



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Determinación de proteínas totales durante la tolerancia a la
deshidratación de semillas de seis especies vegetales distribuidas en el Sur
del Ecuador.**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.

AUTORAS:

Puglla Puchaicela, Alejandra Elisa.

Suquilanda Ambuludí, Nancy del Rocío.

DIRECTOR:

Romero Saritama, José Miguel, Ing

LOJA – ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Ingeniero.

José Miguel Romero Saritama

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

CERTIFICA:

El presente trabajo de fin de titulación: “Determinación de proteínas totales durante la tolerancia a la deshidratación de semillas de seis especies vegetales distribuidas en el Sur del Ecuador” realizado por Puglla Puchaicela, Alejandra Elisa y Suquilanda Ambuludí, Nancy del Rocío; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Septiembre de 2014

f).....

Ing. José Miguel Romero Saritama.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Nosotros Alejandra Elisa Puglla Puchaicela y Nancy del Rocío Suquilanda Ambuludí, declaramos ser autoras del presente trabajo de fin de titulación: “Determinación de proteínas totales durante la tolerancia a la deshidratación de semillas de seis especies vegetales distribuidas en el Sur del Ecuador”, de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo el Ingeniero José Miguel Romero Saritama director del presente trabajo y eximimos expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certificamos que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaramos conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

f.....

Autoras: Puglla Puchaicela, Alejandra Elisa

Suquilanda Ambuludí Nancy del Rocío

Cédula: 11040991788

Cédula. 1104753064

DEDICATORIA

Principalmente dedico este trabajo a Dios por la vida y por permitirme seguir luchando para conseguir mis metas.

A mis padres Marcia y Juan por darme la vida, su paciencia y comprensión. En especial a ti papito por el amor y apoyo incondicional, por tu esfuerzo para darme lo mejor y que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y ser mi gran ejemplo de lucha incansable, por tu confianza y por estar en todo momento para tus hijas, sé que desde el cielo estarás orgulloso de mí esto es para ti papito.

A mis hermanas y mi sobrino Mónica, Diana y Juan Emilio por el cariño, el apoyo y la confianza incondicional son mi motivación para superarme.

A mis amigas que me brindan la alegría para hacer las cosas que mucho más amor y entrega.

Alejandra Puglla

DEDICATORIA

Con mucho amor y entrega este trabajo va dedicado a mi Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban.

A mis padres y hermanos por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles porque creyeron en mí y me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega ya que en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome durante todos los años de estudio. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

Nancy Suquilanda

AGRADECIMIENTO

Nuestra gratitud a Dios por permitirnos estar aquí para dar continuidad a una vida de lucha.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, a la escuela de Bioquímica y Farmacia, y de manera muy especial al Ing. José Miguel Romero, quien con su paciencia y sabiduría nos ha guiado paso a paso el presente trabajo y a todos nuestros maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarnos como personas de bien y preparadas para los retos que pone la vida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORÍA	iv
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I	5
1. PRESENTACION DE FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES	6
1.1. FIN DEL PROYECTO	6
1.2. PROPÓSITO DEL PROYECTO	6
1.3. COMPONENTES DEL PROYECTO	6
CAPÍTULO II	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS	8
2.1. SITIO DE ESTUDIO Y ESPECIES	8
2.2. DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE HUMEDAD	8
2.3. DESHIDRATACIÓN DE SEMILLAS	8
2.4. VIABILIDAD DE SEMILLAS	9
2.5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	10
2.6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	10
2.6.1. Curva de Calibración	10
2.6.2. Cuantificación de Proteínas Totales	11
2.7. ELECTROFORESIS SDS-PAGE	11
2.7.1. Preparación de Geles	11
2.7.2. Preparación de las muestras proteicas	12
2.7.3. Desarrollo de la Electroforesis	12
2.7.4. Tinción de gel	13
CAPÍTULO II	14
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	15
3.1. Viabilidad de las semillas durante la deshidratación.	15
3.2. Contenido de humedad y proteínas totales	25
3.3. Electroforesis SDS-PAGE	30

CONCLUSIONES	37
RECOMENDACIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXOS	44

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Contenido de humedad inicial y los diferentes niveles de deshidratación calculados para las semillas.	8
TABLA 2. Preparación de estándares para la curva calibración de proteínas con una solución patrón de Albúmina Sérica Bovina (4 mg/ml).	10
TABLA 3: Composición del gel separador y del gel empaquetador.	12
TABLA 4: Contenido de humedad, germinación inicial de las semillas y tiempo de secado de las semillas.	15
TABLA 5: Concentración de proteínas totales en ug/ml en especies y sus distintos niveles de deshidratación.	25

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía. N°1. Representación de la germinación de las semillas.	9
Fotografía. N°2. Espectrofotómetro Nanodrop.	11
Fotografía. N°3. Equipo para la Electroforesis.	11
Fotografía. N°4. Desarrollo de la Electroforesis.	13
Fotografía. N°5. Tinción y decoloración del gel.	13

LISTA DE GRAFICAS

- Gráfica 1.** **A)** Variación del Porcentaje de germinación en semillas de *C. spinosa* 16 durante el proceso de deshidratación y tiempo de germinación. La línea azul indica el tiempo de germinación. **B)** Correlación entre el contenido de humedad (CH) y porcentaje de germinación con sus diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas.
- Gráfica 2.** **A)** Variación del Porcentaje de germinación en semillas de *I. carnea* 18 durante el proceso de deshidratación y tiempo de germinación. La línea azul indica el tiempo de germinación **B)** Correlación entre el contenido de humedad (CH) y germinación con sus diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas.
- Gráfica 3.** **A)** Variación del Porcentaje de germinación en semillas de *I. pauciflora* 19 durante el proceso de deshidratación y tiempo de germinación. La línea azul indica el tiempo de germinación, **B)** Correlación entre el contenido de humedad (CH) y germinación con sus diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas.
- Gráfica 4.** **A)** Variación del Porcentaje de germinación en semillas de *C. platanifolia* 20 durante el proceso de deshidratación y tiempo de germinación. La línea azul indica el tiempo de germinación, **B)** Correlación entre el contenido de humedad (CH) y germinación con sus diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas.
- Gráfica 5.** **A)** Variación del Porcentaje de germinación en semillas de *C. glabrata* 21 durante el proceso de deshidratación y tiempo de germinación. La línea azul indica el tiempo de germinación, **B)** Correlación entre el contenido de humedad (CH) y germinación con sus diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas.
- Gráfica 6.** **A)** Variación del Porcentaje de germinación en semillas de *P. carthagenensis* 23 durante el proceso de deshidratación y tiempo de germinación. La línea azul indica el tiempo de germinación, **B)** Correlación entre el contenido de humedad (CH) y germinación con sus diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas.
- Grafica 7.** Análisis de correlación entre porcentaje de Contenido de humedad 27 (CH) y concentración de proteínas totales (ug/ml), con un intervalo de confianza del 95% **A)** *C. spinosa*, **B)** *I. carnea*, **C)** *I. pauciflora*, **D)** *C. platanifolia*, **E)** *C. glabrata* y **F)** *P. carthagenensis*.
- Gráfica 8.** Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida de semillas de 30

<i>C. spinosa</i> usando (MM) marcador molecular BenchMark™ Unstained Protein Ladder de 10-220 kDa.	
Gráfica 9. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida de semillas de <i>C. platanifolia</i> usando (MM) marcador molecular BenchMark™ Unstained Protein Ladder de 10-220 kDa.	31
Gráfica 10. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida de semillas de <i>C. glabrata</i> usando (MM) marcador molecular BenchMark™ Unstained Protein Ladder de 10-220 kDa.	32
Gráfica 11. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida de semillas de <i>P. carthagenensis</i> usando (MM) marcador molecular BenchMark™ Unstained Protein Ladder de 10-220 kDa.	33
Gráfica 12. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida de semillas de <i>I. carnea</i> usando (MM) marcador molecular BenchMark™ Unstained Protein Ladder de 10-220 kDa.	34
Gráfica 13. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida de semillas de <i>I. pauciflora</i> usando (MM) marcador molecular BenchMark™ Unstained Protein Ladder de 10-220 kDa.	35

LISTA DE ANEXOS

Anexo I. Germinación de Semillas.	44
Anexo II. Extracción de Proteínas.	45
Anexo III. Cuantificación de Proteínas Bradford.	47
Anexo IV. Electroforesis SDS-PAGE.	49

RESUMEN

En el presente estudio se evaluaron patrones electroforéticos de proteínas totales en semillas de seis especie vegetales; *C. spinosa*, *I. carnea*, *I. pauciflora*, *C. platanifolia*, *C. glabrata* y *P. carthagenensis* en diferentes contenidos de humedad. Para extracción del extracto proteico se utilizó 0,5 gr de semilla por especie en 1 ml de tampón de extracción para cada contenido de humedad. Se realizó la cuantificación de proteínas totales mediante el método Bradford con una solución patrón de Albumina Sérica Bovina (BSA), la electroforesis se la realizó mediante la técnica de SDS-PAGE en un minigel en dos tipos de geles, un gel separador al 12% y el gel empaquetador al 5%. Se encontró un mayor número de proteínas totales en las especies de *C. spinosa* y *C. glabrata* semillas que estuvieron a un bajo contenido de humedad.

Palabras claves: Proteínas totales, desecación, electroforesis SDS-PAGE.

ABSTRACT

In this study were evaluated electrophoretic patterns of total protein on six plant species seeds; *C. spinosa*, *I. carnea*, *I. pauciflora*, *C. platanifolia*, *C. glabrata* and *P. carthagenensis* at different humidity contents. For extraction of the protein extract was using 0.5 g of seed per species in 1 ml of extraction buffer for each humidity content. The quantification of total protein was performed using the Bradford method with a standard solution of bovine serum albumin (BSA), the electrophoresis was performed by using the technique of SDS-PAGE on minigel into two kinds of gels, a separating gel 12% and the packer 5% gel. A greater number of total protein in the species *C. spinosa* and *C. glabrata* seeds were at a low humidity content.

Keywords: Total protein, desiccation, electrophoresis SDS-PAGE.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas pueden constituir el 50% o más del peso seco de las células vivas (Dávila-Ortiz, 1996), en las semillas las proteínas se las puede clasificar en tres categorías; proteínas estructurales y metabólicas, proteínas de protección, y proteínas de reserva que son sintetizadas durante el desarrollo de la semilla e hidrolizadas durante la maduración, inhibición y germinación. Proporcionado una de las principales fuentes de carbono, nitrógeno y azufre para el crecimiento y desarrollo de la semilla (Casey & Domoney, 1984; Shewry, 2002). Estas proteínas de reserva en células vegetativas proporcionan una base para las semillas y frutos durante el crecimiento reproductivo y para una rápida expansión de las estructuras vegetativas después del periodo de dormancia, durante la germinación. (Bewley & Black, 1994).

Durante los procesos de deshidratación de semillas existen una concentración relativamente alta de proteínas; las cuales se han denominadas “Abundantes en Embriogénesis Tardía” (Late Embryogenesis Abundant o LEA) (Harada *et al.*, 1989; Bewley & Black, 1994) que protegen a las semillas ante la falta de agua (Galau *et al.*, 1986; Mundy & Chua, 1988).

En base a la tolerancia a la deshidratación, las semillas han sido clasificadas en ortodoxas, recalcitrantes e intermedias. Las semillas ortodoxas toleran contenidos de humedad del 5-10% y periodos largos de almacenamiento a temperaturas bajas. Adquieren la capacidad de tolerar la desecación durante la última etapa de desarrollo, detectándose cambios físicos, fisiológicos y bioquímicos (Pammenter & Berjak, 1999). Mientras que las semillas recalcitrantes no toleran contenido de humedad bajo < 20-30%, no sobreviven en condiciones de sequedad y frío cuando son conservadas *ex situ* (Ramírez, 1982).

Finalmente las semillas intermedias tienen sensibilidad a la desecación hasta un nivel de humedad relativamente bajo de 7 a 10% en equilibrio con una humedad relativa ambiental de 30 - 50% (Baskin, 2000).

La desecación o pérdida de agua por parte de la semilla es esencial para la inducción de la dormición, inhibición de la germinación y adquisición de tolerancia a la desecación gracias a la acumulación de proteínas totales (Cumming *et al.*, 1999).

La sensibilidad diferencial a la deshidratación entre semillas recalcitrantes de diversas especies es claramente mostrada por sus diferentes respuestas cuando se les somete al mismo régimen de secado. Algunas especies toleran solamente un ligero grado de deshidratación, aunque otras sobreviven a contenidos de agua más bajos. También

hay diferencias marcadas en las tasas de deshidratación de semillas de diversas especies bajo las mismas condiciones de deshidratación (Farrant, Pammenter & Berjak, 1989).

Luego de la desecación de semillas es necesario conocer la concentración de las proteínas para establecer la relación entre una cierta concentración de proteína y una cierta absorción de las mismas, un procedimiento para la determinación de la concentración de proteínas en las semillas, es el análisis Bradford; es un método sensible (1-15 μg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación, como los detergentes y las soluciones básicas. (Bradford, 1976; Fernández, 2007).

El fin de la presente investigación fue conocer la capacidad que pueden tener las semillas a tolerar la deshidratación y evaluar patrones electroforéticos de proteínas totales durante la deshidratación. El conocer estos parámetros en semillas puede ser un aporte muy importante para mejorar la conservación *ex situ* de diferentes especies vegetales.

