



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**DETERMINACIÓN DE PATRONES ELECTROFORÉTICOS  
DURANTE EL PROCESO DE DESHIDRATACIÓN EN SEMILLAS  
DE DIFERENTE COMPORTAMIENTO DE CONSERVACIÓN.  
(ORTODOXO, RECALCITRANTE E INTERMEDIO)**

Previo a la obtención del título  
de Bioquímico Farmacéutico

**AUTORAS:**

Miriam Cecilia Cueva Guamán  
María Eugenia Imaicela Ordóñez

**DIRECTOR:**

Ing. José Miguel Romero Saritama

Loja- Ecuador

2012

## **CESIÓN DE DERECHOS**

Miriam Cecilia Cueva Guamán, y María Eugenia Imaicela Ordóñez, declaramos conocer y aceptar la disposición del Artículo 67 del Estatuto Orgánico de La Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte de 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”.

Loja, Junio del 2012

Miriam Cecilia Cueva Guamán  
**TESISTA**

María Eugenia Imaicela Ordóñez.  
**TESISTA**

## **CERTIFICACIÓN**

Ing.

José Miguel Romero Saritama

**DIRECTOR DE TESIS DE GRADO**

CERTIFICO:

Que una vez revisado el proyecto de investigación efectuado por Miriam Cecilia Cueva Guamán, y María Eugenia Imaicela Ordóñez, previo a la obtención del Título de **BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, Junio del 2011

Ing. José Miguel Romero Saritama  
**DIRECTOR DE TESIS**

## **AUTORÍA**

La presentación, procedimientos y conceptos, así como, los resultados y conclusiones vertidos en el presente trabajo de tesis son de responsabilidad absoluta de las autoras.

Miriam Cecilia Cueva Guamán

María Eugenia Imaicela Ordóñez

## AGRADECIMIENTO

*Nuestra gratitud, principalmente está dirigida al Dios por habernos dado la existencia y permitido llegar al final de nuestras carreras.*

*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 de la manera más comedida y acertada supo dirigir el presente trabajo; y a todos los profesores que con entereza nos han inculcado sus valiosos conocimientos en el transcurso de nuestra formación profesional.*

*Miriam Cecilia y María Eugenia*

## DEDICATORIA

*Quiero dedicarle este trabajo a Dios que me ha dado la vida y fortaleza para terminar este proyecto de investigación,*

*A mis Padres y hermanos y sobrinos por estar ahí cuando más los necesité; en especial a mi padre quien a lo largo de mi vida ha velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento de mi inteligencia y capacidad.*

*A Linder mi novio mi gran amor, mi inspiración y mi fuerza, gracias por apoyarme siempre, comprenderme y hasta soportarme en los momentos más difíciles. Gracias por estar a mi lado incondicionalmente y por ser tan especial. No sé qué haría sin ti.*

*María Eugenia*

## DEDICATORIA

*A "Dios" Por su amor incondicional y por permitirme seguir adelante y cumplir con mi sueño.*

*A mis padres "Elio y Flor" Como un pequeño gesto de gratitud porque creyeron en mí y por enseñarme a nunca darme por vencida, inculcándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta. Ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final.*

*"Va por ustedes",*

*Ya ti: mi luz, mi aliento y mis ganas de vivir, tu sabes y solo tú por quien lucho a ti: que me diste tu amor y gratitud, gracias por siempre haberme apoyado y nunca haberme dejado sola no sabes, cómo te extraño y aunque Dios no te dio el tiempo suficiente siempre estarás en mis recuerdos.*

*A tu Memoria*

*Miriam Cecilia*

## CONTENIDO.

CERTIFICACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS	i
CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
DEDICATORIA	v
CONTENIDO	vii
RESUMEN	xi
ARTICULO	xii

### **I PRESENTACIÓN DE FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES**

- FIN DEL PROYECTO	2
- PROPÓSITO DEL PROYECTO	2
- COMPONENTES DEL PROYECTO	2

### **II INTRODUCCIÓN**

2. 1. INTRODUCCIÓN	4
--------------------	---

### **III MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1. SITIO DE ESTUDIO Y ESPECIES	9
3.2. DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE HUMEDAD	9
3.3. DESHIDRATACIÓN DE SEMILLAS	9
3.4. VIABILIDAD DE SEMILLAS	10

