 2). En los cotiledones, en cambio, se observó una mayor formación del radical con el incremento de la fotooxidación, no visualizándose coloración en los cotiledones de las semillas no-fotooxidadas (Fig. 2 a-c). En los cotiledones de las semillas en las que la fotooxidación ha sido menor, el radical localizó sólo en los bordes (Fig. 2 b) mientras que en las semillas con mayor fotooxidación alcanzó toda la superficie del cotiledón (Fig. 2 c). Cuando las semillas fotooxidadas a 2

$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  son incubadas en presencia de un atrapador del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ( $\text{MnCl}_2$ ) la coloración prácticamente desaparece (Fig. 2 d) lo que confirma la especificidad de la sonda.

La localización de la sonda en la radícula se debe a que el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  juega un rol esencial en la regulación del crecimiento de la raíz (Causin y col., 2008). En las semillas no-fotooxidadas la radícula se tiñe más intensamente lo cual se relaciona con el mayor vigor germinativo que las mismas presentan.

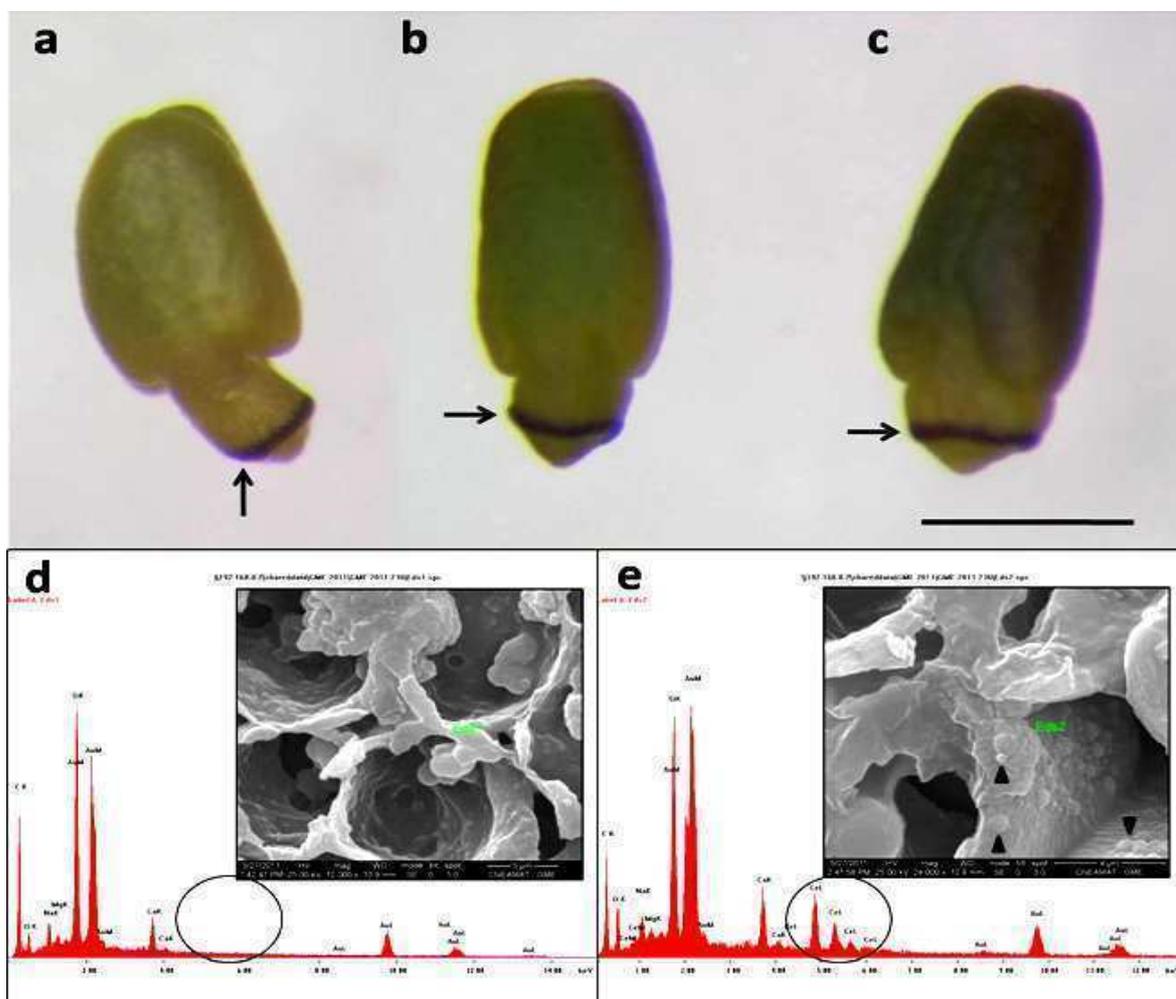


**Figura 2.** Localización de la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  mediante NBT durante la primera hora de imbibición. Los diferentes tratamientos corresponden a: **a**, semillas no-fotooxidadas; **b**, semillas fotooxidadas a  $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; **c**, semillas fotooxidadas a  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; **d**, semillas fotooxidadas a  $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  + un secuestrante de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ( $\text{MnCl}_2$ ). Las **flechas** indican la formación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  mediante el depósito de formazán. **Escala:** 0,5 mm.

En igual lapso (1 h) la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue localizada en los niveles tisular y subcelular mediante DAB y  $\text{CeCl}_3$  respectivamente (Fig. 3). Ambas técnicas no mostraron diferencias aparentes entre los tratamientos. En la reacción con DAB el precipitado marrón típico de la misma fue localizado en la base del hipocótilo, donde se sitúan las células que van a dar origen a los primeros pelos absorbentes (Fig. 3 a-c). La reacción con  $\text{CeCl}_3$  no reveló la presencia de dicho agente oxidante en ninguno de los tejidos del embrión (Fig. 3 d).

Para descartar que la ausencia de detección del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los diferentes tratamientos pudiera ser atribuida a una baja sensibilidad de la técnica, las semillas se

embebieron en presencia de un inhibidor de peroxidasa (KCN) observándose depósitos de Ce en el apoplasto de los tejidos subepidérmicos (Fig. 3 e).

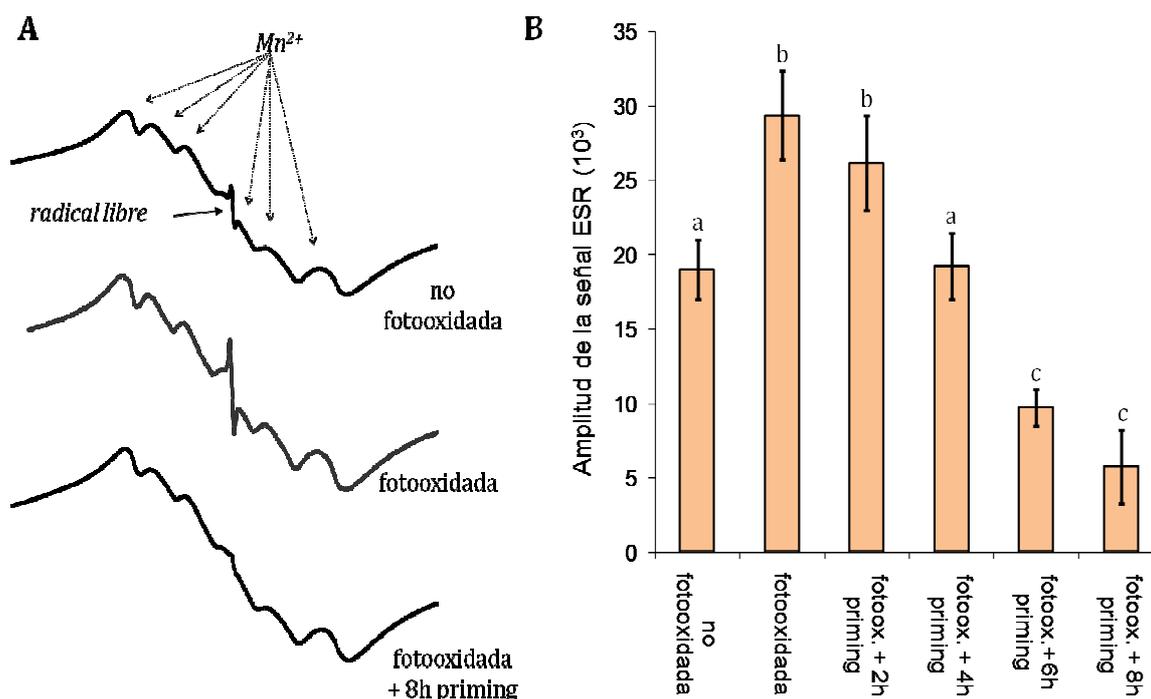


**Figura 3.** Localización de la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante DAB (a-c) y  $\text{CeCl}_3$  (d-e). **a**, semillas no-fotooxidadas; **b**, semillas fotooxidadas  $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; **c**, semillas fotooxidadas  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Las **flechas** indican la formación del precipitado. **d y e**: Análisis de ESEM y EDAX de semillas fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ): en **d** las semillas fueron embebidas en una solución  $5 \text{ mM CeCl}_3$  durante 1 h. El  $\text{CeCl}_3$  en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  forma  $(\text{Ce}[\text{OH}]_2\text{OOH})$  el cual precipita; en **e**, las muestras fueron tratadas similar a **d** con el agregado de  $1 \text{ mM KCN}$  (inhibidor de peroxidasa) a la solución de  $\text{CeCl}_3$  (control positivo). Se observaron precipitados de cerio en el apoplasto de algunas células. **Escala:**  $500 \mu\text{m}$  (a-c) and  $5 \mu\text{m}$  (d-e).

### Radicales Libres Estables (RLE)

La Figura 4 A muestra los espectros de ESR de las semillas de sauce no-fotooxidadas, fotooxidadas, y fotooxidadas y posteriormente humidificadas durante 8 h.

El espectro está representado por una señal central con un valor  $G = 2,0078$  sugiriendo que es un RLE aparentemente derivado de la semiquinona, y una señal sexteto correspondiente al ion manganeso ( $Mn^{2+}$ ) con valores de  $G$  que se extiende entre 1,8567 y 2,1621 (Nandi y col., 1997). Los RLE aumentaron aproximadamente un 50 % durante la fotooxidación observándose posteriormente una disminución abrupta de los mismos cuando las semillas fueron sometidas a 8 h de *priming*, llevando a valores inferiores al 70 % con respecto a las no-fotooxidadas (Fig. 4 B).



**Figura 4.** Efecto del *priming* sobre la concentración de radicales libres en semillas de *Salix nigra* fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). **A**, espectros de RLE de los diferentes tratamientos. La señal de sexteto corresponde a los iones naturales de manganeso ( $Mn^{2+}$ ) con valores de  $G$  que se extienden entre 1,8567 y 2,1621. El valor  $G$  de 2.0078 sugiere que es un radical aparentemente derivado de una semiquinona. **B**, promedios de las amplitudes de RLE de las semillas no-fotooxidadas, fotooxidadas y fotooxidadas posteriormente sometidas a diferentes tiempos de *priming*. Los tratamientos ( $n = 4$ ) con la misma letra minúscula encima de las columnas no son significativamente diferentes en  $P \leq 0,05$ .

## Pigmentos

Los resultados presentados en la Tabla 3 muestran que se produjo una disminución del 20 % de la clorofila total (clorofila  $\alpha$  + clorofila  $\beta$ ) y una similar

disminución en los carotenos en las semillas fotooxidadas. Una vez sometidas a *priming*, las semillas mostraron una reducción en el contenido de clorofila y carotenos a las 2 h, seguida de una recuperación significativa de todos los pigmentos, alcanzando valores similares a los de las semillas no-fotooxidadas.

**Tabla 3.** Efecto del *priming* en el contenido de clorofila y carotenos en semillas de *Salix nigra* fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Tratamiento	clorofila total	carotenos
	(mg 100g <sup>-1</sup> FW)	
No-fotooxidadas	1374±22 <sup>a</sup>	373±10 <sup>f</sup>
Fotooxidadas	1114±17 <sup>b</sup>	301±9 <sup>g</sup>
Fotooxidadas + 2 h <i>priming</i>	807±9 <sup>c</sup>	257±5 <sup>h</sup>
Fotooxidadas+ 6 h <i>priming</i>	1201±5 <sup>d</sup>	303±6 <sup>g</sup>
Fotooxidadas + 8 h <i>priming</i>	1376±8 <sup>e</sup>	375±9 <sup>i</sup>

Los datos designados con la misma letra no difieren significativamente en  $P \leq 0,05$ . Los valores corresponden a la media  $\pm$  DE (n=5).

### Peroxidación Lipídica

Un indicador sensible del proceso de peroxidación lipídica está dado por los cambios que ocurren en los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (Wilson y McDonald, 1986). La Tabla 4 muestra el perfil de ácidos grasos extraídos de la semilla no-fotooxidadas, fotooxidadas, y fotooxidadas y embebidas durante 8 h. La fotooxidación resultó en una marcada disminución del ácido linoleico y linolénico, en menor medida para el último, así como un ligero aumento en el porcentaje de la mayoría de los ácidos grasos saturados. El perfil de ácidos grasos de semillas sometidas a *priming* reveló valores similares a los de semillas no-fotooxidadas, a excepción del ácido linoleico, cuyo porcentaje fue mayor.

Otra metodología ampliamente usada como indicador de peroxidación lipídica es la cuantificación de malondialdehído (MDA) (Wilson y McDonald, 1986). La Tabla 5 muestra un aumento del 20 % aproximadamente de este aldehído en semillas fotooxidadas. Este incremento se revirtió por completo cuando las semillas se sometieron

a *priming* durante 8 h, con un aumento temporal visible en 2 h coincidiendo con la disminución de la GN.