CAPÍTULO I
PRESENTACION DE FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES

1.1. Fin del proyecto

Aportar con información base sobre la tolerancia a la desecación y proteínas totales en semillas de especies distribuidas en el sur del Ecuador que nos permita apoyar la conservación *ex situ* de especies vegetales.

1.2. Propósito del proyecto

- ❖ Determinar la cantidad de proteínas totales presentes durante el proceso de deshidratación de semillas y evaluar patrones electroforéticos de seis especies distribuidas en el sur del Ecuador.

1.3. Componentes del proyecto

- ❖ Determinar el nivel de humedad al cual las semillas sobreviven durante la deshidratación.
- ❖ Determinar patrones electroforéticos de proteínas totales durante la deshidratación de semillas.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sitio de estudio y especies

La investigación se efectuó en el Laboratorio del Banco de Germoplasma – Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja, y se trabajó con semillas maduras de las siguientes especies; *Caesalpinia spinosa* (Feuillée ex Molina) Kuntze, *Ipomoea carnea* Jacq, *Ipomoea pauciflora* M. Martens & Galeotti, *Cavanillesia platanifolia* (Bonpl.) Kunth, *Caesalpinia glabrata* Kunth, *Piscidia carthagenensis* Jacq.

2.2. Determinación de contenido de humedad

Para determinar el contenido de humedad inicial (CHI) de las semillas se utilizó el método de secado a temperatura baja y constante, para cada especie se usaron dos réplicas de 20 semillas que fueron colocadas en estufa a $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 17 ± 1 horas (ISTA.2005). Finalizado el procedimiento se calculó el CH utilizando la siguiente fórmula:

$$[\%CH = (\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) / \text{Peso inicial} \times 100].$$

2.3. Deshidratación de semillas

Con los valores del contenido de humedad inicial (CHI), se procedió a calcular los diferentes niveles a deshidratar (tabla 1) para cada una de las especies en base a la metodología de Thomsen (2000).

Para todas las especies, la deshidratación se realizó con el gel de sílice; las semillas fueron pesadas diariamente hasta alcanzar los pesos de los niveles de deshidratación expuestos en la tabla 1.

TABLA 1. Contenido de humedad inicial y los diferentes niveles de deshidratación calculados para las semillas.

Especies	Contenido de Humedad Inicial %	Niveles de Deshidratación %
<i>Caesalpinia spinosa</i>	5.96	C25, 20, 15, 12, 9, 6
<i>Ipomoea carnea</i>	8.15	7, 6, 3
<i>Ipomoea pauciflora</i>	16.94	15, 12, 9, 6, 3

<i>Cavanillesia platanifolia</i>	24.74	20, 15, 12, 9, 6
<i>Caesalpinia glabrata</i>	54.90	45, 40, 35, 25, 10
<i>Piscidia carthagenensis</i>	68.97	50, 40, 30, 20, 10, 5

Fuente: Las Autoras

2.4. Viabilidad de semillas

El porcentaje de germinación acumulada al final del ensayo fue el indicador que utilizamos para determinar la viabilidad de las semillas.

Una vez deshidratadas las semillas en los diferentes niveles humedad, se tomó una muestra de las semillas en cada uno de ellos y se realizó la prueba de germinación (Anexo I) utilizando dos réplicas de 25 semillas para *C. spinosa*, 20 semillas para *I. pauciflora* y *P. carthagenensis* y 10 semillas para las especies de *I. carnea*, *C. platanifolia* y *C. glabrata*. Las semillas fueron colocadas en cajas Petri sobre papel absorbente humedecido con agua destilada; mantenidas en los germinadores bajo un régimen de: 12 horas luz y 12 horas de oscuridad; con una temperatura de $19^{\circ}\text{C} \pm$; y humedad $40\% \pm$. La emergencia de 3-4 mm de la radícula fue el criterio que se utilizó para determinar si una semilla ha germinado en todas las especies (Carrillo, 1992) (Fotografía 1).

Fotografía. N°1. Representación de la germinación de las semillas.



Fuente: JM Romero (banco de Germoplasma UTPL)

2.5. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas a las semillas se realizó en cada uno de los niveles de deshidratación y para cada especie. Para obtener el extracto proteico, se macero sobre un mortero 0,5 gr de semillas en 1ml de tampón de extracción (Tris – HCl 0.01 M pH 7.0; 0,1% Mercaptoetanol, Ácido ascórbico 0,05 M, 0,1% Tritón) y nitrógeno líquido, hasta obtener una muestra homogénea; se centrifugó durante 45 minutos a 12.000 rpm a -4°C, se separó el sobrenadante y se lo conservó a – 20° C hasta su uso. (Anexo II)

2.6. Cuantificación de proteínas

2.6.1. Curva de Calibración

La curva de calibración se preparó con una solución patrón de Albúmina Sérica Bovina (BSA-Sigma) de concentración 4 mg/ml, a partir de ésta solución se prepararon las diluciones a las concentraciones que se indican en la tabla 2. (Anexo III)

TABLA 2. Preparación de estándares para la curva calibración de proteínas con una solución patrón de Albúmina Sérica Bovina (4 mg/ml).

Concentración	1/1	1/2	1/4	1/8	1/18	1/32	1/74
mg/ml	4	2	1	0,5	0,25	0,124	0,054

Fuente: Las Autoras

A cada una de las diluciones se adicionó 145µl de reactivo de Bradford (Azul de Comassie G- 250, Sigma), se incubó por 20 minutos en oscuridad y se leyó absorbancia a 595 nm en el Espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Fotografía 2).

Fotografía. N°2. Espectrofotómetro Nanodrop



Fuente: Las Autoras

2.6.2. Cuantificación de Proteínas Totales

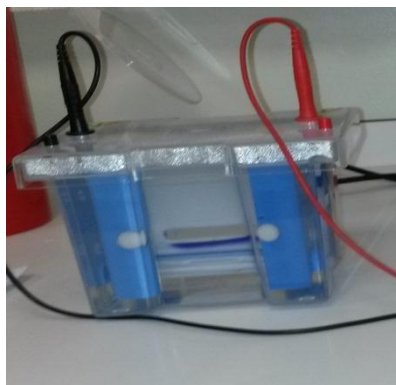
Realizada la curva de calibración, se cuantificó las proteínas totales para cada uno de los niveles de deshidratación en todas las especies, para ello se tomaron 5 µl de la muestra y se homogenizó con 145 µl de reactivo de Bradford y se realizó la lectura en el espectrofotómetro nanodrop. (Anexo III)

2.7 Electroforesis SDS-PAGE

2.7.1 Preparación de los geles

Para la electroforesis se utilizó el equipo Enduro™ Modular Vertical PAGE System de la casa comercial Labnet (Fotografía 3). Se realizaron geles de 0,75 mm de espesor, cada gel constó de un gel concentrador o superior que contuvo los pocillos para cargar las muestras, y un gel separador o inferior.

Fotografía. N°3. Equipo para la Electroforesis



Fuente: Las Autoras

Las soluciones utilizadas para la preparación del gel separador y empaquetador se presentaron en la tabla 3.

TABLA 3: Composición del gel separador y del gel empaquetador

Solución	Gel separador 12% 6ml	Gel empaquetador 5% 4ml
Acrilamida mix 40%	1.8ml	500µl
1.5 M Tris HCL pH 8.8	1.56ml	346.64µl
Agua destilada	2.52ml	3.06ml
SDS 10%	60µl	40µl
TEMED	2.4µl	4µl
APS 10%	60µl	40µl

Fuente: Las Autoras

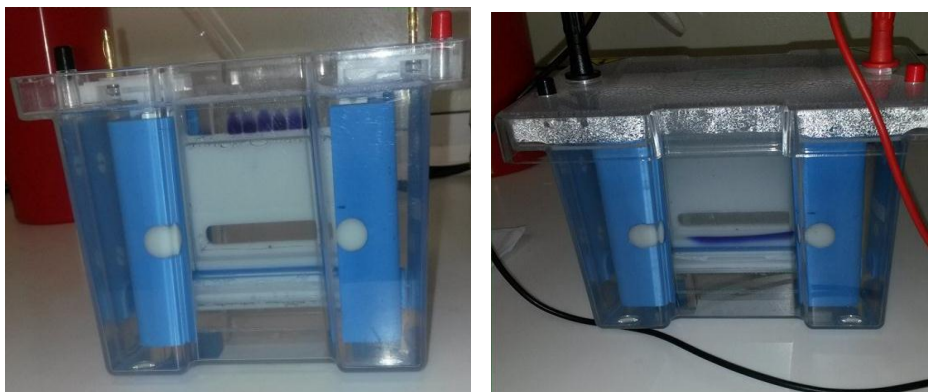
2.7.2 Preparación de las muestras proteicas

El extracto de proteína almacenado fue descongelado, para lo cual se utilizó tampón de desnaturalización de proteínas 6X con 30ug de muestra a partir de las concentraciones obtenidas por el método Bradford. Se calculó el volumen necesario para los 30 µg en una relación 5:1 (25 µl volumen extracto: 5 µl volumen buffer). La cantidad de muestra que utilizamos para la corrida electroforética fue de 15 µl.

2.7.3 Desarrollo de la electroforesis

Polimerizados los geles se colocaron en la cámara de electroforesis con el buffer de corrida las muestras y el marcador de 10-220 kDa (BenchMark™ Unstained Protein Ladder), se aplicó una corriente eléctrica de 120V para el gel empaquetador (superior) y 300 miliamperios por una hora y 200V y 300 miliamperios por un periodo de 3 horas aproximadamente para el gel separador (inferior) (Fotografía 4), se aplicó el mismo procedimiento para todas las especies en estudio. (Anexo IV)

Fotografía. N°4. Desarrollo de la Electroforesis

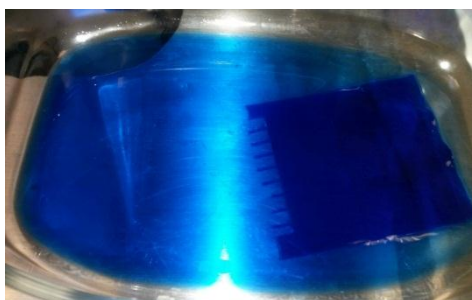


Fuente: Las Autoras

2.7.4 Tinción del gel

Finalizada la electroforesis se realizó la tinción de los geles para identificar las bandas utilizando una solución colorante de azul de Coomassie (0,25% de Coomassie Brilliant Blue R250, 45% etanol, 10% ácido acético), por 1 hora en agitación continua; y se destiñeron con una solución decolorante (metanol 50%, ácido acético 10%) durante dos horas con varios cambios de la solución hasta que las bandas fueron visibles (Fotografía 5).

Fotografía. N°5. Tinción y decoloración del gel



Fuente: Las Autoras

Para el análisis de resultados de los geles de electroforesis se utilizó el programa Gel-Analyzer que mediante un proceso de análisis de imágenes de gel cubre los principales aspectos de la evaluación de la detección automática para cálculos precisos de pesos moleculares.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Viabilidad de las semillas durante la deshidratación.

Como podemos observar en la tabla 4, el tiempo de deshidratación para alcanzar el contenido de humedad esperado mostró una notable variación para cada una de las especies siendo *C. spinosa* la que presentó un mayor rango que fue desde 2 a 149 días, esto pudo deberse a que estas semillas según Figueroa & Jaksic (2004), presentan una latencia mecánica es decir las cubiertas de las semillas son duras como para permitir que la semilla pierda agua desde su interior, mientras que para *I. carnea*, *I. pauciflora*, *C. glabrata* tardaron de 2 a 3 días, *P. carthagenensis* de 1 a 2 días y *C. platanifolia* 3 a 4 días, esto pudo atribuirse a que según el contenido de humedad inicial y al momento de coleccionar las semillas de las *Ipomoeas*, *C. glabrata* y *P. carthagenensis* estas presentaron un contenido de humedad bajo y posiblemente no estuvieron completamente maduras al momento de la recolección, por tal razón se deshidrataron en corto tiempo, siendo la testa en este estado permeable es decir aún no se endurecía, por otra parte las semillas de *C. platanifolia* se deshidrataron en un tiempo relativamente corto esto pudo ser atribuido a que esta semilla está rodeada de testa delgada lo que facilitó a la semilla perder agua. (Pukacka & Ratajczak, 2005).

TABLA 4: Contenido de humedad, germinación inicial de las semillas y tiempo de secado de las semillas.