3.5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	10
3.6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	11
3.6.1. Curva de Calibración	11
3.6.2. Cuanficación de Proteínas Totales.	12
3.7. ELECTROFORESIS SDS-PAGE	12
3.7.1. Preparación de Geles	12
3.7.2. Preparación de las muestras proteicas	13
3.7.3. Desarrollo de la Electroforesis	13
3.7.4. Tinción de gel	14
<b>IV RESULTADOS Y ANÁLISIS</b>	
4.1. Deshidratación y Viabilidad	16
4.2. Proteínas Totales	20
4.3. Electroforesis SDS-PAGE	24
<b>V CONCLUSIONES</b>	30
<b>VI RECOMENDACIONES</b>	32

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Porcentajes de Contenidos de Humedad a deshidratar para cada una de las especies.	9
<b>Tabla 2.</b> Preparación de estándares para la curva calibración de proteínas con una solución patrón de BSA (4 mg/ml).	11
<b>Tabla 3.</b> Composición del gel separador y del gel concentrador.	12
<b>Tabla 4.</b> Volumen de proteína y Buffer desnaturizante determinado según las concentraciones de Bradford en 30 g de proteína y la cantidad de muestra final que se coloca en la corrida electroforética.	13
<b>Tabla 5.</b> Tiempo de secado, contenido de humedad y germinación inicial de las semillas.	16
<b>Tabla 6.</b> Concentración de proteínas totales en ug/ml en especies y sus distintos niveles de deshidratación.	21
<b>Tabla 7.</b> Presencia de Bandas de proteínas en semillas de ( <i>I. carnea</i> y <i>S. mollissima</i> ), en distintos contenidos de Humedad (%)	25
<b>Tabla 8.</b> Bandas de proteínas en semillas de ( <i>C. flexuosa</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> ), en distintos contenidos de Humedad (%).	27

## LISTA DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> A) Variación del Porcentaje de germinación en semillas de <i>Capparis flexuosa</i> durante el proceso de deshidratación. B) Correlación entre contenido de humedad y germinación de <i>C. flexuosa</i> .	17
<b>Gráfica 2.</b> A) Porcentaje de germinación de semillas <i>C. spinosa</i> con sus cinco diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas. . B) Correlación entre contenido de humedad y germinación de <i>C. spinosa</i> .	18
<b>Gráfica 3.</b> A) Porcentaje de germinación de semillas de <i>I. carnea</i> con sus cuatro diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas. B) Correlación entre contenido de humedad y germinación de <i>I. carnea</i>	19
<b>Gráfica 4.</b> A) Porcentaje de germinación de semillas de <i>S. mollissima</i> con sus cuatro diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas. B) Correlación entre contenido de humedad y germinación de <i>S. mollissima</i>	20

**Grafica 5.** Análisis de correlación entre porcentaje de Contenido de humedad (CH) y concentración de proteínas totales (ug/ml), con un intervalo de confianza del 95% **A)** *I. carnea*, **B)** *S. mollissima*, **C)** *C. spinosa* y **D)** *C. flexuosa*

23

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas en semillas usando (MM) marcador molecular sigma de 6,500- 200,000Da. Las flechas negras indican bandas bien definidas en todos los niveles de deshidratación y las flechas rojas indican bandas que se presentaron en algunos niveles deshidratados

24

**Figura 2.** Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas en semillas usando (MM) marcador molecular sigma de 6,500- 200,000Da. Las flechas negras indican bandas bien definidas en todos los niveles de deshidratación y las flechas rojas indican bandas que se presentaron en algunos niveles deshidratados

26

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

**Fotografía 1.** Semillas en proceso de deshidratación con gel de sílice. 10

**Fotografía 2.** Germinación de las semillas. 10

**Fotografía 3.** Extracción de proteínas de semillas. 11

**Fotografía 4.** Espectrofotómetro Nanodrop. 11

**Fotografía 5.** Equipo para la electroforesis. 12

**Fotografía 6.** Desarrollo de la electroforesis. 14

**Fotografía 7.** Tinción y decoloración del gel 14

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo I.** Germinación de Semillas. 34