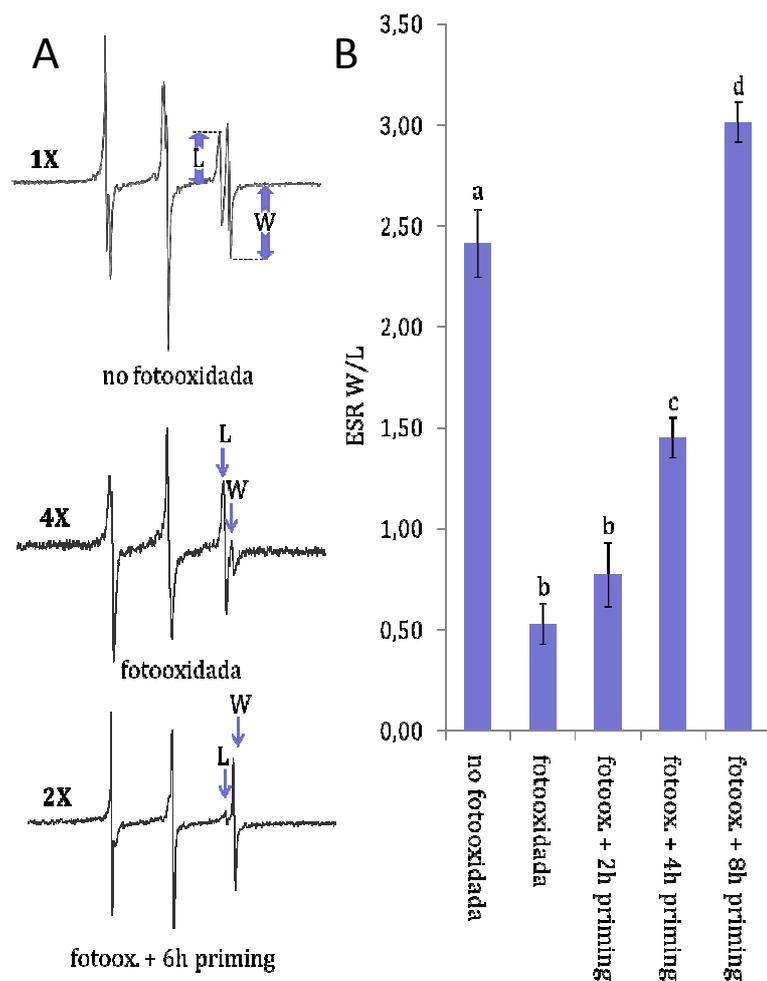
**Tabla 4.** Efecto del *priming* en la composición de ácidos grasos en semillas de *Salix nigra* fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

ácidos grasos	Composición de ácidos grasos (%)		
	no-fotooxidadas	Fotooxidadas	Fotooxidadas + 8 h <i>priming</i>
<b>C16:0</b>	42,4 ± 4,3	48,4 ± 2,1	40,9 ± 2,5
<b>C18:00</b>	5,7 ± 1,2	6,8 ± 2,1	5,3 ± 0,2
<b>C18:1 w9</b>	9,9 ± 2,0	10,1 ± 2,6	9,5 ± 0,9
<b>C18:2 w6</b>	25,0 ± 1,0	16,9 ± 0,9	29,4 ± 3,4
<b>C18:3 w3</b>	2,7 ± 0,3	1,7 ± 0,1	3,4 ± 0,1
<b>C20:00</b>	4,5 ± 1,1	5,0 ± 0,3	3,6 ± 0,4
<b>C20:1 w9</b>	4,2 ± 0,1	4,8 ± 1,2	3,6 ± 0,6
<b>C20:2 w6</b>	5,2 ± 0,7	6,1 ± 1,3	4,0 ± 0,4

Los valores corresponden a la media ± DE (n=3).

#### Integridad de la membrana:

Importantes cambios en la integridad de la membrana plasmática fueron reflejo de la peroxidación lipídica determinada en el punto anterior. La Figura 5 A muestra los espectros de resonancia paramagnética de la sonda TEMPONE correspondiente a semillas de sauce no-fotooxidadas, fotooxidadas y fotooxidadas con posterior tratamiento de 8 h de *priming*. Las señales del lado derecho del espectro muestran los componentes W y L correspondientes a las señales de las sondas que se encuentran en la fase hidrofílica e hidrofóbica del citoplasma, respectivamente. La relación W/L (Fig. 5 B), índice que revela el daño en las membranas plasmáticas, decrece considerablemente (78 %) cuando las semillas son fotooxidadas; este comportamiento fue observado y descrito también en el capítulo anterior. Cuando las semillas fotooxidadas se sometieron a hidratación se observó un gradual aumento del cociente W/L alcanzando valores hasta 25 % mayores a los de las semillas no-fotooxidadas.



**Figura 5.** Efecto del *priming* sobre la permeabilidad de la membrana evaluada por la relación W/L en semillas de *Salix nigra* fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). **A**, espectro de ESR de la sonda-espín de TEMPONE. Los componentes W y L corresponden a la señales de la sonda situada en las fases hidrofílicas e hidrofóbicas del citoplasma, respectivamente. **B**, permeabilidad de la membrana en los diferentes tratamientos. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Los tratamientos con la misma letra minúscula encima de las columnas no son significativamente diferentes en  $P \leq 0,05$ , por el test de Tukey

### Proteínas oxidadas

La Tabla 5 revela que las semillas fotooxidadas presentaron un aumento del 45 % en el contenido de carbonilos de proteínas solubles, indicativo de un daño oxidativo en las proteínas. Cuando las mismas se sometieron a *priming* mostraron, coincidentemente a lo sucedido con MDA y quimioluminiscencia, un aumento de la cantidad de carbonilos al inicio de la imbibición (2 h). Sin embargo, a diferencia de esos parámetros, con el

aumento del tiempo de imbibición sólo se registro una ligera disminución de los carbonilos.

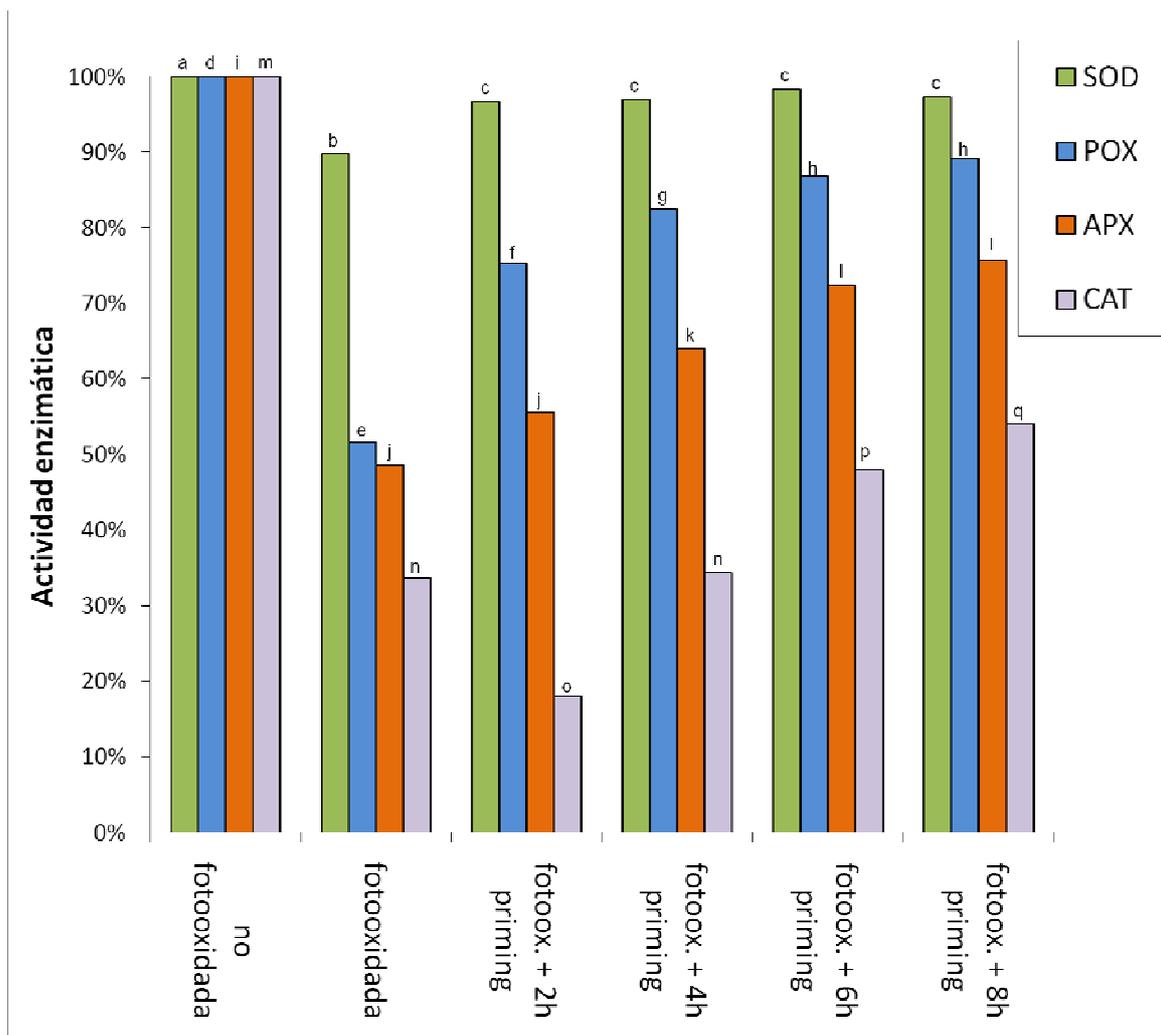
**Tabla 5.** Efecto del *priming* sobre la concentración de malonildialdehído (MDA), el contenido de proteínas solubles y la intensidad de la oxidación proteica en semillas de *Salix nigra* fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Tratamiento	MDA	Proteínas solubles	Oxidación proteica
	$\mu\text{mol/g}$ semilla	$\text{mg/g}$ semilla	$\text{nmol carbonilo/mg}$ proteína.
<b>No-fotooxidadas</b>	7,5±0,2 <sup>a</sup>	89,3±1,9 <sup>f</sup>	0,98±0,05 <sup>h</sup>
<b>Fotooxidadas</b>	9,1±0,1 <sup>b</sup>	92,2±0,6 <sup>g</sup>	1,42±0,10 <sup>i</sup>
<b>Fotooxidadas + 2 h <i>priming</i></b>	10,7±0,3 <sup>c</sup>	91,6±0,3 <sup>fg</sup>	1,61±0,05 <sup>j</sup>
<b>Fotooxidadas + 4 h <i>priming</i></b>	7,8±0,2 <sup>d</sup>	87,2±2,2 <sup>f</sup>	1,35±0,12 <sup>k</sup>
<b>Fotooxidadas + 6 h <i>priming</i></b>	6,8±0,3 <sup>e</sup>	93,6±0,8 <sup>g</sup>	1,29±0,12 <sup>k</sup>
<b>Fotooxidadas + 8 h <i>priming</i></b>	6,1±0,2 <sup>e</sup>	92,6±0,9 <sup>g</sup>	1,33±0,14 <sup>k</sup>

Los datos designados con la misma letra no difieren significativamente en  $P \leq 0,05$ . Los valores corresponden a la media  $\pm$  DE (n=4).

### Enzimas Antioxidantes

La Figura 6 muestra la actividad enzimática de SOD, CAT, APX y POX. La fotooxidación de las semillas produjo una disminución de aproximadamente 50 % en la actividad de APX y POX y de un 65 % en la actividad de CAT, mientras que la actividad de SOD disminuyó sólo un 10 %. Cuando estas semillas fotooxidadas fueron sometidas a *priming* las enzimas SOD, POX y APX mostraron a partir de las 2 h un progresivo y continuo aumento alcanzando a las 8 h valores cercanos a los de la semilla control. En cambio, la actividad de CAT mostró una fuerte reducción (45 %) en las primeras 2 h de *priming* recuperándose la actividad hasta valores que superaron los equivalentes de las semillas fotooxidadas antes de ser sometidas a *priming*. Ninguna de las enzimas alcanzó los valores de actividad de las semillas no-fotooxidadas.



**Figura 6.** Efecto del *priming* sobre las actividades enzimáticas de superóxido dismutasa (SOD), guayacol peroxidasa (POX), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT) en semillas de *Salix nigra* fotooxidadas ( $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Los resultados se expresaron en función del control\*. Los valores corresponden a la media ( $n = 4$ ). Los tratamientos con la misma letra minúscula por encima de las columnas no son significativamente diferentes en  $P \leq 0,05$ .

\*SOD:  $6,2 \text{ UA g semillas}^{-1}$ , POX:  $23 \text{ UA g semillas}^{-1}$ , APX:  $0,78 \mu\text{mol g semillas}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , CAT:  $9,9 \text{ nmol g semillas}^{-1} \text{ min}^{-1}$

## DISCUSIÓN

En este capítulo se demostró que cuando las semillas de *S. nigra* son sometidas a *priming* hay un inicial descenso en la GN seguido de un progresivo incremento, que a las 8 h excede el valor inicial (Fig. 1). Esta fluctuación en los valores de la GN es similar a la reportada por Maroder y col. (2000) en las semillas de *S. alba* y *S. matsudana* sometidas a humidificación a 100 % HR. En solución osmótica la hidratación resultó más rápida

debido a que, habiendo transcurrido 2 h de iniciado el *priming*, el contenido de agua en las semillas fue mayor que el alcanzado a las 8 h en atmósfera saturada. Esto indica que la fluctuación de la GN no depende de la velocidad de hidratación. Por otra parte, una fluctuación similar a la de la GN se observó en los indicadores de estrés oxidativo.

Se considera que una de las principales causas del envejecimiento de las semillas ortodoxas se debe a un lento proceso de autooxidación (Wilson y McDonald, 1986; Hendry, 1993; McDonald, 1999) que es detectable por quimioluminiscencia (Benson, 1990). La alta quimioluminiscencia que ocurre en las semillas fotooxidadas (80 % más que en las no-fotooxidadas) (Tabla 1) es consistente con una mayor sensibilidad a la acción de la luz. En sauce, la mayor sensibilidad que presentan las semillas, está determinada por el alto contenido de clorofila que las mismas contienen (ver capítulo 3.1).

En este estudio se demuestra la ocurrencia de un aumento inicial y transitorio en la quimioluminiscencia al comienzo de la imbibición (Tabla 1) el cual es consistente con las observaciones de quimioluminiscencia reportadas por Boveris y col. (1980; 1983; 1984) en soja y Chen y col. (2002) en arroz, quienes lo atribuyen a un estallido oxidativo producido en el primer caso por peroxirradicales derivados de los ácidos grasos insaturados y en el segundo por un aumento en el nivel de  $^1\text{O}_2$ . En las semillas de sauce, en cambio, se identificó al  $\text{O}_2^{\cdot-}$  como uno de los principales responsables del aumento de la luminiscencia que produjo los menores valores de GN durante las primeras horas de imbibición (Tabla 1, Fig. 1 y 2). Este hecho concuerda con hallazgos recientes de Kranner y col. (2010) que muestran un considerable y transitorio aumento del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y del  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante los primeros 30 min de imbibición de semillas de arveja. En las semillas de sauce, sin embargo, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no cumpliría ningún rol aparente en el estallido oxidativo (Tabla 2, Fig. 3).