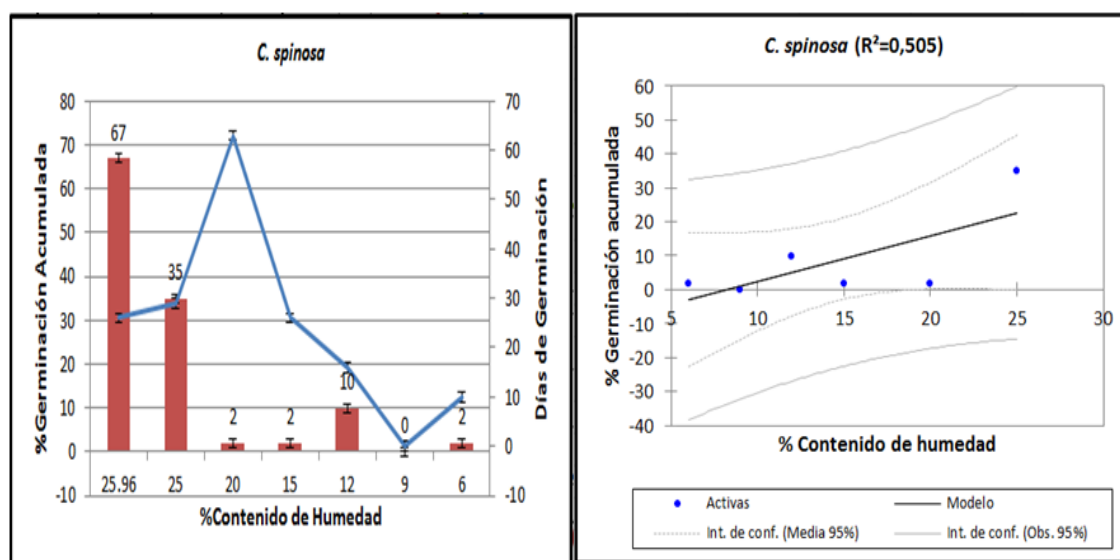
Especie	Contenido de humedad inicial (%)	Germinación inicial (%)	Tiempo de secado (días)
<i>C. spinosa</i>	25,96	67 $\pm$ 2.8	2 a 149
<i>I. carnea</i>	8,15	45 $\pm$ 0.5	2 a 3
<i>I. pauciflora</i>	16,94	76 $\pm$ 0	2 a 3
<i>C. platanifolia</i>	24,74	65 $\pm$ 0.9	3 a 4
<i>C. glabrata</i>	54,90	64 $\pm$ 1.9	2 a 3
<i>P. carthagenensis</i>	68,97	42 $\pm$ 0.3	1 a 2

Fuente: Las Autoras

En las siguientes gráficas se detalla el análisis de resultados para cada una de las especies para lo cual se utilizó el programa XLstat.

Caesalpinia spinosa

Con respecto a la viabilidad de las semillas, la germinación acumulada de *C. spinosa* fue de 67% en el contenido de humedad del 25.96% perdiendo viabilidad luego de ser deshidratadas como se muestra en la tabla 4, mientras el contenido de humedad descende la germinación también baja alcanzando solamente un 2% de germinación cuando las semillas llegan al 6% de humedad como se observa en la gráfica 1, esto significa que a pesar que algunas semillas puedan sobrevivir a bajos contenidos de humedad, la germinación también tiende a bajar considerablemente perdiendo hasta un 90% de germinación,



Gráfica 1. A) Variación del Porcentaje de germinación en semillas de *C. spinosa* durante el proceso de deshidratación y tiempo de germinación. La línea azul indica el tiempo de germinación. **B)** Correlación entre el contenido de humedad (CH) y porcentaje de germinación con sus diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas.

Los resultados se reflejan en el análisis de regresión lineal donde existe una relación moderada positiva ($R^2 = 0,505$) entre el CH y el porcentaje de germinación acumulada. Esta tendencia puede deberse a que en algunos casos, la testa de las semillas presentan dormancia, pudiendo ser mecánica debido a que su testa es gruesa y dura pero permeable o química por la presencia de sustancias inhibitoras (Suttie, 2003). Mientras que para el contenido de humedad de 12% la germinación se incrementó a un 10% esto pudo ser debido a que estas semillas alcanzaron su maduración fisiológica a diferencia de los niveles 20, 15, y 6% en donde las semillas presentaron

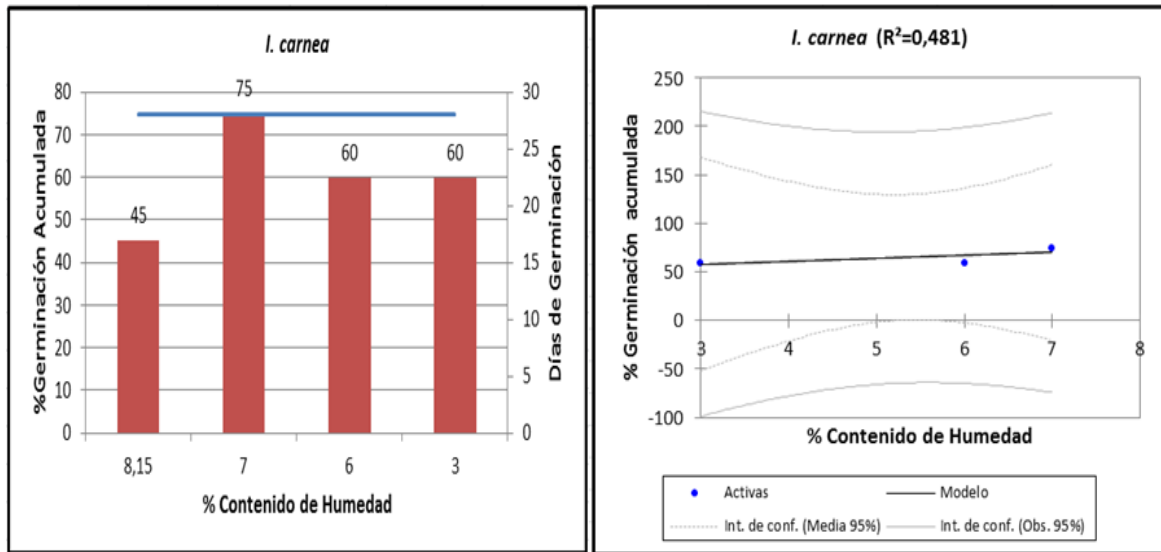
una germinación muy baja del 2% que probablemente se dio por que estas no estaban en su estado morfológico maduro es decir presentaban una latencia morfológica o endógena (Figuerola & Jaksic, 2004).

Finalmente en el contenido de humedad de 9% las semillas no germinaron debido a un factor o a una combinación de factores, entre los cuales principalmente se puede mencionar la presencia de sustancias inhibidoras que pudieron adquirir por el largo tiempo que las semillas fueron sometidas a deshidratación (Rodríguez, 1994).

El tiempo de germinación de *C. spinosa* como se observa en la gráfica 1A, fue muy variable para cada nivel de contenido de humedad, a pesar que en algunos casos el porcentaje de germinación fue el mismo, esta variación se pudo dar por el nivel de maduración alcanzado en algunas de las semillas de esta especie al momento de la recolección ya que muchas de ellas pudieron ser incapaces de germinar porque necesitan experimentar aun una serie de transformaciones fisiológicas (Warren & Bennett, 1997).

Ipomoea Carnea

Las semillas de *I. carnea* (gráfica 2A) presentaron un contenido de humedad inicial de 8.15% que es relativamente bajo con una germinación de 45%, mientras que en los niveles 7, 6 y 3% de contenido de humedad la germinación se incrementó hasta un 75 y 60% respectivamente, es decir a medida que las semillas perdieron agua, la germinación se incrementó en un 30% más en algunos niveles. Resultados que posiblemente se dieron porque las semillas de esta especie presentan algunas modificaciones estructurales que facilitaron la germinación, es decir que el embrión de la semilla ya haya completado su proceso de diferenciación (Pérez & Pita, 2001). Así mismo se observó que existe una correlación positiva débil ($R=0,481$) entre el contenido de humedad y la germinación (gráfico 2B) esto demuestra que las semillas toleran la desecación (Berjak *et al.*, 1997).

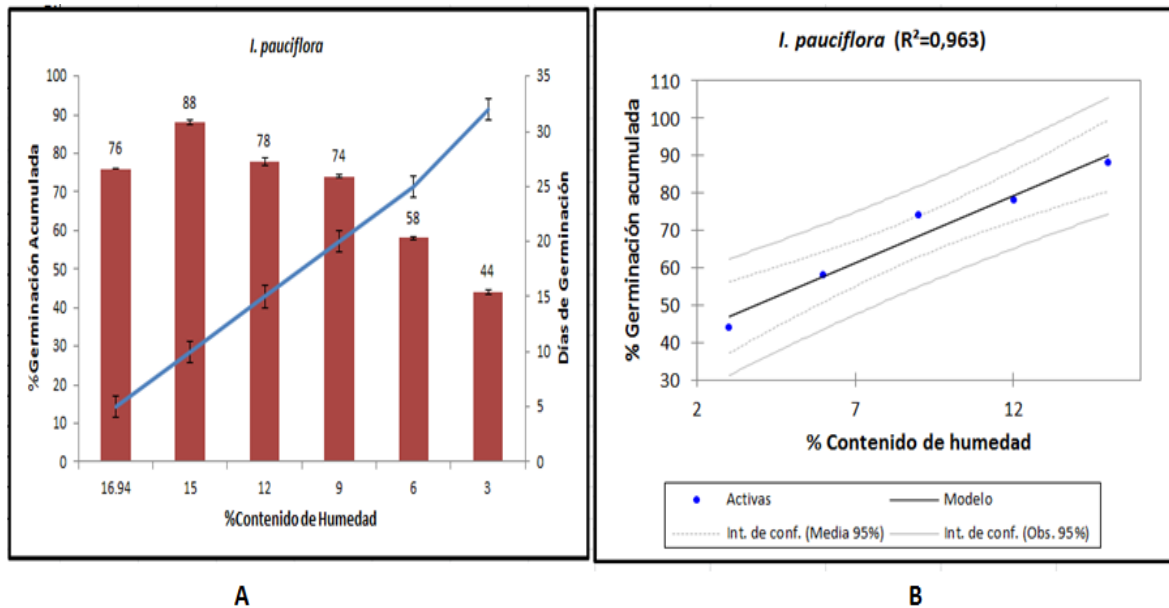


Gráfica 2. A) Variación del porcentaje de germinación en semillas de *I. carnea* durante el proceso de deshidratación y tiempo de germinación. La línea azul indica el tiempo de germinación. **B)** Correlación entre el contenido de humedad (CH) y germinación con sus diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas.

No existe variación en cuanto al tiempo de germinación como se observa en la gráfica 2A ya que en todos los niveles de contenido de humedad las semillas tardaron 28 días en germinar, atribuido al estado morfológicamente maduro, es decir sus embriones completaron el 90% de madurez en la planta (Willan, 1991). Como también, pudo ser porque este tipo de semillas poseen una dura y gruesa testa con la presencia de pelos o vellos que la caracteriza y a la vez facilita a la misma la absorción de requerimientos necesarios para favorecer su germinación. (Pérez & Pita-Villamil, 1999).

Ipomoea pauciflora

Para *I. pauciflora* (gráfica 3A) el contenido de humedad inicial fue bajo (16.94%) pero presentó un alto porcentaje de germinación de 76% permaneciendo viable para todos los niveles de deshidratación, es decir a medida que las semillas se deshidrataron la germinación fue de 88 y 78% en los contenidos de humedad del 15 y 12%, mientras que en los niveles 9, 6 y 3% de contenido de humedad la germinación descendió a un 74, 58 y 44% respectivamente, perdiendo un 32% de viabilidad en los últimos niveles de contenido de contenido de humedad.

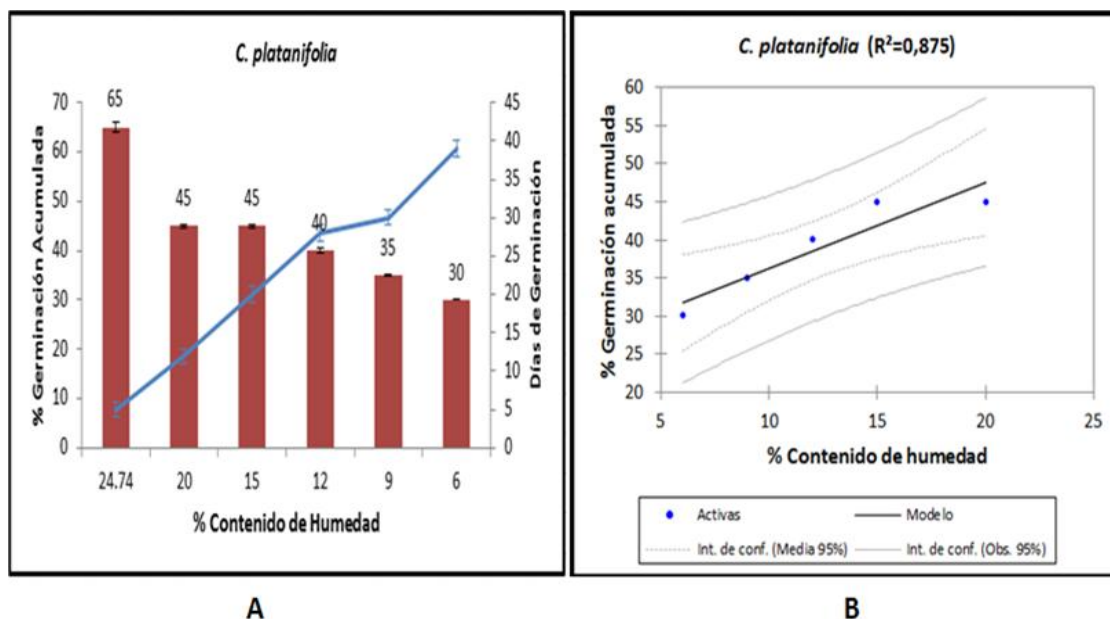


Gráfica 3. A) Variación del porcentaje de germinación en semillas de *I. pauciflora* durante el proceso de deshidratación y tiempo de germinación. La línea azul indica el tiempo de germinación, **B)** Correlación entre el contenido de humedad (CH) y germinación con sus diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas.