**Anexo II.** Extracción de Proteínas. 35

**Anexo III.** Cuantificación de Proteínas Bradford. 37

**Anexo IV.** Electroforesis SDS-PAGE. 39

## RESUMEN

Se estudió patrones electroforéticos de proteínas en semillas de *S. mollissima*, *I. carnea*, *C. flexuosa* y *C. spinosa* (Ortodoxo, recalcitrante e intermedio) deshidratadas con gel de sílice. Se realizó la extracción de proteínas totales del macerado de 2 o 3 semillas (0,5 g) por especie en 1ml de tampón de extracción (Tris – HCl 0.01 M pH 7.0; Mercaptoetanol 0,1%, Ácido ascórbico 0,05 M, Tritón X-100 al 0,1%). Se efectuó la cuantificación de proteínas totales mediante método Bradford con una solución patrón de Albúmina Sérica Bovina (BSA), consecuentemente se desarrolló electroforesis SDS-PAGE en un minigel con acrilamida 10%, como separador y acrilamida 5% como concentrador, se usó como amortiguador de corrida SigmaMarker™ de peso molecular 6,500-200,000Da. Se encontraron bandas de 24 KDa comunes a todas las especies y otras bandas presentes sólo en algunas especies, haciendo referencia a proteínas involucrados durante la desecación LEA 1 (D-19) y 2 (D-11) “dehidrinas”, las cuales se exponen considerablemente durante procesos de desarrollo y maduración, protegiendo a semillas expuesta a procesos de deshidratación.



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA  
PARTICULAR DE LOJA

---

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

---

**DETERMINATION OF ELECTROPHORETIC PATTERNS DURING  
THE DEHYDRATION PROCESS IN SEEDS OF DIFFERENT  
CONSERVATION BEHAVIOR (ORTHODOX, RECALCITRANT AND  
INTERMEDIATE)**

Miriam Cueva<sup>1</sup>; María Imaicela <sup>1</sup>; José Romero <sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Escuela de Bioquímica y Farmacia- Universidad Técnica Particular de Loja  
San Cayetano alto s/n, PO Box 11 01 608, Loja - Ecuador.

<sup>2</sup>Instituto de Ecología, Universidad Técnica Particular de Loja  
San Cayetano alto s/n, PO Box 11 01 608, Loja - Ecuador.

**AUTHOR ADDRESS:** [mccuevaxx@utpl.edu.ec](mailto:mccuevaxx@utpl.edu.ec), [meimaicela@utpl.edu.ec](mailto:meimaicela@utpl.edu.ec)

---

**ABSTRACT**

During development and maturation, when natural desiccation takes place, seeds accumulate transcripts and proteins at a relatively high concentration named Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins. The study was about protein electrophoretic patterns applied in dehydrated seed with silica gel; *Senna mollissima*, *Ipomoea carnea*, *Capparis flexuosa* and *Caesalpinia spinosa* (Orthodox, recalcitrant and intermediate). Entire proteins were extracted by maceration of 2 or 3 seeds (0,5 g) by specie in 1ml of extraction buffer (Tris – HCl 0.01 M pH 7.0; *Meraptoethanol* 0,1%, Ascorbic Acid 0,05 M, 0,1% Triton X–100). Total protein quantification was by means of Bradford method: a pattern *bovine serum albumin solution* (BSA), consequently electrophoresis SDS-PAGE was developed by minigel with 10% acrylamide as separator, 5% acrylamide as concentrator, SigmaMarker™ molecular weight of 6,500-200,000Da was used like a running buffer. The results showed common bands of 24 KDa for all species and other bands were presents in some species only; it referred to protein involved during desiccation LEA 1 (D-19) and 2 (D-11) “dehydrins”, which were exposed in considerable concentrations during development and maturation process, protecting so seeds exposed to dehydration process.

**Keywords:** Electrophoresis SDS-PAGE, desiccation, proteins, *S. mollissima*, *I. carnea*, *C. flexuosa*, *C. spinosa*.



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA  
PARTICULAR DE LOJA

---

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

---

## INTRODUCTION

Unlike the seeds of most species, which pass through a period of natural dehydration on the plant before shedding, there is a group of species which shed their seeds at high moisture contents. Although desiccation tolerance increases throughout development, mature seeds of these species do not survive drying <sup>(1, 2)</sup> and they have been termed "recalcitrant" because of their limited storage potential. <sup>(3)</sup>

The cause of their desiccation sensitivity, and indeed the mechanism of desiccation tolerance in seeds of orthodox species, is not well understood. However, considerable interest has been directed recently towards the role of a specific set of proteins in the acquisition of desiccation tolerance. During development and maturation, when natural desiccation takes place, seeds accumulate transcripts and proteins at a relatively high concentration; for this reason, when first found, proteins were named Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins. <sup>(4)</sup>