Cabe destacar que existe una importante diferencia en las semillas de sauce respecto a las de arveja (Kranner y col., 2010) y arroz (Chen y col., 2002) ya que en estas últimas el estallido oxidativo disminuye con la capacidad germinativa mientras que en las de sauce aumenta (Tabla 1 y Tabla 2). En las de arvejas la generación de ERO estaría producida por una actividad enzimática pro-oxidante a la cual se le atribuye un efecto antimicrobiano (Kranner y col., 2010). En las semillas de sauce fotooxidadas, por el

contrario, las enzimas pro-oxidantes tendrían un efecto nocivo ya que cuando son inhibidas, disminuye la producción de  $O_2^{\cdot -}$  con el consecuente aumento en la GN (Tabla 2). En las semillas de sauce el estallido oxidativo estaría potenciado por dos características que son propias de estas semillas: i) una considerable presencia de membranas en los tejidos embrionarios de las semillas maduras (Maroder y col., 2003) lo que resulta en una mayor superficie lipídica atacable por agentes oxidantes; ii) un alto nivel basal de ERO producto de la alta sensibilidad a la luz (Fig. 4); y iii) una actividad enzimática disminuida debido al daño fotooxidativo (Fig. 6). Esto último se vería reforzado por el comportamiento que muestran las semillas al comienzo de la imbibición (Tabla 2) cuando se observa que un activador de la enzima SOD ( $MnCl_2$ ) produjo una disminución del estallido con el consecuente aumento de la GN; en cambio, en presencia de un inhibidor (KCN) sucede lo inverso, es decir, la intensidad del estallido aumenta y la GN disminuye. Otras de las causas que explicaría el descenso de la GN, es la rápida germinación como consecuencia de la desdiferenciación incompleta, lo que reduciría el tiempo de actuación de los mecanismos de reparación permitiendo así la detección de plántulas anormales. Puede inferirse que el descenso de la GN no ocurriría en semillas que no presenten estas características.

Por otro lado, en semillas menos afectadas por la fotooxidación la producción del  $O_2^{\cdot -}$  se localizó sólo en los bordes de los cotiledones (Fig. 2 b) mientras que en las que tienen un mayor grado de fotooxidación alcanzó toda la superficie de los mismos (Fig. 2 c) lo que muestra un patrón de formación del  $O_2^{\cdot -}$  similar al patrón de daño descrito en el capítulo anterior, sugiriendo que la producción del radical estaría ligada al daño que sufren los tejidos. En este sentido los resultados obtenidos por Maroder y col. (2000) en dos especies de *Salix*, y los presentados en este capítulo en una tercera especie del mismo género serían los primeros que reflejan en un parámetro visible como es la GN, la ocurrencia de este golpe oxidativo que se produce al inicio de la hidratación.

En tiempos de imbibición posteriores al de la ocurrencia del golpe oxidativo se produce una progresiva disminución de la luminiscencia la cual es consistente con el incremento en el accionar de las defensas antioxidantes y de los mecanismos de reparación (Fig. 1 y 6, Tabla 1).

A diferencia de lo que ocurre con los radicales libres reactivos asociados a la luminiscencia, el nivel de RLE durante las primeras dos horas de *priming* no se modificó (Fig. 4). Este comportamiento es esperable dado que los RLE son los productos finales de reacciones radicalarias iniciadas por radicales altamente reactivos (Jezierski y col., 2000) por lo que la detección de los RLE es posterior a la de los radicales reactivos, excepto en el caso en que las reacciones que lo producen sean muy veloces. La disminución de RLE durante el *priming* concuerda con la encontrada en semillas de maíz sometidas a este tratamiento (Chiu y col., 2003) y atribuida a una progresiva activación del sistema enzimático que los elimina (Saha y col., 1990; Chiu y col., 1995).

En el capítulo anterior se demostró que en las semillas de sauce ocurre un importante descenso de los AGPI causado por la fotooxidación. Como estas semillas conservan los cloroplastos con clorofilas y éstas se encuentran dentro de las membranas tilacoides de los granos (ricas en AGPI), la disminución de estos compuestos en semillas fotooxidadas permite inferir que el proceso de deterioro comenzaría en dichas membranas. En coincidencia con lo que ocurre con la disminución de los AGPI, un aumento en el nivel de MDA se detectó en las semillas fotooxidadas. El bajo nivel de ácido linolénico que se encuentran en esta semillas respecto de otras no resultó limitante para detectar ese aumento de MDA. Chiu y col. (1995) reportaron un comportamiento similar en semillas de sandía.

Coincidiendo con el aumento de la luminiscencia y la disminución de la GN, un aumento del contenido de MDA se produjo en las primeras horas del *priming*. Bailly y col. (2000) describen un patrón similar en las semillas de girasol en el que se observa un aumento brusco del MDA durante las primeras 3 h de imbibición.

Aunque el nivel de AGPI no se evaluó a las 2 h de *priming*, habiendo transcurrido 8 h, su valor excedió al de las semillas no-fotooxidadas. Sin embargo este mayor nivel no se reflejó en un incremento de la GN dado que en las semillas no-fotooxidadas ésta ya era cercana al 100 %. La consiguiente disminución en el nivel de MDA fue consistente con el aumento de los AGPI. En este sentido, la fluctuación en los niveles de MDA fue similar a la observada con la luminiscencia, lo cual nos permite inferir que este indicador constituye una prueba más del estallido oxidativo que se produce al comienzo de la imbibición.

La pérdida de integridad de la membrana plasmática es una característica de las semillas envejecidas (Wilson y McDonald, 1986). Esta resultó particularmente pronunciada en las semillas de sauce, probablemente debido al fuerte proceso fotooxidativo promovido por la luz. Cuando las semillas fotooxidadas se sometieron a *priming* se produjo una gradual recuperación de la permeabilidad tal como lo mostró el aumento del cociente w/l de la sonda TEMPONE (Fig. 6). Tanto el aumento de los AGPI, descrito anteriormente, como el de la integridad de las membranas reflejada en la disminución de la permeabilidad, que ocurren con el *priming*, no han sido reportados al presente en semillas de ninguna otra especie. El aumento de la peroxidación lipídica durante las 2 h de *priming*, según lo indicado por el MDA, no dio lugar a una pérdida de integridad de la membrana, podría atribuirse a que, en este tiempo, los daños todavía no alcanzaron a actuar sobre los componentes lipídicos del plasmalema.

La clorofila tiene un rol dual al ser generadora, y a la vez blanco de ataque de los ERO (Knox y Dodge, 1985; Dalton, 1995). Se considera que uno de los principales roles de los carotenos, en los tejidos verdes es protegerla contra estos agentes (Benson, 1990). Un aumento de las ERO en las semillas fotooxidadas sería suficiente para destruir parte de los carotenos desprotegiendo las clorofilas del ataque oxidativo. En sauce, se mostró que estas moléculas disminuían (ver capítulo 3.1 de esta tesis). Si bien la información sobre estos procesos en tejidos verdes secos es escasa, en algunos musgos tolerantes a la deshidratación (Seel y col., 1991) y en semillas de arvejas (Cheng y col., 2004) se detecta una progresiva disminución de la clorofila con el aumento de la luz. En las semillas de sauce aquí estudiadas, al igual que lo ocurrido con los otros indicadores de daños, se observó, también en las primeras horas de *priming*, una apreciable disminución del contenido de carotenos y clorofilas el cual fue progresivamente recuperado a medida que aumentaba el tiempo, alcanzando valores similares a los de las semillas control. La fluctuación en la concentración de clorofila se reflejó en el color de los cotiledones de las semillas germinadas, que pasó de color verde claro-amarillo a las 2 h de *priming* a verde oscuro a las 8 h (Fig. 1). Conjuntamente con los anteriores indicadores bioquímicos de daño oxidativo en las semillas fotooxidadas se evaluó la actividad de diferentes enzimas antioxidantes. En el caso de la SOD la actividad prácticamente no presentó grandes cambios respecto del control. Un comportamiento similar se observa en semillas de

diferentes especies sometidas a diversos tratamiento de envejecimiento: algodón (Goel y col., 2003), soja (Stewart y Bewley, 1980), maní (Sung y Jeng, 1994) y girasol (Bailly y col., 2002). Esto sugiere que la actividad de la enzima no sería afectada por los procesos oxidativos que ocurren en estos tratamientos. Las peroxidasas POX, APX y CAT, en cambio, mostraron un marcado descenso en la actividad, que resultó mayor en el caso de la última. Este mayor descenso concuerda con lo observado por Bailly y col. (2002) en semillas envejecidas de girasol. Una característica que tienen en común estas enzimas es que todas poseen como cofactor prostético al grupo hemo que al igual que la clorofila, derivan de la protoporfirina XI. Debido a que existe una vía común en la biosíntesis del hemo y la clorofila, es posible inferir que durante el fuerte estrés sufrido en las semillas fotooxidadas y en los primeros estadios de la imbibición, la disminución de la actividad de las peroxidasas y del contenido de clorofila estén vinculados a la sensibilidad de una o más enzimas que interviene en la biosíntesis de estas moléculas.

Respecto de las semillas sometidas a *priming*, las enzimas mostraron un progresivo aumento de la actividad a partir de las primeras 2 h. Este aumento se considera una de las estrategias de las semillas en respuesta al incremento del nivel de las ERO producido a principios del *priming* (Chiu y col., 2005). En el caso de CAT el progresivo aumento fue precedido por una disminución de la actividad detectada en las primeras 2 h de *priming* momento donde el golpe oxidativo fue mayor lo que sugiere que esta enzima podría ser más susceptible a ese proceso que las restantes. La bibliografía no informa disminución de la actividad de estas enzimas durante el período de *priming*, pero sí Bailly y col. (2000) muestran una disminución de CAT en semillas de girasol al inicio (6 h) de la fase de hidratación.

Cabe señalar que la actividad enzimática *in vivo* en una semilla está íntimamente relacionada con el contenido de agua en las células. A bajos contenidos de humedad, el agua está estrechamente ligada a las estructuras macromoleculares, disminuyendo así la movilidad y la accesibilidad de las enzimas a sus sustratos (Bailly, 2004). Como la actividad enzimática es medida *in vitro* en un medio acuoso, esto no necesariamente refleja su comportamiento *in situ*. Esto es consistente con la hipótesis arriba propuesta, que la

actividad de la enzima es incapaz de evitar el estallido oxidativo en las primeras horas de *priming*.

Según Chiu y col. (2003) la reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes en las semillas podría atribuirse a una modificación de las proteínas asociadas con el envejecimiento. En semillas secas esta modificación se cree que es causada por la oxidación (carbonilación) debido a la acción de las ERO (Berlet y Stadtman, 1997; Bernal Lugo y Leopold, 1998; Rajjou y col., 2008) y/o la formación de productos de Maillard, que también pueden estar asociada a dichos agentes oxidantes (Oracz y col., 2007). La lentitud característica de la formación de los productos de Maillard excluye que en estas semillas los mismos hayan tenido algún efecto sobre el rápido envejecimiento, resultando la oxidación (medido por la cantidad de carbonilos) como la principal causa de la modificación de proteínas (Tabla 5). En concordancia con los otros indicadores de daño, en las primeras horas de *priming*, las semillas mostraron una mayor cantidad de proteínas oxidadas. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió con la fluctuación de los otros parámetros evaluados, al aumentar el tiempo de *priming* solo se registró una ligera disminución. La ligera disminución podría deberse, de acuerdo a Berlet y Stadman (1997), a que las proteínas oxidadas derivadas de la peroxidación lipídica resultaron resistentes a la proteólisis, y además a que los productos de peroxidación lipídica podrían inhibir la capacidad de las proteasas para degradarlas. Johansen y col. (2004) y Job (2005) en cambio, consideran que el aumento de las proteínas oxidadas no necesariamente constituye un indicador de daño metabólico que se refleje en el proceso germinativo, sino más bien un proceso que es típico de las primeras etapas de la germinación. Por otro lado, la carbonilación es un proceso muy específico que se dirige a determinadas proteínas (Rajjou y col., 2008; Tanou y col., 2009; 2010), por lo tanto el hecho de medir los niveles globales de carbonilación no sería suficiente para comprender el comportamiento exacto de la oxidación proteica, ya que en las condiciones que se utilizan actualmente algunas proteínas podrían carbonilarse, mientras que las carboniladas ya existentes se degradarían (por la acción del proteasoma) lo que daría una medida global de la carbonilación aparentemente sin cambios.

Estos resultados intentan explicar las fluctuaciones en la GN de semillas de sauce sometidas a *priming*: Un aumento en la cantidad de ERO en las primeras horas de *priming* (estallido oxidativo) causa daños a las membranas, pigmentos y proteínas, llevando a una disminución de la GN. A medida que se incrementan los tiempos de *priming* los daños son progresivamente revertidos, como se ve reflejado en la recuperación de la GN.

Al presente, no existen estudios moleculares que den cuenta de los mecanismos y genes implicados en estas fluctuaciones.

## CAPITULO 3.3

### Análisis de plántulas procedentes de semillas fotooxidadas

#### INTRODUCCIÓN

Según lo observado en capítulo 3.1 las semillas fotooxidadas con una intensidad de luz de  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  muestran daños visibles en los cloroplastos de las células de los tejidos superficiales (externos) de la semilla, es decir en los tejidos de la cara abaxial de los cotiledones. En cambio, solo pequeñas alteraciones son observadas en los cloroplastos del mesófilo central y adaxial. No se observan daños en los tejidos del eje hipocótilo-raíz ni en el ápice meristemático de la raíz (ver Fig. 3 del capítulo 3.1). Los daños resultan de una fuerte peroxidación lipídica debida a un aumento en la cantidad de ERO y a una disminución de las defensas antioxidantes (capítulo 3.1 y 3.2). Las plántulas procedentes de estas semillas fotooxidadas (PSF) muestran a los 7 días de germinación (DG) un patrón de daño característico compatible con el deterioro de las semillas, donde los tejidos externos más expuesto a la luz presentan mayor daño que los internos (ver Fig. 4 del capítulo 3.1).

Al presente, numerosos estudios focalizados en el crecimiento han sido realizados en condiciones de fotooxidación (Wise y Naylor, 1986; Jakob y col., 1997; Triantaphylidès y col., 2008; Maruta y col., 2010). Por otra parte, son escasas las investigaciones sobre los efectos de la fotooxidación en semillas (ver cap. 3.1). Lo novedoso de la investigación que se propone en este capítulo es el estudio de la evolución del daño oxidativo (producido en la semilla) durante la germinación.

Para esto, se evaluaron las características exomorfológicas, histológicas y subcelulares en diferentes tiempos de germinación y estos datos se complementaron con estudios fisiológicos y bioquímicos. Los materiales utilizados fueron semillas fotooxidadas en dos intensidades de luz y plántulas en diferentes estadios provenientes de las mismas.

Las determinaciones fueron acompañadas por dos controles consistentes en plántulas provenientes de: (i) semillas almacenadas en oscuridad (PSAO) y (ii) semillas no fotooxidadas (PSNF)

## RESULTADOS

### Análisis exomorfológico de las plántulas procedentes de semillas fotooxidadas (PSF)

El análisis exomorfológico de las plántulas procedentes de semillas sometidas a dos intensidades de luz, durante tres días y en atmósfera de aire permitió detectar diferencias respecto de los controles. Las evaluaciones se hicieron a 7, 14 y 24 días de germinación (DG) (Fig. 1).