Los resultados de los análisis se reflejan en la gráfica 3B en donde nos indica una correlación positiva ($R=0,963$) que nos muestra que a medida que las semillas se deshidrataron la germinación disminuyó, estos resultados pudieron ser debido a que las semillas estuvieron completamente maduras característica importante ya que está íntimamente relacionado con su poder germinativo y se ha comprobado mediante pruebas de germinación que cuando la semilla es madura la misma posee un más alto nivel de calidad fisiológica o vigor y por ende logran germinar (Pérez & Pita, 2001). En estas semillas a diferencia de *I. carnea* el tiempo de germinación fue variable para cada nivel de contenido de humedad siendo así que para el contenido de humedad de 16.94% tardó 5 días y para el contenido de humedad del 3% tardó 32 días, es decir que a mayor contenido de humedad las semillas tardan menos tiempo en germinar se atribuye a que estas semillas a pesar que poseen una latencia física y una testa dura los componentes como agua, oxígeno, luz y temperatura, como también la madurez fisiológica de la semilla fueron los factores que promovieron la germinación en un periodo de tiempo no muy largo como es de 32 días (Kigel & Galili, 1995).

Cavallinesia platanifolia

El porcentaje de germinación acumulada de *C. platanifolia* antes de la deshidratación fue de 65%, pero conforme las semillas se deshidrataron la germinación tendió a bajar notablemente hasta llegar a un 30% de germinación en el contenido de humedad de 6% perdiendo una viabilidad del 35% datos que se expresan en el análisis de regresión lineal (gráfica 4B) donde existe una relación moderada positiva ($R=0.875$) entre el contenido de humedad y el porcentaje de germinación acumulada lo que nos da a entender que conforme las semillas se deshidrataron la germinación tendió a disminuir, resultados que probablemente se dieron porque estas semillas poseen la testa delgada y a la vez permeable lo que ayudó adquirir con facilidad los nutrientes del medio externo y por ende el embrión pudo realizar un metabolismo que promovió la germinación de las semillas (Berjak, *et al.*, 1997), por otra parte la pérdida de viabilidad de las mismas pudo deberse a que en algunas semillas sus embriones no estaban completamente maduros y por ende no fueron viables (Rao, *et al.*, 2007).



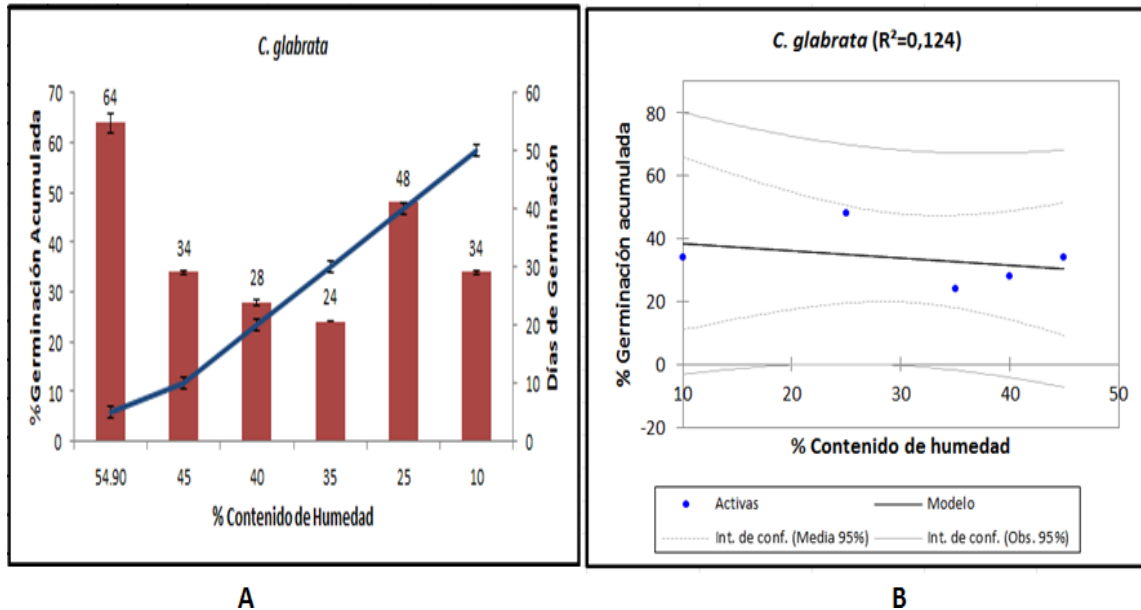
Gráfica 4. A) Variación del porcentaje de germinación en semillas de *C. platanifolia* durante el proceso de deshidratación y tiempo de germinación. La línea azul indica el tiempo de germinación, **B)** Correlación entre el contenido de humedad (CH) y germinación con sus diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas.

Con respecto al tiempo que tardaron las semillas en germinar podemos observar en la gráfica 4A el tiempo de germinación varió de acuerdo al contenido de humedad de las semillas que fue desde el tiempo más corto de 5 días (24.74%) hasta llegar a un

tiempo relativamente largo que fue de 39 días (6%) lo que nos indica que las semillas al poseer un contenido de humedad relativamente alto la germinación también tiende a incrementarse y mientras el contenido de humedad disminuye el tiempo de germinación se extiende, esto pudo deberse a que estas semillas presentaron factores inhibidores que pudieron estar presentes en la cubierta o en el embrión de las semillas, reprimiendo así una germinación favorable esperada (Camacho, 1994), por otra parte según Granhof, J. (1984) las semillas al momento de ser sometidas a la deshidratación estas están siendo preparadas para un periodo de latencia hasta ser reactivadas por si mismas en una siguiente fase en donde puedan germinar.

Caesalpinia glabrata

Las semillas de *C. glabrata* (gráfica 5A) presentaron un contenido de humedad inicial de 54.9% y una germinación del 64% antes de ser deshidratadas, permaneciendo viables en todos los niveles de contenido de humedad que fueron deshidratados pero, perdieron mayor viabilidad en los contenidos de humedad de 40 y 35% es así que conforme las semillas se deshidrataron la germinación bajó considerablemente perdiendo una viabilidad del 30% estos datos se pueden observar en la gráfica 5B que muestra una correlación lineal positiva débil ($R= 0,124$) entre el contenido de humedad y la germinación acumulada. Esto pudo deberse a la dormancia física por impermeabilidad al agua porque poseen una cubierta seminal muy dura donde el embrión puede preservar las semillas con bajo contenido de humedad durante algún tiempo y además probablemente impide que las semillas realicen la absorción de agua y por ende la ruptura de la testa, e iniciar la germinación (Figueroa & Jaksic, 2004; Perry, 1984).



Gráfica 5. A) Variación del porcentaje de germinación en semillas de *C. glabrata* durante el proceso de deshidratación y tiempo de germinación. La línea azul indica el tiempo de germinación, **B)** Correlación entre el contenido de humedad (CH) y germinación con sus diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas.

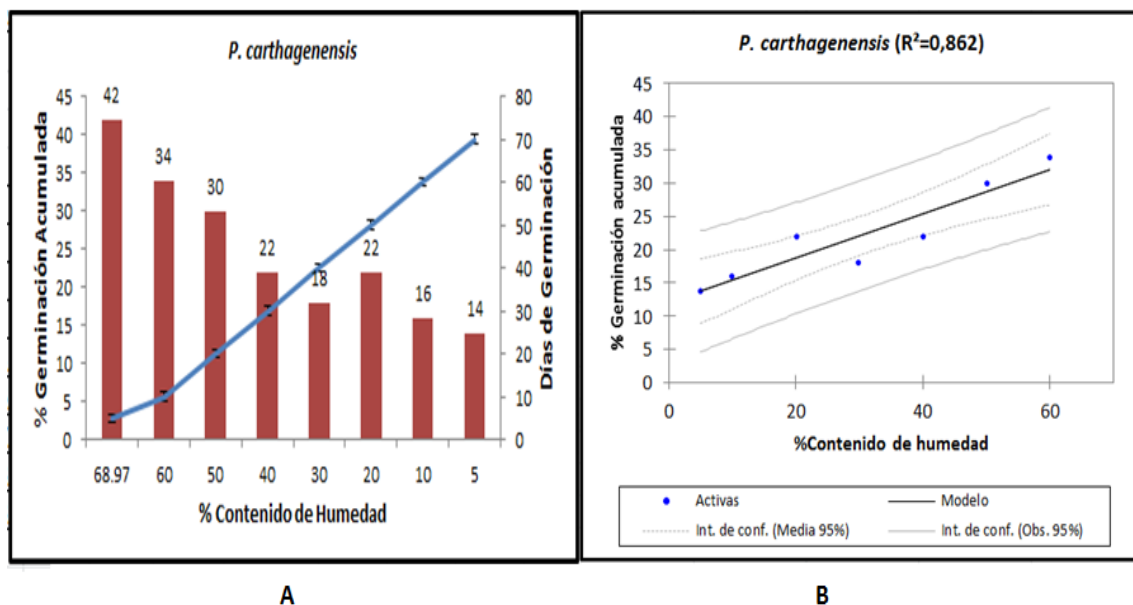
Por otra parte si estas semillas se colocan a germinar bajo condiciones favorables, la germinación puede tardarse hasta que el embrión sufra las modificaciones anatómicas y fisiológicas que le permitan completar su diferenciación y crecimiento (Espinosa, *et al.*, 2012).

En lo que respecta al tiempo que estas semillas tardaron en germinar, podemos observar en la gráfica 5A que a mayor contenido de humedad menor es el tiempo que tardaron las semillas en germinar y a menor contenido de humedad las semillas tardaron más tiempo resultados que pudieron deberse a que las semillas entraron en una fase de dormición que es causada por diferentes mecanismos según las especies y el estado en que se encuentre las semillas como es el caso de esta especie que presentan latencia mecánica debido a la impermeabilidad y consistencia de la testa factores que retardan la germinación de semillas (Rost, *et al.*, 1997).

Piscidia carthagenensis

Las semillas de *P. carthagenensis*, antes de la deshidratación presentaron un contenido de humedad inicial de 68.97% y una germinación del 42%. La capacidad de germinación después de la deshidratación fue considerablemente baja como se

observa en la gráfica 6A llegando a obtener solamente un 14% de germinación en el contenido de humedad del 5% perdiendo una viabilidad del 28% en relación al contenido de humedad inicial (68.97%) al último (5%); es decir a medida que las semillas se deshidrataron, la germinación tendió a bajar considerablemente.



Gráfica 6. A) Variación del porcentaje de germinación en semillas de *P. carthagenensis* durante el proceso de deshidratación y tiempo de germinación. La línea azul indica el tiempo de germinación, **B)** Correlación entre el contenido de humedad (CH) y germinación con sus diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas.

Los resultados también se reflejan en el análisis de regresión lineal donde existe una relación moderada positiva ($R^2= 0,862$) entre el contenido de humedad y el porcentaje de germinación acumulada (gráfica 6B).

Resultados que pudieron deberse a que la mayoría de las semillas presentaron un embrión inmaduro o rudimentario es decir que el embrión no estaba completamente desarrollado cuando la semilla se desprendió de la planta. Según Espinosa *et al.*, (2012) si estas semillas se colocan a germinar bajo condiciones favorables, la germinación se retarda hasta que el embrión sufra las modificaciones anatómicas y fisiológicas que le permitan completar su diferenciación y crecimiento; por otra parte la pérdida de viabilidad de las semillas posiblemente pudo ser porque algunas semillas mueren al agotar sus reservas nutritivas (Azcón-Bieto & Talón, 1993). Por otra parte según Pérez & Pita (2001) este tipo de semillas disminuyen en parte su viabilidad al ser deshidratadas ya que en ese momento es donde sus proteínas se desnaturalizan, y sus requerimientos energéticos se agotan y por ende pierden la capacidad para germinar.

De acuerdo al tiempo en que tardaron las semillas en germinar como podemos observar la gráfica 6A fue totalmente diferente para cada nivel de contenido de humedad entendiéndose que a mayor contenido de humedad menor es el tiempo requerido para que las semillas germinaran y a menor contenido de humedad mayor es el tiempo que tardaron las semillas para germinar a diferencia que en esta especie el ultimo contenido de humedad que fue del 5% las semillas tardaron 70 días en germinar un tiempo muy extenso en comparación con los demás niveles, esto pudo ser debido a que algunas semillas entran en un periodo en donde sus requerimientos metabólicos se disminuye debido a factores propios de la semilla o factores físicos (Montaldi, 1995).

3.2 Contenido de humedad y proteínas totales

En cuanto a proteínas totales se observará ciertas variaciones para las diferentes especies (Tabla 5). En la especie de *C. spinosa* se obtuvieron los resultados más bajos con respecto a la existencia de proteínas totales en todos sus niveles de deshidratación al igual que en *I. carnea* seguido por un resultado intermedio en la especie de *C. platanifolia* y con un mayor resultado de proteínas totales en *I. pauciflora*, *C. glabrata* y *P. carthagenensis*.