These proteins not only accumulate during the last stage of seed formation <sup>(5, 6, 7)</sup> but also in vegetative tissues in response to dehydration or upon exogenous application of abscisic acid (ABA) <sup>(8, 9, 10)</sup>

Although a precise function has not been demonstrated for any Lea protein, circumstantial and indirect evidence indicates that they play a role as protectors of cellular structures and proteins during drought and freezing stress <sup>(11, 12, 13)</sup>

Dry seeds contain a considerable store of *LEA* proteins and their messages, most of which are degraded during germination, very likely providing the seeds of precursors that will be used to build the new information and structures necessary for the following developmental process <sup>(4)</sup>

## MATERIALS AND METHODS

### Study site and species

The research was conducted at the Laboratory of Seed Bank - Institute of Ecology at the Technical University of Loja. Mature seeds of these species; *Senna mollissima* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) H.S. Irwin & Barneby (Fabaceae), *Ipomoea carnea* Jacq (Convolvulaceae), *Capparis flexuosa* (L.) L (Capparaceae) y *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze (Fabaceae) were used.

### Determination of moisture content

The determination of the initial moisture content was carried out through the gravimetric method in hot oven ( $103 \pm 3^\circ\text{C}$  for 17h); two replicates of 10 seeds from each lot



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA  
PARTICULAR DE LOJA

---

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

---

were used. The calculation was performed based on the fresh weight of the seeds (ISTA, 1999) and the equation used was the following:

$[MC = (\text{initial weight} - \text{final weight}) / \text{initial weight} \times 100]$ .

### Seed dehydration

For dehydration, seeds were placed in polythene bags with an equal mass of freshly regenerated silica gel desiccant. The number of seeds varied between species, depending on the quantity of seed available from each collection. The seeds were weighed periodically until reaching moisture contents established.

### Germination Tests

The assay was done with 50 seeds (25 seeds/replication). For each seed group two sterile glass Petri dishes, this contained two sheets of filter paper (also sterile) as substratum. During the whole trial the dishes were maintained in incubation under controlled light, moisture 40% and temperature conditions (30 °C as average), according to the norms of ISTA (1999)

### Proteins Extraction

For the extraction of proteins, seeds were ground to fine powder with mortar and pestle. Sample buffer (1ml) was added to 0.5 g of seed flour as extraction liquid and mixed

thoroughly in eppendorf tube. The extraction buffer contained 0.01M Tris-HCl (pH7.0), , 0.05M ascorbic acid, 0,1%Triton X-100 and 0,1% 2-mercaptoethanol. To purify extraction, the homogenate samples were mixed thoroughly by vortexing and centrifuged at 12000rpm for 45 minutes at -4°C. The extracted proteins were recovered as supernatant and stored in the refrigerator a -20°C until electrophoresis

### Quantification of protein

Protein extracts were quantified using the Bradford assay. Bovine serum albumin (BSA) (Sigma) is used for the standard curve. Add 5ul of the protein extract to 1ml of the diluted reagent and mix. We measured the blue color formed at the wavelength 595nm.

### Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Thirty five ul of extracts are loaded into the wells. The gel (0, 75 mm thick) consists of two parts: resolving (main gel, 10% acrylamide) and stacking gel (upper gel, 5% acrylamide). Protein separation is carried out for about 3 h (1 h at 80 V, and 2 h at 120 V).

The gel was stained with coomassie brilliant blue for about 60 minutes and then destained in 10% methanol



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA  
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

45% acetic acid until the color of background disappeared and the electrophoretic bands were clearly visible.

### RESULTS AND DISCUSSION

Seeds viability during dehydration was significantly affected, mainly orthodox seeds (*S. mollissima* and *I. carnea*) in lower dehydration levels generally, showing dormancy imposed by hard covers, which work as barriers to prevent germination and

avoid gas exchange and inhibition in the development of the seedling. <sup>(14)</sup>

Likewise <sup>(15, 16)</sup> displayed similar results in other studies with orthodox species. However recalcitrant seed *C. flexuosa*, germination was achieved under wet and metabolically active, but it was also affected when they lost their ability to germinate to become exposed to low humidity <sup>(17)</sup>. While seeds of *C. spinosa* remained high viable even though its dehydration was relatively low attributed to intermediate behavioral characteristics (table 1).