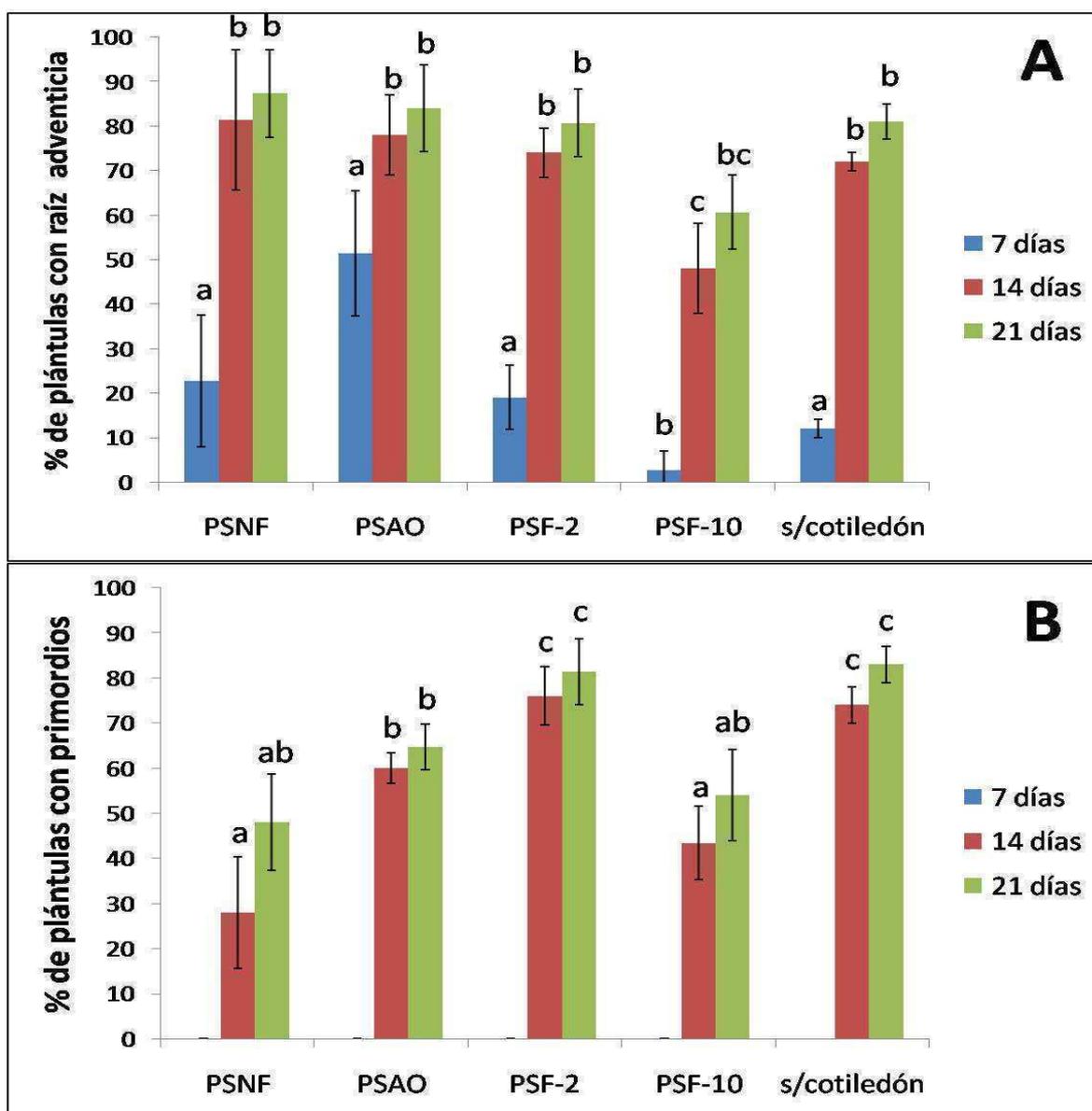
#### 7 DG

Las plántulas procedentes de semillas fotooxidadas con una intensidad de luz de  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PSF-10) mostraron porcentajes de 97 % y 16 % de GT y GN respectivamente. Al igual que lo observado en el capítulo 3.1, las plántulas de 7 DG exhibieron cotiledones con clorosis incipiente y zonas necróticas en la cara abaxial y en los márgenes. El hipocótilo no mostró diferencias respecto a las PSNF. La raíz, en cambio, mostró crecimiento limitado sin desarrollo de raíces adventicias. El tamaño promedio de la plántula resultó considerablemente menor al del control (Fig. 2 y 4).

Las plántulas procedentes de semillas fotooxidadas con una intensidad de luz de  $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PSF-2) exhibieron un porcentaje de  $99 \pm 1$  % y  $57 \pm 4$  % de GT y GN respectivamente. Los cotiledones presentaron una menor clorosis y raramente mostraron zonas necróticas lo cual correlaciona con el mayor valor de la GN (Fig. 3). La raíz tuvo un crecimiento menor respecto de las PSNF; no obstante, a diferencia del anterior tratamiento un 20 % de las plántulas desarrollaron raíces adventicias (Fig. 1 B). El tamaño promedio de las plántulas también resultó menor respecto al de las PSNF aunque mayor que el de las PSF-10. El hipocótilo no mostró cambios.

Las PSAO mostraron porcentajes de 100 y 90 % de GT y GN respectivamente, y generaron plántulas que, en comparación con las PSNF, resultaron de tamaño algo menor y con incipiente clorosis en los cotiledones. El desarrollo de raíces adventicias fue alto en comparación con las PSNF pero esta característica no fue significativa en tiempos mayores ya que todos los tratamientos alcanzaron valores similares (Fig. 1 A).

En ninguno de los tratamientos se observó desarrollo de primordios (Fig. 1 B)



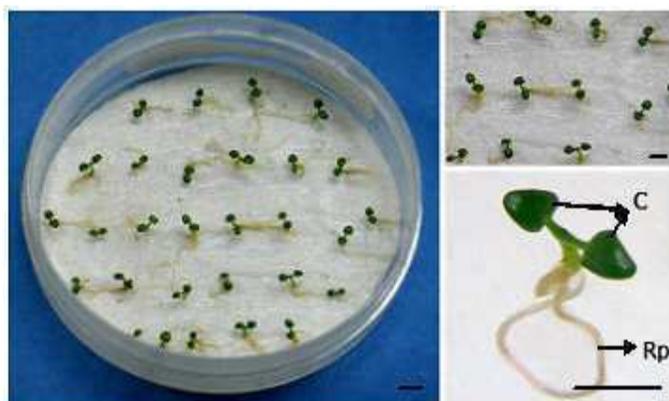
**Figura 1.** Desarrollo de raíces adventicias (A) y de primordios foliares (B) en diferentes días de germinación: Los tratamientos corresponden a plántulas procedentes de semillas no-fotooxidadas (PSNF), envejecidas en ausencia de luz (PSAO), plántulas procedentes de semillas fotooxidadas a  $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PSF-2) y  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PSF-10) y plántulas procedentes de semillas no envejecidas a las cuales a los 3 DG se extirpó uno de sus cotiledones (s/cotiledón).

### 14 y 24 DG

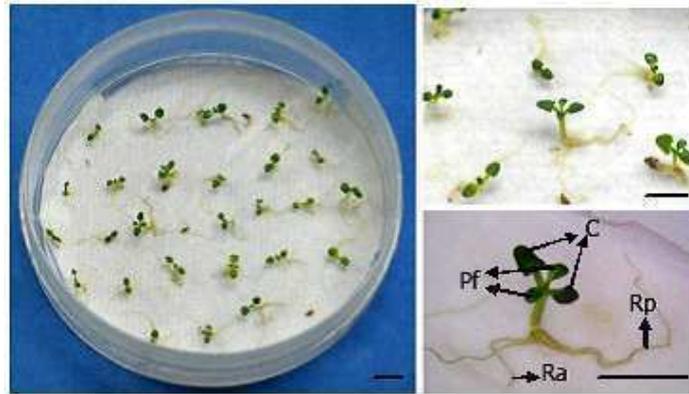
La aparición de primordios foliares fue mayor en PSF-2 y 10 que PSNF, siendo más alto en las PSF-2 ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 1 B, 2, 3 y 4). La mayoría de las plántulas que generaron primordios foliares sus cotiledones presentaban clorosis de forma generalizada o en pequeñas áreas (Fig. 3 y 4). A los 24 DG un 60 % de las PSF-10 habían desarrollado primordios foliares mientras que el 40 % restante presentaban daños severos visible en sus órganos, o estaban muertas.

Con el fin de correlacionar la emergencia de los primordios foliares con la disminución de la superficie fotosintetizante se realizó un ensayo con semillas no-fotooxidadas el cual consistió en extirpar tempranamente (3 DG) uno de los cotiledones. Los resultados mostraron que aquellas plántulas a las que se le había extirpado un cotiledón, desarrollaron prematuramente primordios foliares (Fig. 1 y 5).

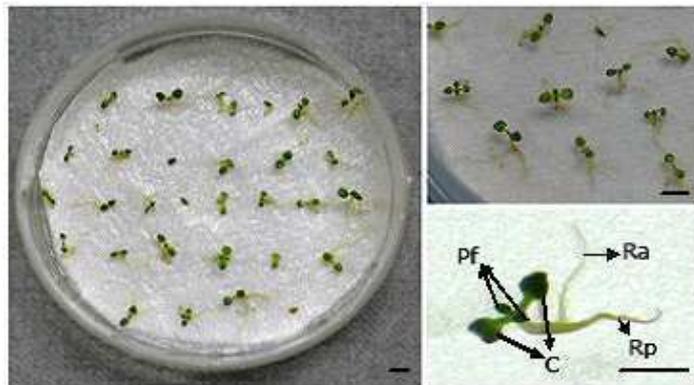
En los diferentes tratamientos los porcentajes de plántulas con primordios de los igualaron a los controles en tiempos mayores de germinación, mientras que el porcentaje de raíces adventicias no varió con los distintos tratamientos (Fig. 1 A y B).



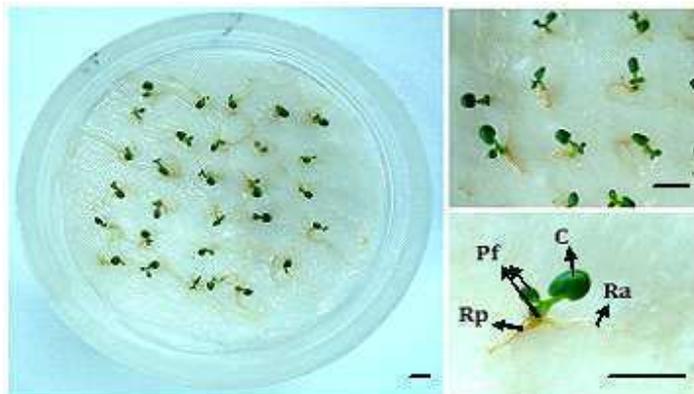
**Figura 2.** PSNF, 14 DG. Las semillas germinaron en cajas de Petri sobre papel humedecido con agua destilada-desionizada, bajo luz fluorescente/oscuridad (16/8 h por día). **Abreviaturas:** C: cotiledón; Rp: raíz principal. **Escala:** 2 mm.



**Figura 3.** PSF-2, 14 DG. Las semillas germinaron en cajas de Petri sobre papel humedecido con agua destilada-desionizada, bajo luz fluorescente/oscuridad (16/8 h por día). **Abreviaturas:** C: cotiledón; Pf: primordio foliar; Rp: raíz principal; Ra: raíz adventicia. **Escala:** 2 mm.



**Figura 4.** PSF-10, 14 DG. Las semillas germinaron en cajas de Petri sobre papel humedecido con agua destilada-desionizada, bajo luz fluorescente/oscuridad (16/8 h por día). **Abreviaturas:** C: cotiledón; Pf: primordio foliar; Rp: raíz principal; Ra: raíz adventicia. **Escala:** 2 mm.



**Figura 5.** PSNF s/cotiledón, 14 DG, en las cuales a los 3 DG se extirpó uno de sus cotiledones. Las semillas no envejecidas germinaron en cajas de Petri sobre papel humedecido con agua destilada-desionizada, bajo luz fluorescente/oscuridad (16/8 h por día) **Abreviaturas:** C: cotiledón; Pf: primordio foliar; Rp: raíz principal; Ra: raíz adventicia. **Escala:** 2 mm.

### **Evaluación *in situ* de tejidos y células**

Para conocer la evolución del daño fotooxidativo durante la germinación se analizaron cortes histológicos de cotiledones en plántulas de 14 DG los cuales se confrontaron con los resultados presentados en el capítulo 3.1.

#### *PSNF*

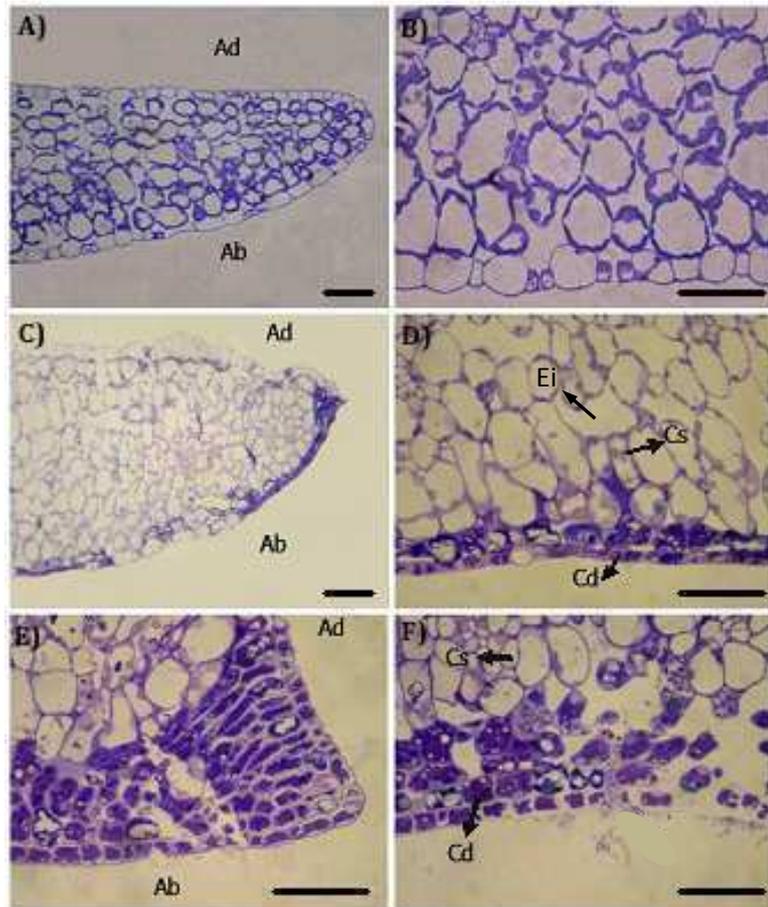
Como ocurre en las semillas con germinación epigea, en los cotiledones, las células de los diferentes tejidos consumieron sus reservas (proteicas y lipídicas), desarrollaron una vacuola central y se expandieron (Fig. 6 A-B). En ambas epidermis, los cloroplastos desarrollaron en leucoplastos (plástidos carentes de clorofila) y se generaron los estomas.