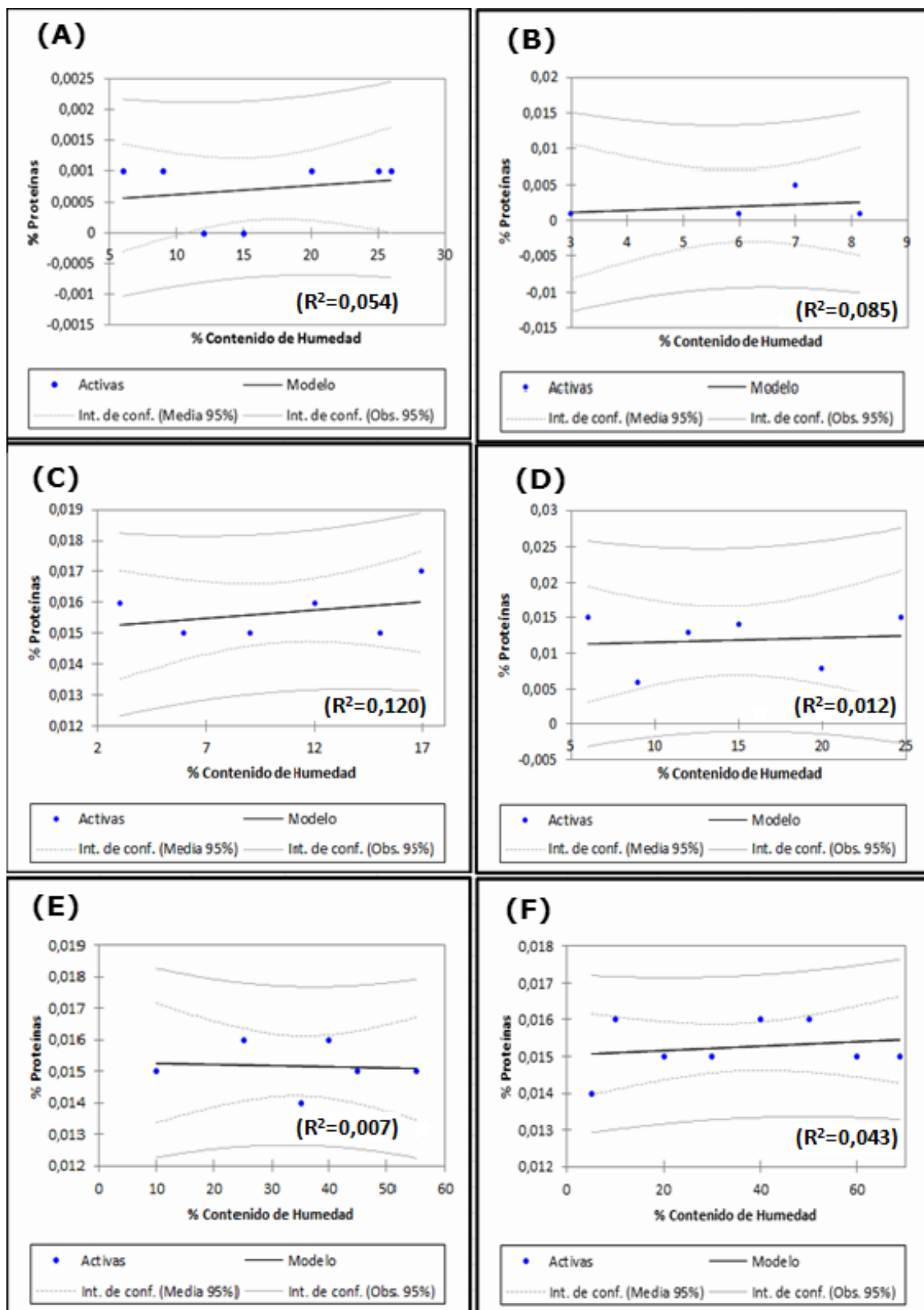
TABLA 5: Concentración de proteínas totales en ug/ml en especies y sus distintos niveles de deshidratación.

Especie	Contenido de Humedad (%)	Proteínas Totales (ug/ml)	Especie	Contenido de Humedad (%)	Proteínas Totales (ug/ml)
<i>C. spinosa</i>	6	0,001	<i>C. platanifolia</i>	6	0,015
	9	0,001		9	0,006
	12	0		12	0,013
	15	0		15	0,014
	20	0,001		20	0,008
	25	0,001		24,7	0,015
	25,96	0,001			
<i>I. carnea</i>			<i>C. glabrata</i>	10	0,015
	3	0,001		25	0,016
	6	0,001		35	0,014
	7	0,005		40	0,016
	8,15	0,001		45	0,015
				54,9	0,015
<i>I. pauciflora</i>			<i>P. carthagenensis</i>	5	0,014
	3	0,016		10	0,016
	6	0,015		20	0,015
	9	0,015		30	0,015
	12	0,016		40	0,016
	15	0,015		50	0,016
	16,9	0,017		60	0,015
				68,9	0,015

Fuente: Las Autoras

Para las especies *I. pauciflora*, *C. glabrata* y *P. carthagenensis* existió un ligero aumento en su concentración de proteínas en todos sus niveles de deshidratación; estas proteínas totales son expresadas bajo condiciones de déficit de agua en varias especies (Ingram y Bartels, 1996, Bray, 1997, Seki *et al.* 2001). Pudo haber influido en alguna de estas especies el estrés por sequía que aumenta el nivel de ABA el cual está implicado en la transducción de señales de la expresión de gen que confiere esta adaptación (Bray, 1997, Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Algunos estudios muestran que algunos genes con respuestas a las bajas temperaturas y que se expresan en condiciones de estrés hídrico no son inducidos mediante tratamientos con ABA (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Los resultados de las correlaciones entre el contenido de humedad y el contenido de proteínas para cada una de las especies se muestran a continuación.



Grafica 7. Análisis de correlación entre el contenido de humedad (CH) y concentración de proteínas totales (ug/ml), con un intervalo de confianza del 95% **A)** *C. spinosa*, **B)** *I. carnea*, **C)** *I. pauciflora*, **D)** *C. platanifolia*, **E)** *C. glabrata* y **F)** *P. carthagenensis*.

Según los resultados de estos análisis para *C. spinosa* (Gráfica 7. A) muestra que a un nivel de confianza de 0,05 existe una débil relación ($R^2= 0,054$) no significativa ($p=0,617$) entre la cantidad de proteínas y el contenido de humedad indicando que no hay diferencia entre las muestras. Los valores del contenido de proteínas son muy bajos pudiendo ser afectados por el déficit hídrico al reducirse el mismo disminuyen las capas de hidratación que rodean las proteínas, ya que en estas condiciones se incrementa la concentración de iones que tienen acceso a las proteínas desprovistas de esta capa de hidratación. Si no existe dicha capa protectora se produce la desnaturalización de proteínas (Buchanam, Gruissem & Jones, 2000).

En *I. carnea* (Gráfica 7. B) el coeficiente de determinación fue 0,085 ($p=0,709$) entre proteínas totales y el contenido de humedad, indicando que no existe una correlación positiva baja entre estas dos variables. El análisis de estos resultados muestra que la cantidad de proteínas totales es menor con respecto a las otras especies bajo condiciones de estrés hídrico, el metabolismo de las proteínas y la síntesis de aminoácidos se ven seriamente afectados. Basta un periodo corto de deshidratación para que se reduzca la actividad y una exposición más prolongada, puede reducir su actividad (Larcher, 2003).

Para *I. pauciflora* (Gráfica 7. C) los datos obtenidos fueron $R^2=0,120$ y su valor de $p=0,501$ existiendo una baja relación entre las variables no es significativa la cantidad de proteínas existentes con el contenido de humedad de las semillas. La cantidad de proteínas totales presentes en esta especie fue mayor con respecto a las demás especies, el aumento de algunos aminoácidos ha sido planteado como una respuesta ante condiciones de estrés (Manur *et al.*, 1994; Yoshiba *et al.*, 1997).

Del mismo modo en *C. platanifolia* (Gráfica 7. D) el coeficiente de determinación fue igual a 0,012 y el valor $p=0,839$ existiendo una correlación positiva muy baja entre proteínas y contenido de humedad no significativa. En investigaciones dirigidas a la respuesta adaptativa durante el estrés hídrico han encontrado proteínas que se acumulan en la fase tardía de la embriogénesis a las que han denominado como proteínas LEA que están presentes cuando la semilla pierde la mayor parte de su contenido de agua dado por el déficit hídrico, por lo que se ha sugerido que tienen una función protectora durante estas condiciones de estrés (Baker, Steele & Dure, 1988; Bray, 1997).

En *C. glabrata* (Gráfica 7. E) el coeficiente de determinación fue $R^2=0,007$ existe una baja relación no significativa ($p=0,874$) entre proteínas totales y el contenido de humedad indicando que no hay diferencia entre las variables. Las proteínas presentes

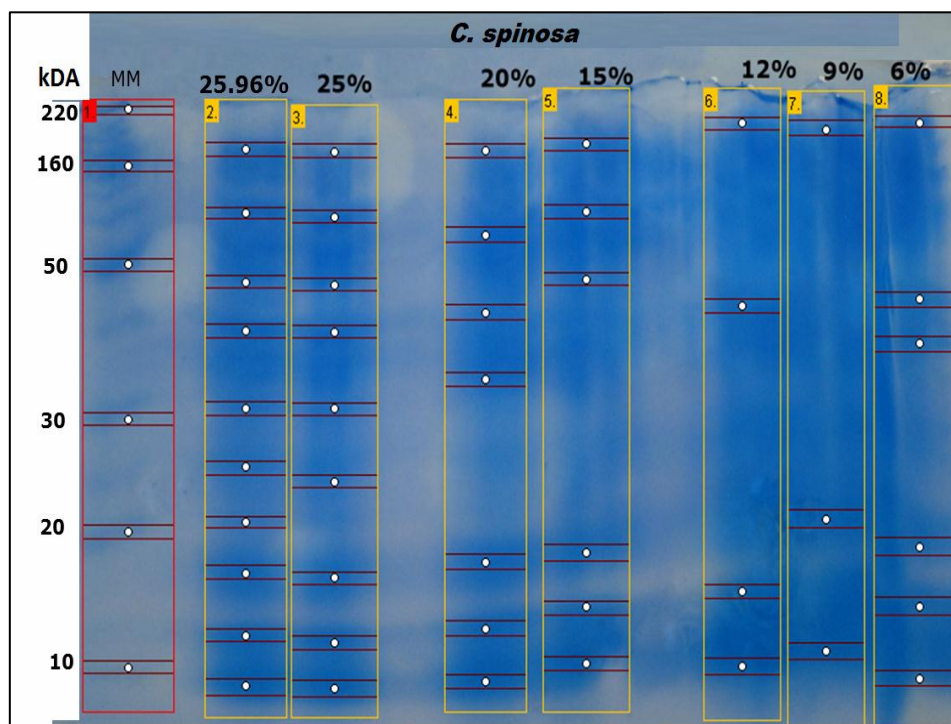
en esta especie son altas con respecto a las especies *C. spinosa*, *I. carnea* y *C. platanifolia* según Vance *et al.* (1990) sugieren que la síntesis de algunas proteínas inducidas a déficit hídrico puede dar resistencia contra la deshidratación y por ello la existencia de proteínas en algunas especies.

Así mismo para *P. carthagenensis* (Gráfica 7. F) el valor del coeficiente de determinación R^2 fue igual a 0,043 y su análisis de varianza fue de $p=0,620$ no existe relación entre contenido proteínas y porcentaje de humedad. La respuesta de las especies a diferentes tipos de estrés generalmente incluye la alteración en la expresión de proteínas algunos de estos cambios generalmente están relacionados con el aumento o la disminución de la expresión de genes específicos, y dependen de la naturaleza, duración y severidad del estrés (Bray, 1997; Zhu *et al.*, 2002; Bartles & Kotchoni, 2003).

3.3 Electroforesis SDS –PAGE

Caelsapinia spinosa

Los resultados de los análisis de la electroforesis SDS-PAGE muestran diferencias en la presencia e intensidad de bandas de proteínas en cada uno de los contenidos de humedad en las especies de estudio.



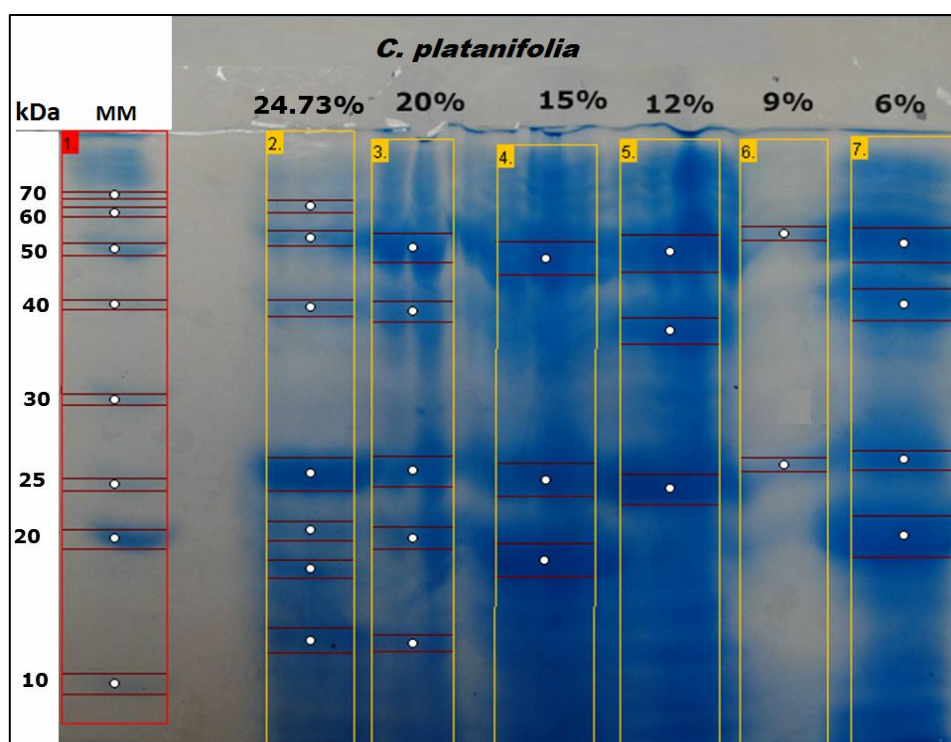
Gráfica 8. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida de semillas de *C. spinosa* usando (MM) marcador molecular BenchMark™ Unstained Protein Ladder de 10-220 kDa.

En las semillas de *C. spinosa* (Gráfica 8) en el nivel de 25.96% se identificaron 10 bandas a diferencia del nivel 9% en el que solamente se observaron 3 bandas esto pudo ser debido a que los niveles más bajos necesitaron un mayor tiempo de deshidratación y por ende una menor presencia de bandas. En algunos niveles de humedad (12% y 9%) la expresión de proteínas fue baja ya que se evidenció un menor número de bandas en los diferentes niveles de deshidratación. A las bandas presentes en todos los niveles de deshidratación se las define como aquellas de bajo peso molecular y posiblemente pertenecientes a las proteínas LEA que son abundantes durante la maduración y el estrés a la desecación celular (Dure, 1993). Un posible factor que influyó en el éxito de la caracterización de las proteínas fue la extracción, las semillas deshidratadas que se utilizaron presentaban una testa dura que impedía su fácil trituración y consecuentemente la extracción de proteínas. Según

Esau, (1928) la testa es el tegumento exterior de la semilla constituida por gran cantidad de carbohidratos y proteínas que confieren protección, impidiendo así la exposición directa del embrión, los carbohidratos no permiten una correcta lisis celular, motivo por el cual creemos que se dificultó el proceso de extracción.

Cavallinesia platanifolia

Para la especie *C. platanifolia* como se puede observar en la gráfica 9 se evidenció en el nivel 24.73% de humedad 7 bandas seguido por el nivel de 20% con 5 bandas y con una notable diferencia en el nivel 9% con una disminución notoria de 2 bandas, esta baja cantidad de bandas puede ser atribuido a que estas semillas no pueden sobrevivir si se las seca más allá de un contenido de humedad relativamente bajo (menor a 30%) y mientras sea menor el contenido de humedad difícil será evidenciar bandas.



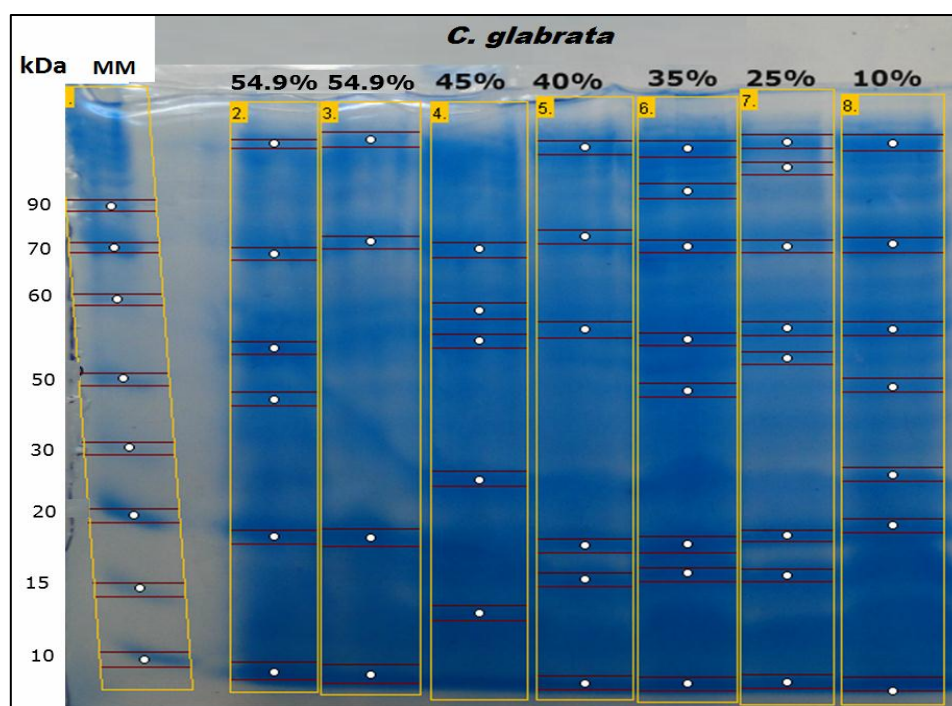
Gráfica 9. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida de semillas de *C. platanifolia* usando (MM) marcador molecular BenchMark™ Unstained Protein Ladder de 10-220 kDa.

Se observan bandas mayoritariamente con el peso molecular de 10 a 25 kDa (13 aproximadamente) en todos los niveles de deshidratación a diferencia de los pesos de 30 a 50 kDa donde solo existen 8 bandas en todos los niveles de deshidratación. No existió un gran número de proteínas totales pudo ser consecuencia de factores externos según Delauche *et al.* (1993) puede haber la existencia de proteínas estructurales con membranas estables que están concentradas durante la desecación

y además pueden ejercer funciones protectoras en diferentes tipos de estrés, tanto de especies ortodoxas como recalcitrantes (Baker, Steele & Dure, 1988).

Caesalpinia glabrata

En la especie *C. glabrata* (Gráfica 10) se observaron 8 bandas en los niveles de humedad de 35 y 25% a diferencia del nivel de 54,9% en el cual se evidenciaron 4 bandas esta especie mantiene un alto contenido de agua (54.9%) en algunas especies se presentan semillas con características morfológicas o fisiológicas que reducen la pérdida de agua o aumentan la absorción de agua pudiendo así evitar la deshidratación y en consecuencia se observa una diferencia marcada en los niveles de humedad (a menor nivel de deshidratación/mayor número de bandas) (Mujica, 1988).



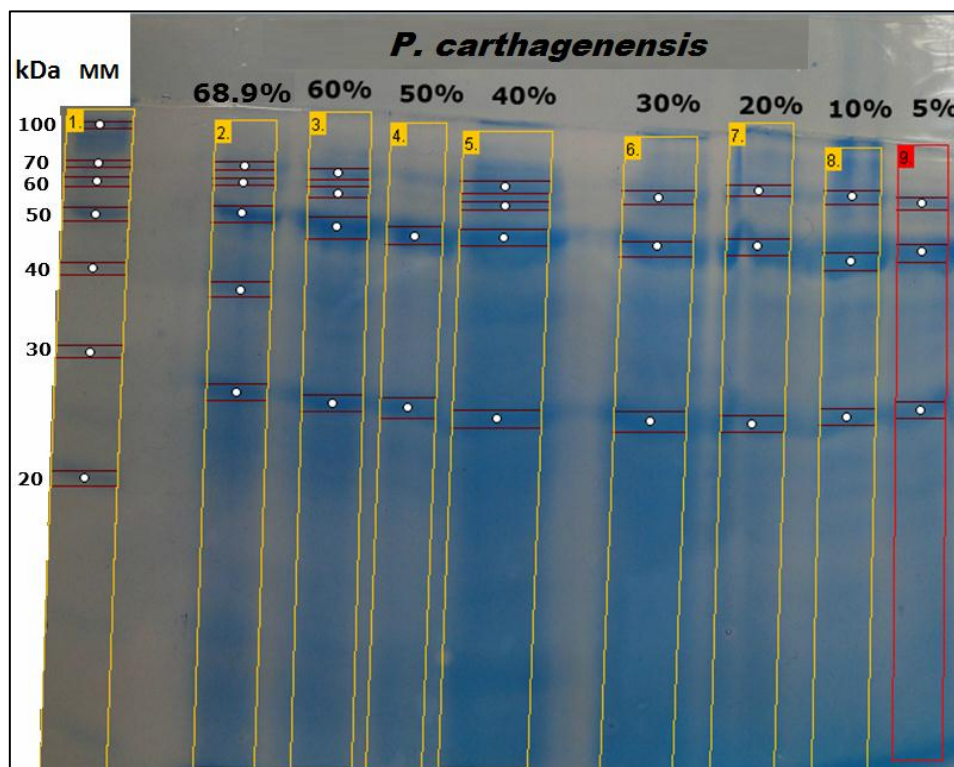
Gráfica 10. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida de semillas de *C. glabrata* usando (MM) marcador molecular BenchMark™ Unstained Protein Ladder de 10-220 kDa.

Con el peso molecular de 10 y 20 kDa se observaron 16 bandas en todos los niveles de deshidratación. También se observó una marcada relevancia con respecto a la banda de 70 kDa ya que la misma estuvo presente en todos los niveles de deshidratación. En esta especie se observan proteínas de alto y bajo peso molecular con características de proteínas de reserva como las prolaminas que su peso molecular está entre 22.000 y 43.000 dalton (Robert *et al.*, 1983). Estas proteínas de

reserva separadas por SDS-PAGE se pueden presentar en dos rangos de peso molecular, aquellas que presenta proteínas entre 22 y 35 kDa, siendo su heterogeneidad la base de la identificación de proteínas totales y otras de bajo peso molecular, entre 12 a 18 kDa, que tienen baja resolución (Hansen & Altoasaar, 1988).

Piscidia carthagenensis

Las semillas de *P. carthagenensis* (Gráfica 11) presentaron 5 bandas cuando el CH fue 68.9% con respecto a las 2 bandas que se observaron en el nivel de 50%. En esta especie no se observan numerosas bandas estas semillas no tuvieron la capacidad de soportar el estrés hídrico al que fueron sometidas por ende no existe un número significativo de bandas que denote la existencia de proteínas.



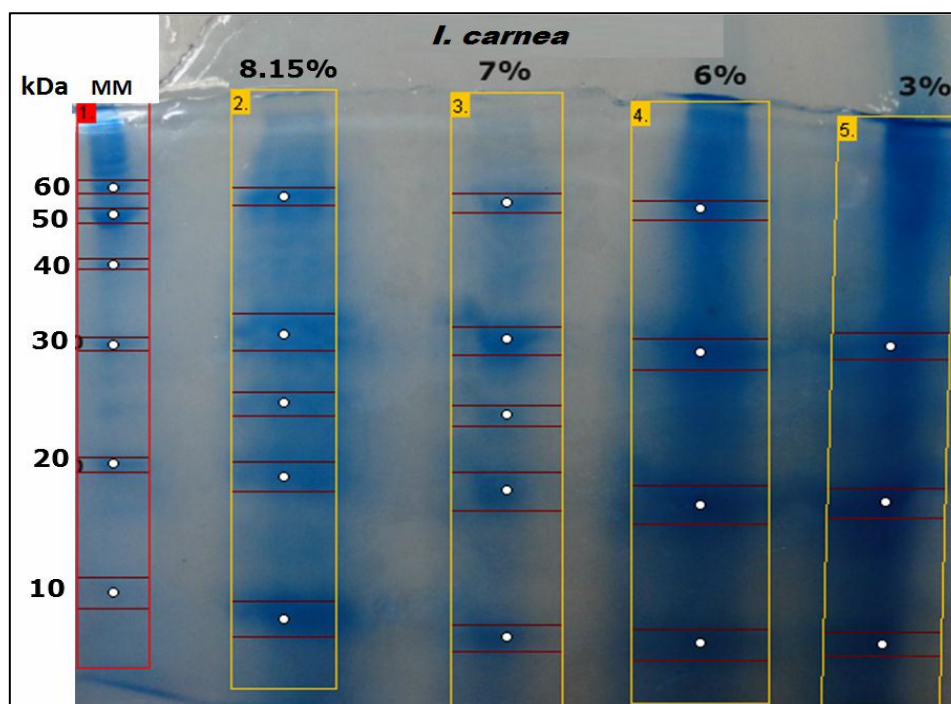
Gráfica 11. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida de semillas de *P. carthagenensis* usando (MM) marcador molecular BenchMark™ Unstained Protein Ladder de 10-220 kDa.

En forma general se puede observar la presencia de 18 bandas aproximadamente correspondientes a los pesos 50 a 70 kDa de todos los niveles de deshidratación. La poca presencia de bandas en las semillas utilizadas para este ensayo pudo ser consecuencia del periodo de almacenamiento posterior a la desecación que se le dio, estas semillas fueron recolectadas en una etapa temprana de su desarrollo y al

momento de realizar la extracción de proteínas se observó una testa deteriorada, basándonos en el presente estudio creemos que las semillas no estaban en condiciones de soportar la deshidratación y un posterior almacenamiento debido a su recolección temprana. García & Pita. (2000) menciona que la viabilidad de las semillas se da por factores genéticos, de desarrollo y medio ambiente.