#### *PSF-2*

A diferencia de las PSNF, las células de la epidermis abaxial y algunas de las células de la capa subyacente a la misma, no entraron en el proceso de diferenciación, es decir, no consumieron sus reservas ni desarrollaron una vacuola central y en consecuencia no se expandieron (Figura 6 C-D) Su aspecto por lo tanto no se modificó respecto al de las células de una semilla madura, es decir, no aumentaron su tamaño, no desarrollaron una vacuola central y no consumieron sus reservas. El resto de las células del mesófilo se diferenciaron, pero su tamaño resultó algo menor al de las PSNF (Fig. 6 A-D).

#### *PSF-10*

A diferencia del tratamiento anterior, los daños fueron más severos ya que las células de la epidermis abaxial y las de las primeras capas subyacentes del mesófilo mostraron características similares a las de las células no expandidas de las PSF-2 (Fig. 6 E-F).



**Figura 6.** Sección transversal de cotiledón de plántulas de *Salix nigra* L., 12 DG. Las imágenes fueron obtenidas de secciones transversales de 1  $\mu\text{m}$  de espesor, de cotiledones incluidos en resina Spurr, coloreados con azul de toluidina, utilizando microscopía óptica Zeiss EM109T en campo claro. **A y B**, PSNF. **C y D**, PSF-2. **E y F**, PSF-10; **Abreviaturas:** **Ad:** cara adaxial; **Ab:** cara abaxial; **Cs:** células expandidas; **Cd:** células dañadas no expandidas; **Ei:** espacio intercelular. **Escala:** 20  $\mu\text{m}$ .

En cuanto a las células diferenciadas (o expandidas), comparando las secciones de los diferentes tratamientos se pudo determinar que el tamaño final fue mayor en las plántulas control y menor en las PSF-10. Las secciones correspondientes a cotiledones de PSAO (datos no provistos) no presentan diferencias con lo observado en PSNF.

#### Evaluación subcelular *in situ*

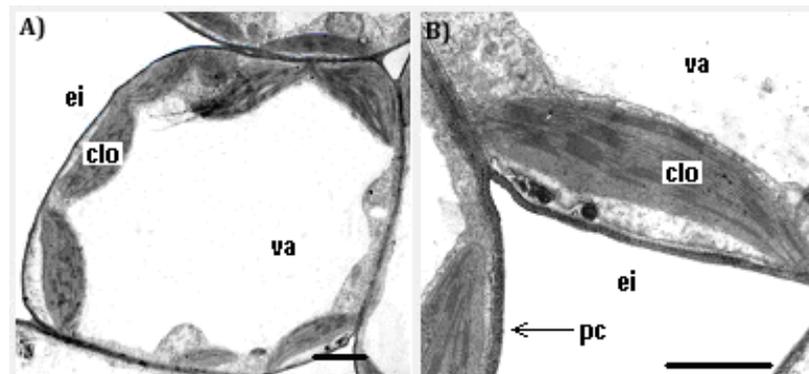
En los cotiledones de las PSF-2 y las PSF-10 se evaluaron los cambios producidos en el nivel subcelular durante la germinación. Para ello, se realizaron secciones ultrafinas

de cotiledones de plántulas de 14 DG. Especial atención se prestó a las características de núcleos, cloroplastos, cuerpos proteicos, cuerpos multivesiculares (estos últimos asociados al proceso de muerte celular programada), y vacuolas líticas (vacuolas asociadas a la autofagia). Se analizaron las células expandidas y las no-expandidas.

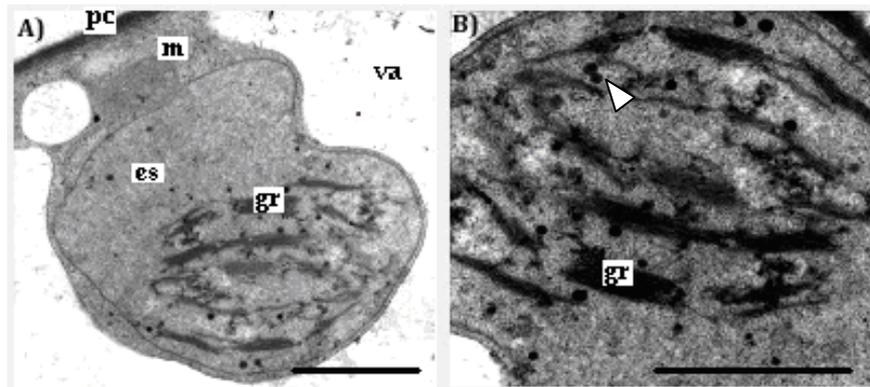
#### *Células expandidas*

Al igual que en las PSNF (Fig. 7), en las PSF-10 las células expandidas mostraron ausencia de cuerpos lipídicos y proteicos, vacuola central y citoplasma parietal. La ausencia de cuerpos lipídicos y proteicos indica la digestión de proteínas y lípidos que ocurre durante las primeras etapas de la germinación. Sin embargo en las PSF-10 los cloroplastos se observaron senescentes, con grana parcialmente desorganizada y con abundantes plastoglóbulos (Fig. 8). Su forma esférica se diferenció de la forma semiesférica o lenticular de los cloroplastos de las PSNF y la estructura de laminillas fue menos compacta. (Fig. 7 y 8).

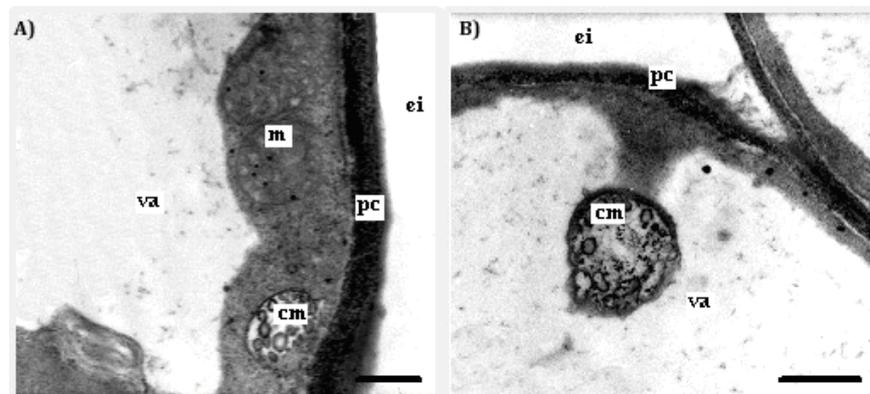
Estas células mostraron evidencias de autofagia de organelas, con cloroplastos y mitocondrias parcialmente digeridos en la vacuola (Fig. 8 y 9). En una etapa avanzada de la autofagia resultó difícil identificar el tipo de organela dentro de la vacuola. Cuerpos multivesiculares fueron frecuentemente encontrados (Figura 9).



**Figura 7.** Célula del mesófilo esponjoso de cotiledón de las PSNF, de *Salix nigra* L., 14 DG. Las imágenes fueron obtenidas utilizando microscopía electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de cotiledones montados sobre grillas de níquel y contrastados con citrato de plomo seguido de acetato de uranilo. **A**, Célula expandida con cloroplastos lenticulares y grana desarrollada. La vacuola carece de contenidos sólidos. **ei**: espacio intercelular; **va**: vacuola; **clo**: cloroplasto; **Escala**: 1  $\mu$ m. **B**, Detalle de un cloroplasto mostrando la grana con tilacoides ordenados. **pc**: pared celular; **Escala**: 1  $\mu$ m.



**Figura 8.** Célula del mesófilo esponjoso de cotiledón de las PSF-10, de *Salix nigra* L., 14 DG. Las imágenes obtenidas utilizando microscopía electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de cotiledones montados sobre grillas de níquel y contrastados con citrato de plomo seguido de acetato de uranilo, **A**, en el cloroplasto se observa una zona carente de grana y una zona con grana que queda lateralmente desplazada. La grana está compuesta por granos parcialmente desorganizados. **B**, grana en detalle. **Abreviaturas:** es: estroma; gr: grana; m: mitocondria; va: vacuola; pc: pared celular. **Punta de flecha:** cuerpos osmiofílicos. **Escala:** 1  $\mu$ m.

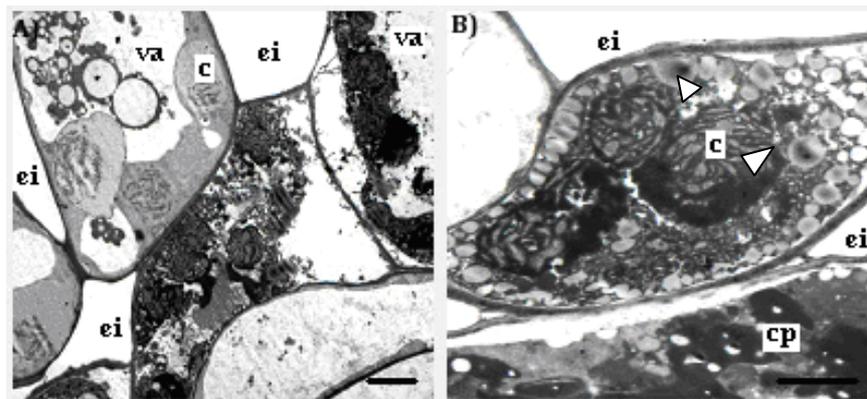


**Figura 9.** Célula del mesófilo esponjoso de cotiledón de las PSF-10, de *Salix nigra* L., 14 DG. Las imágenes fueron obtenidas utilizando microscopía electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de cotiledones montados sobre grillas de níquel y contrastados con citrato de plomo seguido de acetato de uranilo, **A-B**, detalle de cuerpos multivesiculares: en A, se muestra el origen del cuerpo multivesicular en el citoplasma próximo a la pared; en B, el cuerpo multivesicular está siendo incorporado a la vacuola para su degradación. **Abreviaturas:** m: mitocondria; cm: cuerpo multivesicular; va: vacuola; pc: pared celular; ei: espacio intercelular. **Escala:** 1  $\mu$ m.

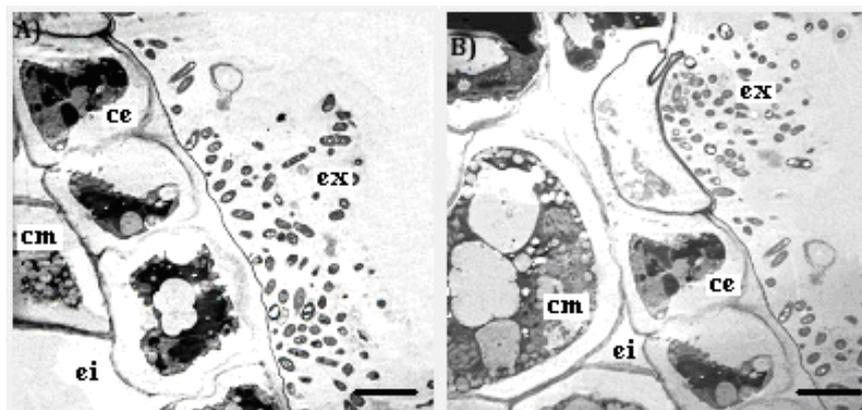
### Células no expandidas

La mayoría de las células de los tejidos más superficiales de los cotiledones de las PSF-10 que, en el análisis por microscopía de campo claro se mostraron fuertemente picnóticas, carentes de vacuolas y con reservas (Fig. 6 E-F), en el nivel subcelular exhibieron profundas alteraciones en la grana de los cloroplastos (Fig. 10 B)

En la pared externa de la epidermis abaxial, hacia el exterior, se observa abundante secreción de apariencia semisólida (Fig. 11). La presencia de esta secreción está indicando que a través de la epidermis abaxial se estaría generando una exocitosis en la que aparecen incluidos microorganismos. Al igual que en las secciones histológicas, las imágenes de MET provenientes de plántulas de semillas almacenadas en oscuridad no presentan diferencias con las de las plántulas control.



**Figura 10.** Célula del mesófilo esponjoso de cotiledón de las PSF-10, de *Salix nigra* L., 14 DG. La imágenes fueron obtenidas utilizando microscopía electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de cotiledones montados sobre grillas de níquel y contrastados con citrato de plomo seguido de acetato de uranilo, **A y B**, Células no expandidas con cuerpos lipídicos y proteicos no consumidos y cloroplastos con grana profundamente alterada; en **A** se observa algunas células que han digerido parcialmente su reserva e iniciado la formación de una vacuola central. **Abreviaturas:** va: vacuola; ei: espacio intercelular; c: cloroplasto; cp: cuerpo proteico. **Punta de flecha:** cuerpos lipídicos. **Escala:** 1  $\mu$ m.



**Figura 11.** Célula del mesófilo esponjoso de cotiledón de las PSF-10, de 14 DG de *Salix nigra* L. Las imágenes fueron obtenidas utilizando microscopía electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de cotiledones montados sobre grillas de níquel y contrastados con citrato de plomo seguido de acetato de uranilo, **A y B**, En las dos imágenes se observa excitosis desde las células de la epidermis abaxial al exterior. **Abreviaturas:** **ex:** secreción excitada; **ei:** espacio intercelular; **ce:** célula epidérmica; **cm:** célula del mesófilo. **Escala:** 2  $\mu$ m.

### **Peroxidación lipídica (MDA) y actividad de enzimas antioxidantes**

En semillas fotooxidadas y PSF con distinto DG se cuantificaron algunos marcadores de estrés oxidativo tales como la actividad de diferentes enzimas antioxidantes (CAT, POX, SOD y APX) y el contenido de malonildialdehído (MDA). Los resultados se expresaron respecto de sus controles (no fotooxidados) al cual se le asignó el valor de 1 UA, *i.e* un valor de 1,8 UA de POX representa una actividad de 1,8 veces mayor al del control.

#### *PSF-2*

A los 3 DG se detectó un importante aumento en el contenido de MDA que alcanzó un máximo de 2,40 UA y fue disminuyendo progresivamente hasta equipararse al de su respectivo control a los 14 DG (Fig. 12 A).

En los diferentes tiempos, cada una de las enzimas analizadas (SOD, POX, APX y CAT) mostraron patrones de actividad específica: las bajas actividades de SOD, POX y APX previo a la germinación (0 DG), exhibieron una rápida recuperación durante el primer día alcanzando a los 14 DG valores muy superiores a los de sus respectivos controles (Fig. 12).