Ipomoea carnea

En semillas de *I. carnea* (gráfica 12) se identificaron 5 bandas en el nivel 8.15% a diferencia del nivel 3% en el cual solo se evidenciaron 3 bandas, en esta especie también existe un menor número de bandas en el nivel 3% debido a que este requirió de mayor tiempo de deshidratación. Posiblemente las diferencias se relacionan con algunas propiedades del citoplasma y las membranas celulares, y generalmente el daño por deshidratación se atribuye a cambios físicos en la estructura celular (Bidwell, 1979).



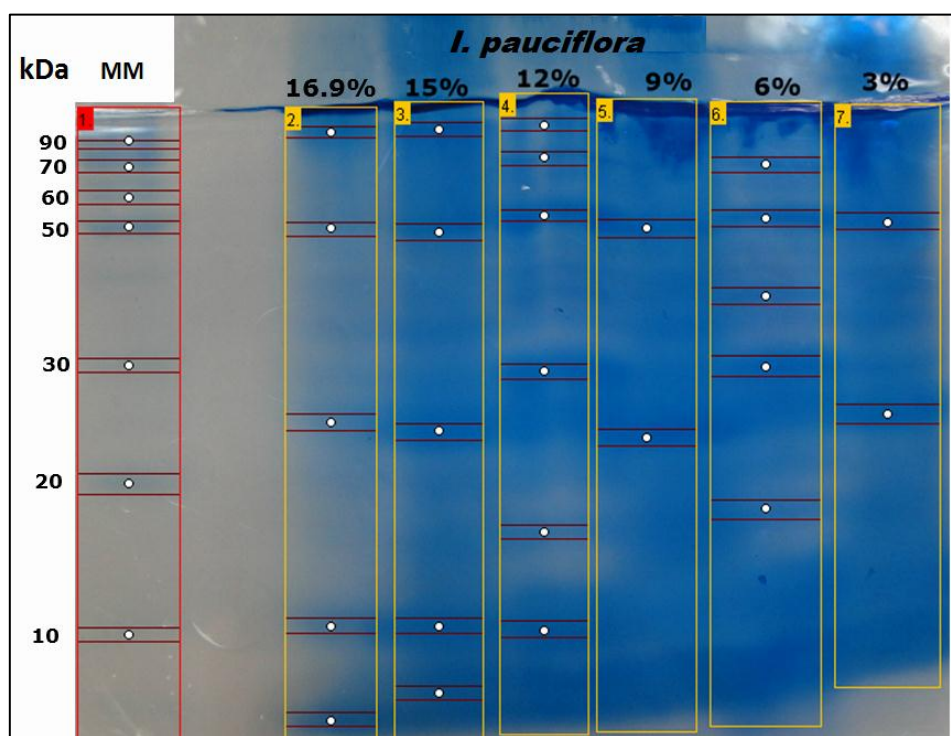
Gráfica 12. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida de semillas de *I. carnea* usando (MM) marcador molecular BenchMark™ Unstained Protein Ladder de 10-220 kDa.

Se identificó un mayor número de bandas, 8 aproximadamente con los pesos moleculares entre 20 a 10 kDa a diferencia de los demás pesos existentes estas bandas son posiblemente proteínas de reserva que llegan a representar hasta el 60% del total de proteínas en semillas (Mooney & Thelen, 2004). Las proteínas se sintetizan

y acumulan durante la etapa media del desarrollo y se almacenan en grandes cantidades en forma de agregados subcelulares llamados “cuerpos proteicos” hasta que se hidrolizan durante la maduración, inhibición y germinación de la semilla. Estas proteínas de reserva son la principal fuente de nitrógeno y energía para las semillas y el fruto durante el crecimiento reproductivo y la rápida expansión de las estructuras vegetativas después del periodo de dormancia y durante la germinación (Casey & Domeney, 1984).

Ipomoea pauciflora

En *I. pauciflora* (Gráfica 13) se encontró de 5 y 6 bandas en los niveles 16.9 y 12% correspondientemente a diferencia de los niveles 9% y 3% en los cuales solo se observaron 2 debido a que los niveles más bajos de deshidratación se sometieron a un mayor tiempo de estrés hídrico y por ende existe menor cantidad de bandas.



Gráfica 13. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida de semillas de *I. pauciflora* usando (MM) marcador molecular BenchMark™ Unstained Protein Ladder de 10-220 kDa.

Con el peso aproximado de 50 KDa se observaron bandas en todos los CH y con los pesos de 20 y 10 kDa se identificaron 7 bandas. Algunas de estas proteínas pueden pertenecen al grupo de las globulinas que son de bajo peso molecular entre 10 y 14 kDa. Según Kikawada *et al.* (2006) la expresión de las proteínas tiene lugar en condiciones de estrés hídrico, posiblemente existieron factores que influyeron en el

éxito de la caracterización de las proteínas. Algunos datos provenientes de este tipo de ensayos han indicado que la capacidad protectora de las proteínas LEA de los diferentes grupos es distinta, algunas presentan una protección de casi 100% aún bajo condiciones de pérdida de agua mayores al 98% (Reyes *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

- ✓ Existe correlación positiva entre el contenido de humedad y el porcentaje de germinación en todas las especies siendo *I. pauciflora* la que presentó mayor relación ($R^2=0,963$) mientras que *C. spinosa* ($p=0.124$) la que tuvo menor relación entre las dos variables.
- ✓ La cantidad de proteínas totales encontradas en cada nivel de humedad y para cada especie varió de 0.001 a 0.0016, cantidad relativamente baja para semillas.
- ✓ No existe relación entre contenido de humedad y cantidad de proteínas encontradas durante la deshidratación en todas las especies.
- ✓ Las especies que toleraron la deshidratación fueron *I. pauciflora* e *I. carnea* manteniendo un 44 y 60% de germinación respectivamente al 3% de humedad.
- ✓ Las especies de *C. platanifolia*, *P. carthagenensis*, *C. spinosa*, *C. glabrata* a pesar que existió germinación en los niveles más bajos de humedad el porcentaje de germinación fue bastante bajo.
- ✓ El alto contenido de proteínas totales presente en la especie *C. glabrata* concuerda con la cantidad de bandas observadas de los diferentes niveles de deshidratación.
- ✓ Se observó un mayor contenido de proteínas en las especies de *C. spinosa* y *C. glabrata* en todos sus niveles.

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar contenidos de humedad y extracción de proteínas, el mismo día en que las semillas llegan al laboratorio para que el contenido de humedad inicial de las semillas no se pueda ver afectado por factores ambientales y no se tenga problemas con la deshidratación causada por el ambiente externo.
- ✓ Utilizar otros contenidos de humedad más críticos (menores a 6 y 4%) dependiendo de la especie o hasta donde la misma tolere para encontrar bandas proteicas relacionadas con este tipo de cambio y así aportar con información de tolerancia a la desecación para nuevas especies.

BIBLIOGRAFÍA

- Azcón-Bieto J.; Talón, M. 1993. Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill. Interamericana. Barcelona-España.
- Baker, J., C. Steele y L. Dure III. 1988. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* 11, 277-291.
- Bartles, D. y S.O. Kotchoni. 2003. Water stress induces the up-regulation of a specific set of gens in plants: aldehyde dehydrogenases as an example. *Bulg. J. Plant Physiol, Special Issue*, 37-51.
- Baskin, C.C. y J.M. Baskin. 2000. Ecology and evolution of specialized seed dispersal, dormancy and germination strategies. *Plant Spec. Biol.* 2, 95-96.
- Bewley, J. D., Reynolds, T. L. & Oliver, M. J. (1993). Evolving strategies in the adaptation to desiccation. In "Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress" (T. J. Close and E. A. Bray, eds.), pp. 193–201. American Society of Plant Physiologists Series, USA.
- Bewley, J.D. & M. Black. 1994. Seeds: physiology of development and germination. Plenum Press, New York. 445 pp). (Berjak, P. y N. Pammenter. 2004. Recalcitrant seeds. pp. 305-345.
- BIDWELL, RGS. 1979. Fisiología Vegetal. Primera edición. México. 784 p.
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Bray, E.A. (1997) Plant responses to water deficient. *Trends Plant Sci.* 2: 48–54.
- BUCHANAM B, GRUISSEM W, JONES RL (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. ASPP. Rockville, Marylan. USA.
- CAMPBELL, N. A., REECE, J. B.; colaboradores y consultores, URRY, L., [et al]. Biología. 7ma edición. Buenos Aires: Madrid: Médica Panamericana [2007] XLII, 1392 p: il, col: 29 cm.
- Carrillo, A. 1992. Anatomía de la semilla de *Chenopodium berlandieri* ssp. *nuttalliae* (Chenopodiaceae) Huauzontle. Tesis Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Centro de Botánica. Montecillo, México. 87 p.
- Casey, R. y Domoney, C. 1984. The genetics of legume storage proteins. *Philosophical Transaction of the Royal Society London B* 304:349-358.
- Cuming, A.C. (1999) LEA proteins. In: Seeds proteins (Shewry, P.R., y Casey, R. eds). The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, pp. 753-780.

- Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N. & Sarhan, F. (1998). Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*. 10: 623–638.
- Dávila-Ortiz, G. 1996. Métodos para el estudio bioquímico de proteínas. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Apuntes. Morelos Méx.
- Delauche, J., Matthes, R., Dougherty, g. & Boyd, A. (1993). Storage for seed in subtropical and tropical regions. *Seed Science and technology*. 1: 671-700.
- Dure L. 1993. Structural motifs in Lea proteins. p. 91-103. American. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD.
- Esau, K. (1982). Anatomía de las plantas con semilla. Editorial. Hemisferio Sur. Buenos Aires.p.8-19 y 423-464.
- ESPINOSA, C.I., DE LA CRUZ, M., LUZURIAGA L., ESCUDERO, A. 2012. Bosques tropicales secos de la región Pacífico Ecuatorial: diversidad, estructura, funcionamiento e implicaciones para la conservación. *Ecosistemas* 21 (1-2):167-179.
- Farrant, J.M.,N.W.Pammenter, and P.Berjak.1989.Germination associated event sand the desiccation-sensitivity of recalcitrant seeds: A study on the three unrelated species. *Planta* 178:189–198.
- Figueroa, J. y Jaksic, F. 2004. Latencia y banco de semillas en plantas de la región mediterránea de Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural* 77:201-215.
- Galau, G.A., D.W. Hughes y L. Dure. 1986. Absciscic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (lea) mRNAs. *Plant Mol. Biol.* 7, 155-170.
- García, P. & Pita, J.M. (2000). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Departamento de Biología vegetal, E.U.I. Técnico agrícola. Universidad Politécnica de Madrid.
- Granhof, J. 1984, Seed extraction, 2. Extraction of pine seeds by means of sun drying on elevated trays followed by tumbling. DFSC. Humlebaek, Denmark. Technical Note N°17.
- HANSEN, A. E.; ALTOASAAR, L. (1988). Characterization of the low molecular weight oat (*Avena sativa* L.) prolamins through the use of pre-cast ultra-thin layer polyacrylamide gels. In: Biochemical identification of varieties. *Material III International Symposium ISTA*, 1987. Leningrad. USSR.
- Harada JJ, DeLisle A, Baden C, Crouch M (1989) Unusual sequence of an abscisic acid inducible mRNA which accumulates late in Brassica napus seed development. *Plant Mol Biol* 12: 395–401

- Ingram, J. and Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 377–403.
- Kermode AR (1990). Regulatory mechanics involved in the transition from seed development to germination. *Crit. Rev-plantSci.* 9: 155-195.
- Kigel, J. y Galili, G. (Eds) 1995. *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, Nueva York.
- Kikawada, T., Nakahara, Y., Kanamori, Y., Iwata, K., Watanabe, M., McGee, B., Tunnacliffe, A. & Okuda, T. (2006). Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochem Biophys Res.* 34: 56-61.
- LARCHER W. 2003. *Physiological plant ecology*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag. p: 401-415.
- Manur, C. J. /et al./ Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 1994, vol. 6, p. 103-106.
- Mooney, B.P., y Thelen, J.J. 2004. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification. *Phytochemistry* 65:1733-1744.
- Montaldi, E.R. (1995). *Principios de Fisiología Vegetal*. Ediciones Sur. Argentina.
- Mujica, A. 1988. *Parámetros Genéticos e Índices de Selección en Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.)*. Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduado, Chapingo, México. 182 p.
- Mundy, J. y N.H. Chua. 1988. Absciscic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7, 2279-2286.
- Pammenter, N.W. & Berjak, P. (1999). A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9: 13-38.
- Pérez García, F y Pita Villamil. J.M. 1999. *Dormición de semillas*. Hojas divulgadoras 2013 HD. Ministerio de Agricultura, pesca y Alimentación, Madrid.
- Pérez García, F. y Pita Villamil. J.M. 2001. *Viabilidad, Vigor, Longevidad y Conservación de semillas*. Hojas Divulgadoras 2112 HD. Ministerio de agricultura. Madrid.
- Perry, D. 1984. *Manual de Métodos de Ensayo del Vigor*. Instituto Nacional de Semilla y Plantas de vivero. Madrid. España.
- Ramírez, G.M. (1982). *Almacenamiento y conservación de granos y semillas*. Editorial CECSA. México.

- RAO, N.K., HANSON, J., DULLOO, M. E., GHOS H, K., NOVELL, D., LARINDE, M. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioversity International. Roma, Italia. 77, 164 p.
- Reyes, J.L., et al. 2005. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant Cell Environ.* 28, 709-718.
- ROBERT, L. S.; NOZZOLILLO, C.; ALTOSAAR, I. (1983). Molecular weight and charge heterogeneity of prolamins (avenins) from nine oat (*A. sativa* L.) cultivars of different protein content and from developing seeds. *Cereal Chem.*, 60(6): 438-442.
- Rodríguez L. (1994). Tratamientos pre germinativos para algunas especies forestales nativas de la región Hueta norte de Costa Rica. Instituto tecnológico de Costa Rica. p. 157.
- Rost, Barbour, Stocking, Murphy. 1997. "Plant Biology". Wadsworth Publishing Company.
- Sambrook and Russell 2006. The condensed Protocols from molecular cloning; primera edición. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13: 61–72.
- Shewry, P.R. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53:947-958.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115: 327–334.
- Suttie, J. 2003. Conservación de heno y paja para pequeños productores en condiciones pastoriles FAO: Producción y protección vegetal N°29 Roma.pp 317:63-64.
- Thomsen K. 2000. Handling of Desiccation and Temperature Sensitive Tree Seeds. DFSC Series of Technical Notes. TN56. Danida Forest Seed Centre. Humlebaek, Denmark.
- Vance, N. C., D.O. Copes, and J.B. Zaerr. 1990. Differences in proteins synthesized in needles of unshaded and shaded *Pinus ponderosa* var *Scopulorum* seedlings during prolonged drought. *Plant Physiol.* 92: 1244-1248.
- Warren, J. E. y Bennett, M. A. 1997. Seed hydration using the drum priming system. *Hort Science*, vol. 32, p. 1220-1221.

- Willan, R. L. 1991. Guía de Manipulación de Semillas Forestales con especial referencia a los Trópicos. Centro de Semillas Forestales de DANIDA. Estudio FAO MONTES 20/2. 510 pp.
- Yoshiba, Y. /et al./. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. Plant Cell Physiol., 1997, vol. 38, p. 1095-1102.
- Zhu, J.K, K.S. Scumaker y L. Xiong. 2002. Cell signalling during cold, drought, and salt stress. Plant Cell 14, 165-183.

ENLACES WEB:

- ✓ Fernández E. & Galvan A “Métodos para la cuantificación de proteínas”. Córdoba, Argentina. Consultado; el 17 de Enero del 2014. Disponible en; <http://www.uco.es/>.

ANEXOS

ANEXO I	GERMINACIÓN DE SEMILLAS
---------	-------------------------

Materiales

- Cajas petri.
- Papel Absorbente.
- Agua destilada.
- Parafina
- Mechero
- Alcohol 70%
- Semillas

Procedimiento

- Enjuague las semillas con agua destilada.
- Inmersión alcohol al 70% por 2 minuto.
- Enjuague con agua destilada (3 veces).
- Calentar Agua a 100 °C.
- Dejarlas en imbibición por 24 horas.
- Sembrar en cajas Petri utilizando como sustrato papel absorbente.

ANEXO II	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS
-----------------	--------------------------------

Reactivos

- Tampón Tris - HCl 0,01 M pH 7,0
- Ácido ascórbico 0,05 M
- Mercaptoetanol 0,1%
- Tritón X-100 al 0,1%
- Agua destilada
- Nitrógeno Líquido.

Material

- Mortero y Pistilo
- Tubos Eppendorf
- Luna de reloj
- Espátula
- Pipetas
- Pipetas automáticas y puntas (10µl, 100µl, 1000µl).
- Pera

Soluciones para la Extracción de Proteínas.

✓ Tris-HCl 0.01M

100 ml	
Tris-base	0,12114 gr
Agua destilada	70ml
Ajustar el pH a 7	
Agua destilada	Aforar hasta 100ml

✓ Ácido Ascórbico 0.05M

100ml	
Ácido Ascórbico	0,8805gr
Agua destilada	100ml

▪ Preparación de la Solución Tampón de Extracción

100ml	
Tampón Tris - HCl 0,01 M pH 7,0	1ml
Ácido ascórbico 0,05 M	5ml
Mercaptoetanol 0,1%	100ul
Tritón X-100 al 0,1%	100ul

Agua destilada	Aforar hasta 100ml
----------------	--------------------

Procedimiento

- Pesar 0,5 gramos de semillas de cada uno de los niveles de deshidratación.
- Congelar en nitrógeno líquido.
- Luego triturar las muestras en un mortero sobre hielo.
- Añadir 1 ml de tampón de extracción. (Tampón Tris - HCl 0.01 M pH 7.0; Mercaptoetanol 0,1%, Ácido ascórbico 0,05 M, Tritón X-100 al 0,1%)
- Homogeneizar bien la muestra.
- Centrifugar a 12.000. rpm/45 minutos a -4°C.
- Remover el sobrenadante y guardar en otro tubo.

ANEXO III	CUANTIFICACION DE PROTEINAS BRADFORD
------------------	---

Principio: Se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 a las proteínas. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15 µg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación.

Equipos

- Espectrofotómetro NanoDrop 2000
- Balanza

Reactivos

- Reactivo de Bradford Sigma
- Buffer de Extracción de Proteínas
- Suero Fetal Bovino (BSA-Sigma)
- Extracto proteico de *C. spinosa*, *I. carnea*, *I. pauciflora*, *C. platanifolia*, *C. glabrata* y *P. carthagenensis*

Materiales

- Tubos de 2.5 ml,
- Cubetas de plástico
- Pipetas automáticas y puntas (10µl, 100ul, 1000µl).
- Gradillas
- Puntas

1. Soluciones para cuantificación de proteínas

1.1. Preparación de la solución madre

Solución Madre de ABS	
Suero Fetal Bovino	4mg
Búfer de extracción	1ml

Procedimiento:

1. Preparación de la curva de calibración

- Preparar una solución madre de ABS a una concentración de 4mg/ml; diluyendo 4mgde ABS en el buffer de extracción de proteínas.
- A partir de esta solución inicial preparar 7 estándares en diluciones seriadas (4-2-1-0,5-0,25-0,125-0,054 mg/ml), para preparar las soluciones seriadas se preparan 6 tubos con 500ul de buffer de extracción de proteínas.
- De cada una de las diluciones se toma 5ul al cual se le añade 145ul de reactivo de Bradford. Se deja 15 minutos en oscuridad.

2. Preparación de las muestras

- Tomar 5ul de cada una de las muestras a cuantificar y añadir 145ul del reactivo de Bradford. Se deja 15 minutos.

3. Cuantificación

- En el programa del Nanodrop escoger la opción proteínas Bradford.
- Tomar 100ul de cada una de las diluciones y de las muestras y colocarlas en la cubeta.
- Seleccionar la ventana de curva estándar.
- Ingresar los valores de las diluciones.
- Realizar la medida del blanco. Generalmente se utiliza agua destilada.
- Cambiar de la curva estándar a muestra.
- Ingresar cada una de las muestras para realizar la medida.

ANEXO IV	ELECTROFORESIS SDS-PAGE
-----------------	--------------------------------

Principio: Consiste en la migración de las moléculas a través de un gel, en el cual, por acción de un campo eléctrico, serán separadas de acuerdo a su tamaño o peso molecular.

Equipos

- pH-metro.
- Agitador magnético.
- Balanzas de precisión.
- Equipo de electroforesis para mini-geles con accesorios (sistema de montaje y preparación de geles, espaciadores para geles de 0,75 mm de espesor, peines para formar 10 pocillos, placas de cristal).
- Fuente de electroforesis.

Materiales

- Agua destilada.
- Tijeras.
- Botellas de vidrio o plástico para almacenar soluciones.
- Papel de filtro.
- Vasos de precipitado y probetas (25, 50 y 100 ml).
- Imán para agitación magnética.
- Guantes de goma.
- Pipetas automáticas y puntas (10µl, 100µl, 1000µl).
- Tubos eppendorf de 1,5 ml.
- Gradillas.
- Frasco lavador con agua destilada.
- Bandejas para el teñido de geles

Reactivos

- Extractos proteicos de *C. spinosa*, *I. carnea*, *I. pauciflora*, *C. platanifolia*, *C. glabrata* y *P. carthagenensis*.
- Solución de acrilamida/bis-acrilamida 40% (preparado comercial).
- Tris-base.
- SDS.
- Glicerol.
- Azul de bromofenol.
- 2-Mercaptoetanol.
- Glicina (forma ácida).
- Persulfato amónico.
- TEMED (preparado comercial).
- Azul de coomassie (CBB R-250).
- Proteínas estándar de peso molecular conocido (comercial).

Soluciones para SDS-PAGE

- ✓ Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.

100ml	
Tris-base	18,17g
Disolver en 70ml de agua destilada	
Ajustar el pH a 8,8 con HCl concentrado	
Agua destilada	Añadir hasta 100 ml

- ✓ Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.

100ml	
Tris-base	6,05g
Disolver en 70ml de agua destilada	
Ajustar el pH a 6,8 con HCl concentrado	
Agua destilada	Añadir hasta 100 ml

- ✓ SDS al 10%

100ml	
SDS	10g
Disolver en 70ml de agua destilada	
Ajustar el pH a 7,2	
Agua destilada	Añadir hasta 100 ml

Calentar a 68° C para disolver completamente el SDS

- ✓ Persulfato amónico (APS) al 10%

10ml	
APS	1g
Agua destilada	Añadir hasta 10 ml

Conservar a -20°C hasta su uso.

- ✓ Buffer Tris glicina 10X

1000ml	
Tris Ultra Pure	30gr
Glicina	144gr
Agua destilada	Aforar 1000 ml

- ✓ Buffer desnaturizante 6X

Tris-HCl pH 8.6, 1.5M	0,8ml
SDS 10%	6ml
Mercaptoetanol	0,2ml
Azul de Bromofenol, 1%	1ml
Glicerol	2ml

✓ **Buffer de Corrida**

1 litro	
Buffer Tris Glicina 10x	100ml
SDS 10%	10ml
Agua destilada	Aforar a 1000ml

Soluciones para tinción del gel

✓ **Solución de tinción azul de Coomassie**

100ml	
Azul de Coomassie R-250	0,25gr
Ácido acético	10 ml
Metanol	45 ml
Agua destilada	45 ml

Preparar en la campana de gases, ya que el metanol es tóxico Filtrar y almacenar a temperatura ambiente.

✓ **Solución de Decoloración Rápida**

1 litro	
Ácido acético	100 ml
Metanol	500 ml
Agua destilada	Hasta 1 litro

✓ **Solución de Decoloración Lenta.**

1 litro	
Ácido acético	100 ml
Metanol	50 ml
Agua destilada	Hasta 1 litro

Procedimiento

- Limpiar los cristales con jabón y enjuagarlos con abundante agua destilada. Después limpiarlos con metanol para esterilizarlos.
- Para el gel separador al 10% preparar 5 ml agregando los volúmenes indicados de cada componente en el orden dado, EXCEPTO EL APS Y EL TEMED que se agregan inmediatamente antes de colocar entre los vidrios.

	5ml	10ml
Tris HCl 1,5M pH 8,8	1,3ml	2,6ml
Acrilamida mix 40%	1,25ml	2,5ml
SDS 10%	50ul	100ul
APS 10%	50ul	100ul
TEMED	2ul	4ul
Agua destilada	2,35ml	4,7ml

- Con cuidado, utilizando una micropipeta, se añade la mezcla en el interior del molde hasta una altura aproximada de 2 cm del borde superior de la placa mayor, de forma que quede suficiente espacio para el gel concentrador (se debe calcular 1 cm más de la longitud de los pocillos del peine)
- Para el gel concentrador al 5% preparar 3 ml, agregando los volúmenes indicados de cada componente en el orden dado EXCEPTO EL APS Y EL TEMED que se agregan inmediatamente antes de colocar entre los vidrios.

	1 ml	2 ml	3 ml
Distilled water	765 ul	1.53 ml	2.295 ml
Tris HCl pH 6.8 1.5M	86.66 ul	173.32 ul	260 ul
10% SDS	10 ul	20 ul	30 ul
10% APS	10 ul	20 ul	30 ul
TEMED	1 ul	2 ul	3 ul
40% Acrylamide mix	125 ul	250 ul	375 ul

- Completa la polimerización del gel separador. Se adiciona el gel concentrador, preparado momentos antes, hasta llenar totalmente el espacio entre los dos cristales. Rápidamente se incluye el peine con cuidado de que no se formen burbujas.
- Sacar el peine con cuidado de no romper el gel.
- Montar el gel en la cámara de electroforesis: Acoplar el gel al electrodo y cargar la muestras con ayuda de una micropipeta. Poner el tampón de electroforesis en la cámara interna del electrodo hasta cubrir el gel por completo y el resto depositarlo en la cubeta de electroforesis.
- Conectar los electrodos rojo y negro con su propio color a la fuente de alimentación. El voltaje para el gel concentrador está entre 80 V y para el gel separador entre 120 V, hasta que el frente de azul de bromofenol llega al final del gel.
- Se desmonta el gel y se separa de las placas ayudándose de agua destilada.
- Teñir y desteñir el gel. (*Sambrook y Russell 2006*).