En el caso de CAT, en cambio, la actividad se mantuvo baja durante los primeros días de germinación observándose sólo a los 7 DG un aumento transitorio (1.4 UA) que se redujo a la mitad a los 14 DG.

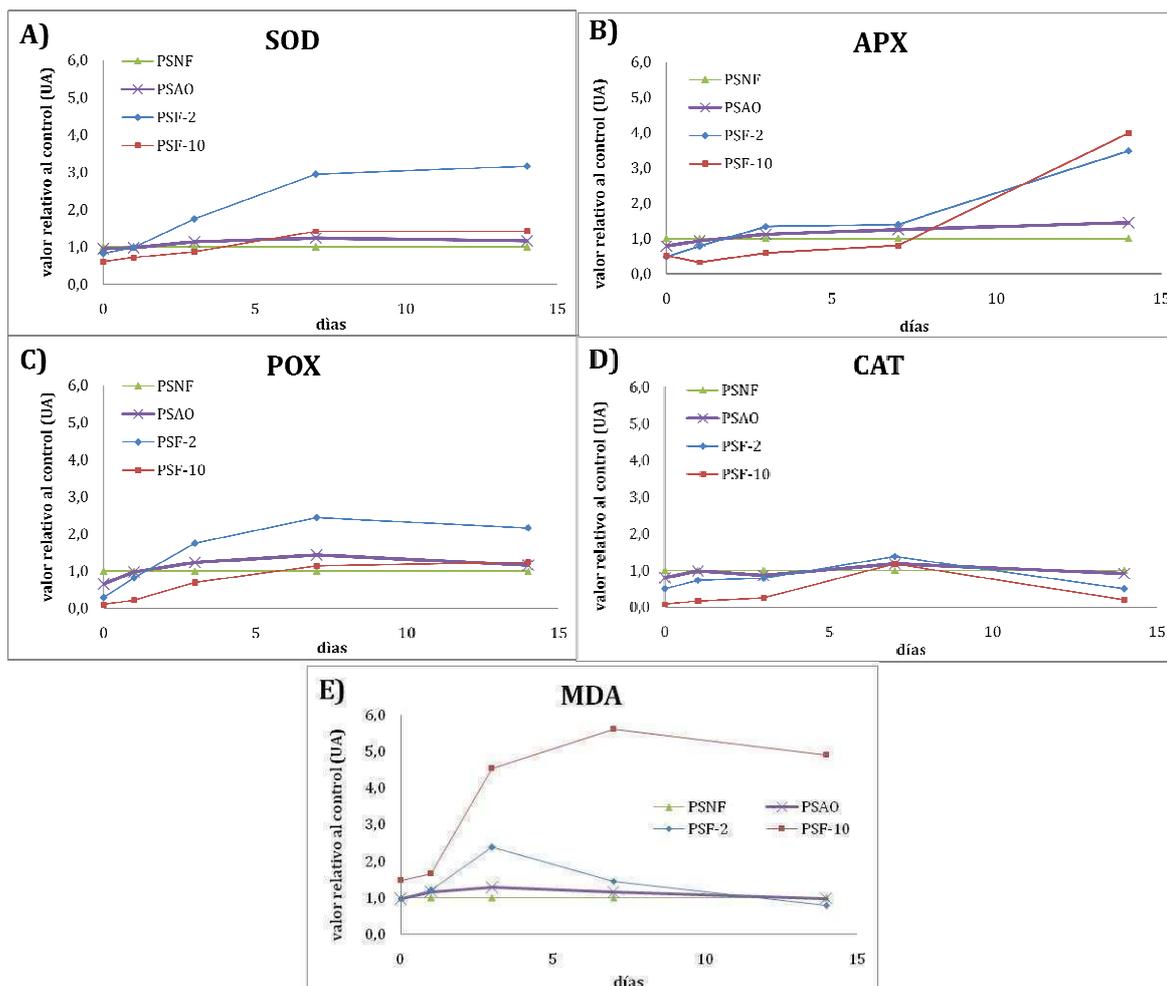
#### *PSF-10*

A diferencia de lo ocurrido en las PSF-2, durante la germinación no hubo una disminución de la concentración de MDA en los diferentes tiempos evaluados. Por el contrario, en plántulas de 14 DG la concentración aumentó 6 veces manteniéndose prácticamente constante a mayores tiempos de germinación (Fig. 12 A).

Las actividades de las diferentes enzimas mostraron un comportamiento similar al observado en las PSF-2, aunque la actividad en PSF-10 fue comparativamente inferior. Pese a que entre los dos tratamientos hubo diferencia significativa ( $P \leq 0,05$ ) las mismas fueron más pronunciadas durante los primeros días de la germinación (Fig. 12).

Los valores de MDA y enzimas son tenidos en cuenta hasta los 14 días ya que a partir de ese momento una gran proporción de las PSF-10 comenzaron a desarrollar hongos.

El contenido de MDA y la actividad enzimáticas de las PSAO no mostraron mayores diferencias respecto a las PSNF.



**Figura 12.** En *S. nigra*, actividad enzimática (A-D) y contenido de MDA (E) de semillas fotooxidadas y PSF. Las determinaciones se hicieron en semillas fotooxidadas a  $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (2) y  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (10) durante tres días y en plántulas procedentes de esas semillas (PSF) a diferentes tiempos de germinación. Los valores representados en 0 días corresponden al estadio de semilla, previo a la germinación. Se utilizaron como controles semillas no envejecidas y plántulas provenientes de las mismas (PSNF) y semillas envejecidas en oscuridad y plántulas provenientes de las mismas (PSAO). Los valores son expresados como un valor relativo al control. **Abreviaturas:** SOD: superóxido dismutasa; APX: ascorbato peroxidasa; POX: guaiacol peroxidasa; CAT: catalasa; MDA: malonildialdehído; UA: unidades arbitrarias.

### Producción de $\text{O}_2^{\cdot -}$

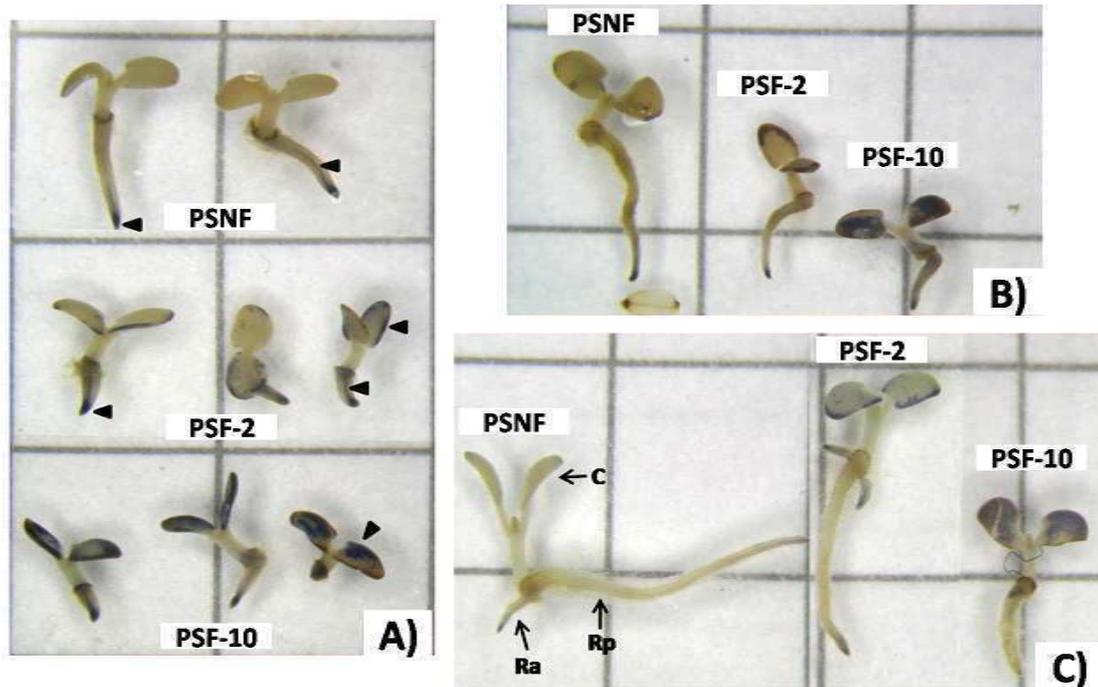
Como se mencionó en el capítulo anterior una de las formas de determinar la generación del  $\text{O}_2^{\cdot -}$  es mediante la sonda NBT, la cual en presencia del radical forma un precipitado de color azul. En este caso, el ensayo se hizo en PSF con el objetivo de conocer si durante la germinación se produce una progresiva disminución del radical (ver Fig. 3 del capítulo 3.2), lo que concordaría con el aumento de la actividad de las diferentes enzimas antioxidantes mencionadas anteriormente, especialmente la SOD.

La tinción en el meristema apical de la radícula que se produce en los primeros momentos de la imbibición de la semilla se observó a los 2, 4 y 8 DG, tiñéndose además en el último caso (8 DG) los ápices de las raíces adventicias que en ese tiempo se forman (Fig. 13). Otra región en la que se detectó la presencia del radical  $O_2^{\cdot -}$  fueron los tejidos del cilindro vascular. Similares observaciones son descritas por Causin y col., (2009) quienes vinculan la producción del radical  $O_2^{\cdot -}$  con la elongación de la radícula.

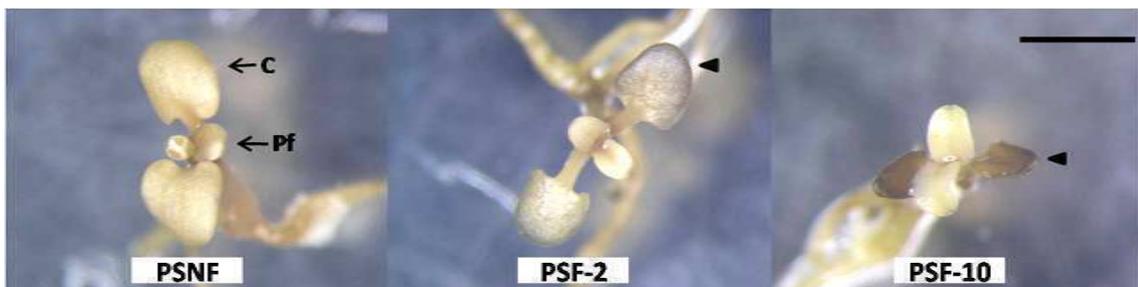
Respecto de los cotiledones, la generación del radical se observó en los primeros momentos de la imbibición de las semillas fotooxidadas (ver Fig. 3 del capítulo 3.2) continuando durante los primeros 14 DG sin mostrar algún tipo de cambio aparente en la localización (Fig. 13 y 14). En el caso de las PSF-2, la producción del radical se localizó exclusivamente en los bordes del cotiledón mientras que en las PSF-10 lo hizo en toda la superficie del cotiledón (Fig. 13 y 14). Al igual que en las semillas (ver Fig. 3 del capítulo 2), en los cotiledones de las PSNF no se observó prácticamente coloración durante los primeros 14 DG en los cotiledones de las PSNF (Fig. 13 y 14).

Los primordios foliares de las PSF-2 y PSF-10 no presentaron ningún indicio de coloración (Fig. 14).

Otra ERO que se intentó determinar mediante la técnica de DAB fue  $H_2O_2$ . La cual no arrojó datos concluyentes.



**Figura 13.** Localización histoquímica de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  mediante la sonda NBT en plántulas de sauce provenientes de semillas fotooxidadas sometidas a dos intensidades de luz (PSF-2 y PSF-10) y plántulas control (PSNF). Las plántulas corresponden a 2 DG (A), 4 DG (B) y 8 DG (C). Las **cabezas de flechas** indican la formación  $O_2^{\cdot-}$  mediante el depósito de formazán. **Abreviaturas:** C: cotiledón; Rp: raíz principal; Ra: raíz adventicia. **Escala:** cuadrícula 0,5 x 0,5 mm



**Figura 14.** Localización histoquímica de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  mediante la sonda NBT en plántulas de 14 DG provenientes de semillas fotooxidadas bajo dos intensidades de luz (PSF-2 y PSF-10) y plántulas provenientes de semillas no-fotooxidadas (PSNF). Las **cabezas de flechas** indican la formación de  $O_2^{\cdot-}$  mediante el depósito de formazán. **Abreviaturas:** C: cotiledón; Pf: primordio foliar. **Escala:** 2 mm.

## DISCUSIÓN

El análisis de la germinación permitió determinar que las PSF-2 tienen la capacidad de superar las consecuencias del daño producido en los cotiledones generando prematuramente primordios foliares que reemplazan a aquellos en la fotosíntesis. La emergencia prematura de los primordios foliares en plántulas con un cotiledón extirpado, resulta consistente con la hipótesis que considera que la superficie fotosintética emergente de los primordios foliares tiende a sustituir la disminución de la misma en los cotiledones fotooxidados. Por el contrario, la falta de desarrollo de las raíces primarias debido al daño fotooxidativo, no produjo un adelanto en la formación de raíces adventicias, emergiendo las mismas simultáneamente con las de las PSNF. Esto también sugiere que la producción de fotosintatos por los primordios son utilizados en su propia expansión, no habiendo alcanzado todavía la capacidad de exportarlo a las raíces.

A los 14 días no se detectaron diferencias significativas entre las PSF-10 y las PSNF en los porcentajes de plántulas con primordios. En ambos tratamientos los valores alcanzados fueron cercanos al 45 %. A los 28 días, en cambio, el restante 55 % de las PSF-10 no sólo no formó primordios sino que, por el contrario, se produjo un progresivo deterioro. En cuanto a las PSNF, las mismas continuaron formando primordios hasta alcanzar valores cercanos al 100 %. Esto muestra que el nivel de daño fotooxidativo alcanzado en intensidades de  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  afectó la actividad del meristema apical del brote, y por ende la formación de primordios foliares. En cambio, prácticamente todas las plántulas que continuaron vivas, desarrollaron primordios prematuramente.

La diferencia en la aparición temprana de los primordios foliares entre las PSNF y las PSAO es consistente con el hecho que en oscuridad hay una sensible autooxidación, reacción que ocurre debido a la considerable y atípica presencia de membranas en semillas secas como consecuencia de la desdiferenciación incompleta (Maroder y col., 2008), proceso que también operaría en las semillas fotooxidadas.

El hecho que los primordios foliares no presentaron ningún tipo de alteración morfológica, a pesar del fuerte daño en otros órganos de la plántula, permite inferir que

el ápice meristemático del vástago, protegido por los cotiledones, no fue alcanzado por el daño fotooxidativo (ver capítulo 3.1).

Las observaciones en los niveles histológico y celular realizadas en PSF-2 de 14 DG concuerdan con lo antedicho ya que muestran, al igual que lo observado en las semillas, que el ápice no presenta daños. En cambio, el daño fotooxidativo (parcial o total) producido en los cotiledones del embrión especialmente en la epidermis abaxial y en los tejidos subyacentes, es irreversible debido a que afecta el crecimiento de las células. La diferenciación celular que es inherente al proceso de germinación, requiere que las células embrionarias consuman las reservas almacenadas en los cuerpos proteicos y lipídicos, desarrollen una vacuola central y se expandan. Tampoco se expandieron las típicas células vacuolizadas de la capa sub-protodérmica del embrión descritas por Maroder y col., (2003).

En las PSF-10 las células expandidas mostraron menor tamaño que las de las PSNF, lo que determinó el menor tamaño final alcanzado por los cotiledones. Trabajos recientes han documentado el efecto de los diferentes tipos de estrés abiótico sobre la disminución de la expansión foliar, que atribuyen generalmente a una insuficiencia de la elongación celular con las hormonas jugando un rol protagónico (Taleisnik y col., 2009 y los trabajos allí citados).

Adicionalmente, esta investigación permitió comprobar que el consumo de las reservas en los tejidos embrionarios en esta especie se produce por auto-fagocitosis (Fig. 9) y no por el movimiento de enzimas provenientes de células vecinas. Este punto merece destacarse ya que son pocos los estudios que dan cuenta del origen de las enzimas, en otras palabras, si las enzimas provienen de la misma célula reservante o de otras células del mismo o de distinto tejido. Como ejemplos de casos en los que las enzimas proceden de otros tejidos, pueden mencionarse los siguientes: (i) el caso de la movilización del almidón del endosperma amiláceo de Poaceae (Bewley y col., 1994) o (ii) de los galactomananos del endosperma de la especie de *Ceratonia siliqua* L. (familia Fabaceae, subfamilia Cesalpinoideae) (Grant Reid y col., 1985). En ambos casos se trata de tejidos muertos en la madurez. Como ejemplo de especies en las que las enzimas se generan en la misma célula reservante, cabe mencionar las células del endosperma de la palmera

*Phoenix dactylifera* L. (Arecaceae) donde la auto-catálisis de proteínas y lípidos ha sido reportada (Chandra y col., 1989; 1990; De Mason y col., 1985). Las alteraciones observadas en los cloroplastos tales como cloroplastos redondeados en lugar de lenticulares, espacios intra-tilacoides hinchados y membranas onduladas, en algunos casos con separaciones en el sistema interlamelar, mayor presencia de vesículas y plastoglóbulos, entre otras mostraron marcadas semejanzas con las ocurridas en hojas de otras especies sometidas a diferentes tipos de estrés abióticos. (Gabara y col., 2003, Wi y col., 2005, Xu et al 2006, Cheng y col., 2011, Zhang y col., 2011). Cabe señalar que la mayor parte de estas alteraciones también se observaron en los cloroplastos de las semillas fotooxidadas de *S. nigra* (capítulo 3.1). Todo lo que antecede permite sugerir que se trata de una respuesta de los cloroplastos, la cual es independientemente del grado de hidratación del tejido y del tipo de estrés. De acuerdo a Staehelin y col., (2000) la formación de los cuerpos multivesiculares en plantas está asociada al proceso de endocitosis y éste a su vez vinculado a la autofagia de las organelas durante la muerte celular programada. Por ello se puede inferir que la endocitosis y la autofagia de las organelas celulares observadas en los tejidos embrionarios de las PSF determinaron la muerte temprana de los cotiledones. Las plantas que anticiparon el desarrollo de sus primordios foliares pudieron sobrevivir, ya que éstos reemplazaron la función de fotosíntesis que, en las plantas con germinación epigea, como las de sauce, cumplen los cotiledones.

Las variaciones del comportamiento germinativo correlacionaron con aquellas de los indicadores de estrés oxidativo. Así, el contenido de MDA, que mostró un considerable aumento en los primeros días de la germinación, disminuyó sensiblemente a los 7 DG, en las PSF-2. Las PSF-10, en cambio, no mostraron ningún signo de recuperación observándose a partir del 3 DG un aumento sostenido del MDA. Esto puede atribuirse a que en el último caso, el daño fotooxidativo alcanzó niveles que afectaron los mecanismos responsables de la recuperación lo cual se vio reflejado en la alta tasa de mortalidad en plántulas de más de 21 DG.

El comportamiento resultó más complejo en cuanto a las actividades de las diferentes enzimas (SOD, CAT, POX APX) ya que si bien en ambos tratamiento (PSF-2 y

PSF-10) las mismas experimentaron un patrón de fluctuación similar, sólo las PSF-10 mostraron una actividad enzimática inferior a la de las PSNF durante los primeros estadios de la germinación (0-3 DG). Esto sugiere que la rápida recuperación de las defensas antioxidantes de las PSF-2 resulta compatible con la disminución del contenido de MDA durante ese periodo. A pesar que no existe bibliografía que describa el comportamiento de las enzimas de plántulas provenientes de semillas sometidas a algún tipo de estrés, trabajos en otras especies muestran que al aumentar las defensas antioxidantes ya sea por algún tipo de sustancia exógena, o alguna modificación genética, las plantas toleran mejor las condiciones de estrés disminuyendo así el daño oxidativo durante los estadios tempranos de la germinación (Nasibi y Kalantari, 2009; Xi y col., 2010; Nasibi, 2011; Xuexia y col., 2011) La actividad enzimática y los valores del contenido de MDA en las PSNF y las PPSO mostraron pequeñas diferencias confirmando el rol de la luz sobre los indicadores de estrés oxidativo evaluados.

La producción del radical  $O_2^{\cdot -}$  en los cotiledones de las PSF exhibió un patrón de localización similar al del daño histológico. Este hecho es congruente con la presencia de cloroplastos con alteraciones morfológicas en las zonas del cotiledón donde se produce el radical. Por otra parte, no se descarta que la actividad enzimática antioxidante se mantenga en valores elevados como un mecanismo de protección de los tejidos meristemáticos lo que permitiría que los primordios no resulten afectados en plántulas con una alta producción del radical  $O_2^{\cdot -}$ .

## Capítulo 4

### CONCLUSIONES

A diferencia de lo que ocurre en una semilla ortodoxa típica, los tejidos embrionarios de las semillas de sauce presentan cloroplastos que no desdiferencian durante la maduración del secado, conservando la clorofila y manteniendo su sistema de endomembranas intacto. Debido a que las membranas tilacoides son los principales sitios para la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), resulta inevitable que sean afectadas o dañadas cuando las semillas son expuestas a la luz. Otra atipicidad que presentan estas semillas es que durante la hidratación controlada ocurre un descenso de la germinación normal (GN) que es seguido por una recuperación de la misma.

Los estudios realizados en esta tesis doctoral permiten concluir que:

- Debido a la presencia de clorofila, la luz y el oxígeno promueven un importante proceso oxidativo mediado por ERO y RL (fotooxidación).
- Estas semillas carecen de endosperma y poseen un tegumento delgado y transparente, por lo que la fotooxidación es mayor en los tejidos más externos, y por lo tanto más expuestos a la luz.
- La fuerte disminución de la fracción glicolípídica de los AGPI apunta a que las membranas tilacoides son un blanco preferencial de ataque de los agentes oxidantes lo que es confirmado por las imágenes de microscopía electrónica de transmisión que prueban el daño producido en la grana de los cloroplastos.
- Cuando las semillas son sometidas a *hidratación controlada (priming)*, se produce, al comienzo de la imbibición, un estallido oxidativo el cual ya ha sido reportado en semillas de otras especies. En las de sauce resulta particularmente intenso, produciendo un nivel de daño que se ve reflejado en el descenso de la GN.
- El estallido oxidativo está potenciado por dos peculiaridades de las semillas: un elevado nivel basal de ERO como resultado de la presencia de clorofila y una importante peroxidación lipídica, producto del alto contenido de membranas que se mantiene en las células de los embriones maduros.

- En el estallido oxidativo, el  $O_2^{\cdot -}$  se revela como un importante agente oxidante.
- A mayores tiempo de *priming* el daño causado por el estallido oxidativo es revertido debido a un mayor tiempo de actuación de los mecanismos de reparación y de las defensas antioxidantes que conducen a la recuperación de la GN.
- En ausencia de *priming* (esto es, hidratación no controlada) el menor tiempo de actuación de los mecanismos de reparación y de las defensas antioxidantes se ve reflejado en un aumento de la geminación anormal.
- El daño fotooxidativo producido en los tejidos es irreversible debido a que afecta el crecimiento y la diferenciación celular.
- En los cotiledones fotooxidados, la producción del  $O_2^{\cdot -}$  está estrechamente vinculado a las alteraciones morfológicas que presentan los cloroplastos.
- Cuando la fotooxidación no alcanza a dañar el meristema apical del brote, las plántulas pueden sobrevivir si desarrollan mecanismos que les permitan superar los daños, como: i) generación prematura de los primordios foliares, lo que compensa la reducción de la capacidad fotosintetizante de los cotiledones dañados, ii) rápida activación de las defensas antioxidantes lo cual reduce el daño peroxidativo y evita que se extienda a los tejidos meristemáticos.

Estas conclusiones confirman que la semilla de sauce constituye un modelo de estudio novedoso en el campo de conservación de semillas y otros biomateriales

## Capítulo 5

### BIBLIOGRAFÍA

- Aeibi, H. 1984.** Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 105: 121-126.
- Arnon DI. 1949.** Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24: 1-15.
- Asada K, Endo T, Mano J. and Miyake C. 1998.** Molecular mechanisms of relaxation and protection from light stress. In: *Stress Responses of Photosynthetic organisms*, (ed. K Satoh and N Murata), pp. 37–52. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Asada K. 1994.** Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: *Cause of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants*, (ed. CH Foyer and PM Mullineaux), pp. 77-104. London: CRC Press.
- Asada K. 2006.** Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391–396
- Asada K. and Takahashi M. 1987.** Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: *Photoinhibition* (ed. DJ Kyle, CB Osmond and CJ Arntzen), pp. 227–287. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Bailly C, 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, Bogatek-Leszczynska R, Come, D, Corbineau F. 2002.** Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. *Seed Sci Res* 12: 47-55.
- Bailly C. 2004.** Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci Res* 14: 93-107.
- Beaucham C, Fridovich I. 1971.** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Bioch* 44: 276-287.
- Benson EE. 1990.** Free radicals damage in stored plant germoplasm. Rome: International Board or Plant Genetic Resources.
- Berlet B, Stadtman E. 1997.** Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 272: 20313-20316.

- Bernal-Lugo I, Leopold AC. 1998.** The dynamics of seed mortality. *J Exp Bot* 49: 1455–1461.
- Bestwick CS, Brown IR, Bennet MHR, Mansfield JW. 1997.** Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* 9, 209–211.
- Bewley JD, Black M. 1994.** Seeds physiology of development and germination. Plenum Press. New York and London.
- Boveris A, Puntarulo SA, Roy AH, Sánchez RA. 1984.** Spontaneous chemiluminescence of soybean axis during imbibition. *Plant Physiol* 76: 447-451.
- Boveris A, Varsavsky AI, Gonçalves Da Silva, S, Sanchez RA. 1983.** Chemiluminescence of soybean seeds: spectral analysis, temperature dependence and effect of inhibitors. *Photochem Photobiol* 38: 95-105.
- Boveris A , Cadenas E , Reiter R. 1980.** Organ chemiluminescence: noninvasive assay for oxidative radical reactions. *Proc Natl Acad Sci USA (Plant Biol. )*. 77: 347 - 351.
- Bradford K. 1986.** Manipulation of seed water relations via osmotic to improve germination under stress conditions. *Hortic Sci* 21: 95
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Bioch* 72: 248.
- Brinkman KA. 1974.** In *Seeds of Woody Plants in the United States*, edited by C.S. Schopmeyer, pp. 336-342. Agriculture Handbook No. 450. Forest Service, U.S. Department of Agriculture, Washington D.C
- Bronner R. 1975.** Simultaneous demonstration of lipids and starch in plant tissues. *Stain Tech* 50: 1-4
- Burgass RW, Powell AA. 1984.** Evidence for repair processes in the invigoration of seeds by hydration. *Ann Bot* 53: 753-757.
- Causin HF, Láinez VR, Maroder H. 2008.**  $O_2^-$  radicals and  $H_2O_2$  have distinct roles in the regulation of root growth in *Salix* seedlings. X Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología, *Biocell* 33 (2), pp. A203.
- Causin HF, Roberts IN, Criado MV, Gallego SM, Pena LB, Ríos MC, Barneix AJ. 2009.** Changes in hydrogen peroxide homeostasis and cytokinin levels contribute to the regulation of shade-induced senescence in wheat leaves. *Plant Sci* 177: 698-704.

- Chandra Sekhar KN, DeMason DA 1989.** Differential activity of acid phosphatase from the endosperm and haustorium of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Can J Bot* 67: 1096-1102.
- Chandra Sekhar KN, DeMason DA 1990.** Identification and immunocytochemical localization of  $\alpha$ -galactosidase in resting and germinated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seed. *Planta* 181: 53-61.
- Chen L, Han Y, Jiang H, Korpelainen H, and Li C. 2011.** Nitrogen nutrient status induces sexual differences in responses to cadmium in *Populus yunnanensis*. *J Exp Bot* 62: 5037-5050
- Chen W, Xing D, Wang J, and He Y. 2002.** Rapid determination of rice seed vigour by spontaneous chemiluminescence and singlet oxygen generation during early imbibition. *Luminescence* 18: 19–24.
- Cheng M, McPhee KE, Baik BK. 2004.** Bleaching of green peas and changes in enzyme activities of seeds under simulated climatic conditions. *J Food Sci.* 69: 511-518.
- Chitnis, PR. 1996.** Photosystem I. *Plant Physiol* 111: 661–669.
- Chiu KY, Chen CL, Sung JM. 2002.** Effect of priming temperature on storability of primed sh-2 sweet corn seed. *Crop Sci* 42: 1996–2003.
- Chiu KY, Chen CL, Sung JM. 2003.** Partial vacuum storage improves the longevity of primed sh-2 sweet corn seeds. *Scientia Hortic* 98: 99–111.
- Chiu KY, Chen CL, Sung JM. 2005.** Why low temperature primed sh-2 sweet corn seeds have better storability: some physiological clues. *Seed Sci and Techn* 33: 199-213.
- Chiu KY, Wang CS, Sung JM. 1995.** Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging and hydration of watermelon seeds differing in ploid. *Physiol Plant* 94: 441-446.
- Chojnowski M, Corbineau F, Côme D. 1997.** Physiological and biochemical changes induced in sunflower seeds by osmopriming and subsequent drying, storage and aging. *Seed Sci Res* 7: 323-331.
- Corbineau F, Gay-Mathieu C, Vinel D, Côme D. 2002.** Decrease in sunflower (*Helianthus annuus*) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. *Physiol Plantarum* 116: 489–496.
- Dalton DA. 1995.** Antioxidant defenses of plants and fungi. In: *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology.* (ed S Ahmad) pp 298–355 Chapman & Hall, New York.

- Dell'Aquila A, Spada P. 1992.** Regulation of protein synthesis in germinating wheat embryos under polyethylene glycol and salt stress. *Seed Sci Res* 2: 80.
- DeMason DA, Sexton R, Gorman M, Reid JSG. 1985.** Structure and biochemistry of endosperm breakdown in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Protoplasma* 126: 159-167.
- Deming-Adams B, Gilmore AM, Adams IIIWW. 1996.** Carotenoids 3: *in vivo* function of carotenoids in higher plants. *FASEB* 10: 403-412.
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH. 1990.** Effect of moisture content and method of rehydration on the susceptibility of pea seeds to imbibition damage. *Seed Sci and Technol* 18:131-137.
- Ellis RH, Roberts EH. 1980.** The influence of temperature and moisture on seed viability period in barley (*Hordeum distichum* L.) *Ann Bot* 45: 31-37.
- Ellis RH, Roberts EH. 1981.** The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Sci and Technol* 9: 373-409.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497 – 509.
- Foyer CH. 1996.** Free radical processes in plants. *Bioch Soc Trans* 24: 427-433.
- Gabara B, Skłodowska M, Wyrwicka A, Glińska S, Gapińska M. 2003.** Changes in the ultrastructure of chloroplasts and mitochondria and antioxidant enzyme activity in *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves sprayed with acid rain. *Plant Sci* 164: 507–516
- Gilla SS and Tuteja N. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch* 48: 909-930
- 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.
- Golbeck JH. 1992.** Structure and function of photosystem I. *Annual Review of Plant Physiol and Plant Mol Biol* 43: 293–324.
- Golovina EA, Tikhonov AN, Hoekstra FA. 1997.** An electron paramagnetic resonance spin-probe study of membrane permeability changes with seed aging. *Plant Physiol* 114: 383–389.
- Golovina EA, Tikhonov AN. 1994.** The structural differences between the embryos of viable and nonviable wheat seeds as studied with the ESR spectroscopy of lipidsoluble spin labels. *Bioch Biophys Acta* 1190: 385–392.

- González Flecha B, Llesuy S, Boveris A. 1991.** Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radical Biol and Med* 10: 93–100.
- Grant Reid JS. 1985.** Cell wall storage carbohydrates in seeds –Biochemistry of the Seed “Gums” and “Hemicelluloses”. *Adv Bot Res* 2: 125-155.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999.** *Free Radical in Biology and Medicine*, 3rd ed. New York: Oxford University Press.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2006.** *Free radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. New York: Oxford University Press.
- Hendry GAF. 1993.** Oxygen, free radical processes and seed longevity. *Seed Sci Res* 3: 141–153.
- Hodges MD, De Long JM, Forney CF, Prange RK. 1997.** Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604 – 611.
- Hong TD, Linington S & Ellis RH. 1996.** Seed storage behaviour: a compendium (Electronic version). Rome: International Plant Genetic Resource Institute.
- Inskeep WP, Bloom PR. 1985.** Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80 % acetone. *Plant Physiol* 77: 483-485.
- ISTA (International Seed Testing Association). 1999.** International rules for seed testing. *Seed Sci and Technol* 27: Supplement, Rules.
- Jeziński A, Czechowski F, Jerzykiewicz M, Chen Y, Drozd J. 2000.** Electron paramagnetic resonance (ESR) studies on stable and transient radicals in humic acids from compost, soil, peat and brown coal. *Spectroch Acta, Part A* 56: 379-385.
- Job C, Rajjou L, Lovigny Y, Belghazi M, Job D. 2005.** Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiol* 138: 790–802
- Johansson E, Olsson O, Nyström T. 2004.** Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279: 22204–22208
- Justin OL, Bass LN. 1978.** Principles and practices of seed storage. *US Dep. Agric. Handb.* 506: 57-77.
- King MW & Roberts EH. 1979.** The storage of recalcitrant seeds. Achievements and possible approaches. Rome: International Board Plant Genetic Resources.
- Knox JP, Dodge AD. 1985.** Singlet oxygen and plants. *Photochem* 24: 889–896.

- Kranner I, Roach T, Beckett RP, Whitaker C, Minibayeva FV. 2010.** Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. *J of Plant Physiol* 167: 805-811.
- Kumar SN and Kasturi Bai KV. 2009.** Photo-oxidative stress in coconut seedlings: early events to leaf scorching and seedling death. *Braz. J. Plant Physiol.* 21: 223-232.
- Leprince O, Buitinik J, Hoekstra FA. 1999.** Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. Exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. *J Exp Bot* 50: 1515-1524.
- Lichtenthaler HK. 1987.** Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzymol* 148: 350–382.
- Liszkay A, van der Zalm E, Schopfer P. 2004.** Production of reactive oxygen intermediates , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and OH by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol* 136: 3114–3123
- Maldonado S & Lott JNA. 1991.** Protein bodies in *Datura stramonium* seeds: structure and mineral nutrient composition. *Can J Bot* 69: 1545-1554.
- Maroder HL, Urrutia ME, Facciuto G, Cerrillos. T. 1996.** Efecto de la temperatura y el contenido de humedad en la germinación de semillas de sauce. *Proceeding 20th. Session of the International Poplar Comission.* Budapest. 604-608.
- Maroder H, Prego I, Maldonado S 2003.** Histochemical and ultrastructural studies on *Salix alba* and *Salix matsudana* seeds. *Trees* 17:193-199.
- Maroder HL, Prego IA, Facciuto GR, Maldonado SB. 2000.** Storage behaviour of *Salix alba* and *Salix matsudana* seeds. *Ann Bot* 86: 1017-1021.
- McDonald MB. 1999.** Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci and Technol* 27: 177-237.
- Muneyuki E; Makino M, Kamata H, KagawaY, Yoshida M, Hirata H. 1993.** Inhibitory effect of NaN<sub>3</sub> on the FOF1 ATPase of submitochondrial particles as related to nucleotide binding. *Biochim Biophys Acta* 1144: 62-68
- Nakano Y, Asada K. 1987.** Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol* 28:131–40.

- Nandi S, Sen-Mandi S, Sinha TP. 1997.** Active oxygen and their scavengers in rice seeds (*Oryza sativa* cv. IET 4094) aged under tropical environmental conditions. *Seed Sci Res* 7: 253-259.
- Nasibi F and Kalantari KM. 2009.** Influence of nitric oxide in protection of tomato seedling against oxidative stress induced by osmotic stress. *Acta Physiol Plantarum* 31: 1037-1044
- Nasibi F. 2011.** Effect of exogenous arginine on alleviation of oxidative damage in tomato plant underwater stress. *J Plant Interact* 1-6.
- O'Brien TP & McCully ME. 1981.** The study of plant structure. Principles and selected methods. pp.357. Termarcarphi Pty Ltd., Melbourne, Australia.
- Oge L, Bourdais G, Bove J, Collet B, Godin B, Granier F, Boutin J-P, 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.
- Ohlrogge JB, Kernan TP. 1982.** Oxygen-dependent aging of seeds. *Plant Physiol* 70: 791-794.
- Oracz K, El-Maarouf Bouteau H, Farrant JM, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau F, Bailly C. 2007.** ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J* 5: 452–465.
- Panza V, Lainez V, Maldonado S. 2004.** Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. *Bot J Lin Soc* 145:445–453.
- Passardi F, Penel C, Dunand C. 2004.** Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci* 9: 534–40.
- Passardi F, Tognolli M, De Meyer M, Penel C, Dunand C. 2006.** Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta* 223: 965–74.
- Pence VC. 1995.** Cryopreservation of recalcitrant seed. En.:Baajaj YPS, ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin: Springer-Verlag, pp 29-30.
- Pólya L. 1961.** Injury by soaking of *Populus alba* seeds. *Nature* 4759: 159-160.
- Ponquett RT, Smith MT, Ross G. 1992.** Lipid autoxidation and seed ageing: putative relationships between seed longevity and lipids stability. *Seed Sci Res* 2: 51-54.
- Priestley DA, Leopold AC. 1983.** Lipid changes during natural aging of soybean seeds. *Physiol Plantarum* 59: 467-470

- Priestley DA. 1986.** Seed aging. Implications for seed storage and persistence in the soil. Ithaca: Cornell University Press.
- Prochazkova D, Sairam RK, Srivastava GC, Singh DV. 2001.** Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Sci* 161:765-771.
- Pukacka S, Kuiper PJC. 1988.** Phospholipid composition and fatty acid peroxidation during ageing of *Acer platanoides* seeds. *Physiol Plantarum* 72: 89–93.
- Rajjou L, Debeaujon I. 2008.** Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds *C. R. Biologies* 331: 796–805.
- Rajjou, L., Lovigny, Y., Groot, S.P.C., Belghazi, M., Job, C. and Job, D. 2008** Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiol* 148: 620-641.
- Reznick AZ, Packer L. 1994.** Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Method Enzymol* 233: 357-363.
- Roberts EH. 1972.** Viability of seeds, New York: Chapman and Hall Ltd.
- Roberts EH 1973a.** Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci Technol* 1:499-514.
- Roberts EH. 1973b.** Loss of viability ultrastructural and physiological aspects. *Seed Sci and Technol* 1: 29-34.
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM. 2004.** Cadmium-induced subcellular accumulation of O<sub>2</sub>- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea leaves. *Plant Cell Environ* 27: 1122–1134.
- Saha R, Mandal AK, Basu RN. 1990.** Physiology of seed invigoration treatments in soybean (*Glycine max* L.). *Seed Sci Technol* 18: 269-276.
- Sallon S, Solowey E, Cohen Y, Korchinsky R, Egli M, Woodhatch I, Simchoni O, Kislev M. 2008.** Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. *Science* 320: 1464.
- Seel WE, Hendry GAF, Atherton NR, Lee JA. 1991.** Radical formation and accumulation in vivo, in desiccation-tolerant and intolerant mosses. *Free Radical Res Comm* 15: 133-141.
- Shibuya I, Maruo B, Benson AA. 1965.** Sulfolipid localization in lamellar lipoprotein. *Plant Physiol* 40: 1251-1256.
- Smith MT, Berjak P. 1995.** Deteriorative changes associated with the loss viability of stored desiccation tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: *Seed Development and Germination* (ed. J Kigel, G Galili), pp 701- 746. New York: Marcel Dekker.

- Staehelin LA, Newcomb EH 2000.** Membrane structure and membranous organelles. In: Biochemistry & Molecular Biology of plants (ed Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL.), pp 1–50. Am Soc Plant Physiol, Rockville, Maryland.
- Stanwood PC 1980.** Tolerance of crops seeds to cooling and storage in liquid nitrogen (196 °C). J Seed Technol 5:26-31.
- Stewart RC, Bewley JD. 1980.** Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. Plant Physiol 65: 245–248.
- Sun W, Montagu MV and Verbruggen N. 2002.** Small heat shock proteins and stress tolerance in plants, Biochim. Biophys. Acta 1577:1–9
- Sung JM, Jeng TL.1994.** Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated ageing of peanut seed. Physiol Plantarum 91: 51–55.
- Sutherland MW, Learmonth BA. 1997.** The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase. Free Radical Res 27: 283–289.
- Taleisnik E, Rodríguez AA, Bustos D, Erdei L, Ortega L, Senn ME 2009.** Leaf expansion in grasses under salt stress. J Plant Physiol 166: 1123–114.
- Tanou G, Job C, Belghazi M, Molassiotis A, Diamantidis G, Job D. 2010.** Proteomic signatures uncover hydrogen peroxide and nitric oxide cross-talk signaling network in citrus plants. J Prot Res 9: 5994–6006.
- Tanou G, Job C, Rajjou L, Arc E, Belghazi M, Diamantidis G, Molassiotis A, Job D. 2009.** Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. Plant J 60: 795–804.
- Taylor AG, Allen PS, Bennett MA, Bradford KJ, Burris JS, Misra MK. 1998.** Seed enhancements. Seed Sci Res 8: 245-256.
- Triantaphylidés C, Krischke M, Hoerberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F, Mueller MJ. 2008.** Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. Plant Physiol 148: 960–968
- Vavilin DV, Ducruet JM, Matorin DN, Venediktov PS, Rubin AB 1998.** Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. Photochem Photobiol 42: 233 – 239.
- Vertucci CW, Ellenson JL, Leopold AC. 1985.** Chlorophyll Fluorescence Characteristics Associated with Hydration Level in Pea Cotyledons. Plant Physiol 79: 248-252.

- Vertucci CW, Farrant JM. 1995.** Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: Kigel J, Galili G, eds. Seed development and germination. New York: Marcel Dekker, 237-271.
- Wi S, Chung B, Kim JH, Baek MH, Yang D, Lee JW, Kim JS. 2005.** Ultrastructural changes of cell organelles in Arabidopsis stems after gamma irradiation. J Plant Biol 48: 195-200.
- Wilson DO, McDonald MB. 1986.** The lipid peroxidation model of seed ageing. Seed Sci Technol 14: 269-300.
- Wintermans JFGM. 1960.** Concentrations of phosphatides and glycolipids in leaves and chloroplasts. Bioch Biophys Acta 44: 49-54.
- Wise RR, AW Naylor 1986** Chilling-enhanced photooxidation: the peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. Plant Physiol 83: 272-277
- Wojtyla L, Garnczarska M, Zalewski T, Bednarski W, Ratajczak L, Jurga S. 2006.** A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. J Plant Physiol 16:1207–1220.
- Xi DM, Liu WS, Yang GD, Wu CA and Zheng CC. 2010.** Seed-specific overexpression of antioxidant genes in Arabidopsis enhances oxidative stress tolerance during germination and early seedling growth. Plant Biotechnol J 8:796-806.
- Xu PL, Guo YK, Bai JG, Shang L, Wang XJ. 2008.** Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. Physiol Plant 132: 467-478.
- Xu S, Li JL, Zhang XQ, Wei H, Cui LJ. 2006.** Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. Environ Exp Bot 56: 274–285
- Xuexia W, Weimin Zhu, Hui Z, Haidong D and Hong JZ. 2011.** Exogenous nitric oxide protects against salt-induced oxidative stress in the leaves from two genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Acta Physiol Plantarum 33: 1199-1209.
- Zhang S, Jiang H, Peng S, Korpelainen H, and Li C. 2011.** Sex-related differences in morphological, physiological, and ultrastructural responses of *Populus cathayana* to chilling. J Exp Bot 62: 675-686