TABLE 1. Moisture content of seed germination and dehydrated at different levels

<i>Senna mollissima</i>		<i>Ipomoea carnea</i>		<i>Caesalpinia spinosa</i>		<i>Capparis flexuosa</i>	
CH %	Ger %	CH %	Ger %	CH %	Ger %	CH %	Ger %
2	20	3	38	5	66	2	8
3	35	6	42	10	72	5	18
6	50	9	46	15	76	10	42
6,97*	52	12	51	20	82	20	58
		13,3*	56	25	90	30	76
				26,27*	96	35	78
						40	82
						45*	88

(CH%): Percentage of moisture content: dehydrated levels; (GER %): percentage of germination; (\*)initial moisture content.



Specie	Dehydration levels (%)	Total Protein ug/ml
<i>Ipomoea carnea</i>	3	-2,076
	6	0,179
	9	0,63
	12	0,63
<i>Senna mollissima</i>	2	0,623
	3	0,353
	6	1,211
<i>Caesalpinia spinosa</i>	5	2,339
	10	0,78
	15	1,297
	20	0,388
	25	1,43
<i>Capparis flexuosa</i>	2	0,82
	5	15,48
	10	1,449
	20	1,598
	30	1,596
	35	1,449
	40	25,67

TABLE 2: Total protein concentration ug / ml in

species and their different levels of dehydration.

In Bradford assay total protein expression for orthodox seeds wasn't highly significant showing a substantial decrease in protein content imposed on representative way in *I. carnea*, while recalcitrant and intermediate species (*C. flexuosa* and *C. spinosa*) the opposite was observed, there was a further increase in protein content showed in table 2, this could be attributed to characteristics of the plant and environmental conditions<sup>(18)</sup>, it helped their biochemical and physiological mechanisms were altered under stress conditions; gathering protective molecules, LEA ("late embryogenesis abundant"), sucrose and oligosaccharides,<sup>(19)</sup> so the lack or vain expression in seeds of different behavior (orthodox, recalcitrant and intermediate), of one or more of this process can define desiccation sensitivity.<sup>(20)</sup>

So the optimum conditions for seed storage long term are not well known.<sup>(21)</sup> LEA protein transcripts accumulated during the late stage of development, when desiccation period starts, while its levels decrease during the germination process. On the other hand, the expression is induced during water deficit situations.<sup>(6)</sup> Thus in analysis of SDS-PAGE electrophoresis showed protein bands present in each of the species. (Fig.1 and 2).

Finding a noteworthy amount of protein that along electrophoretic profile did not

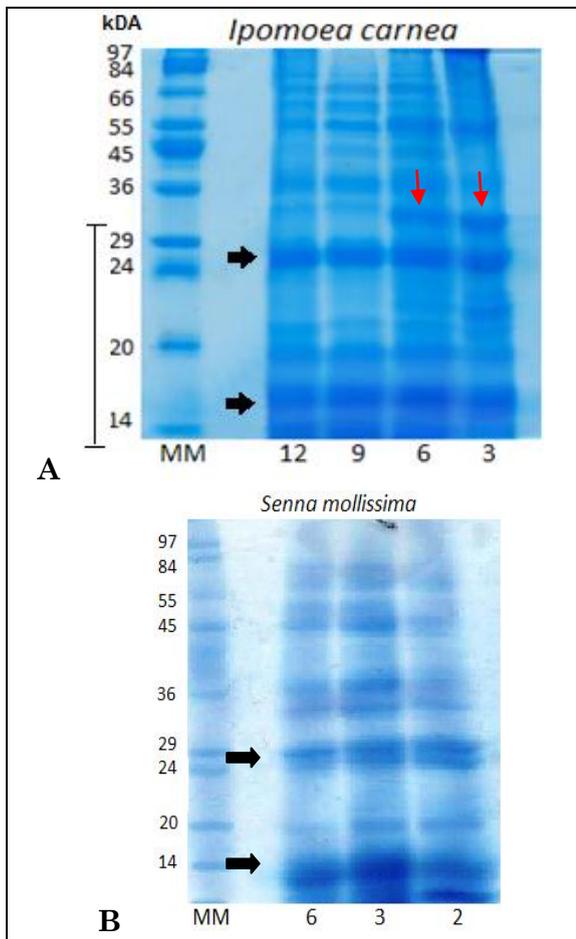


UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA  
PARTICULAR DE LOJA

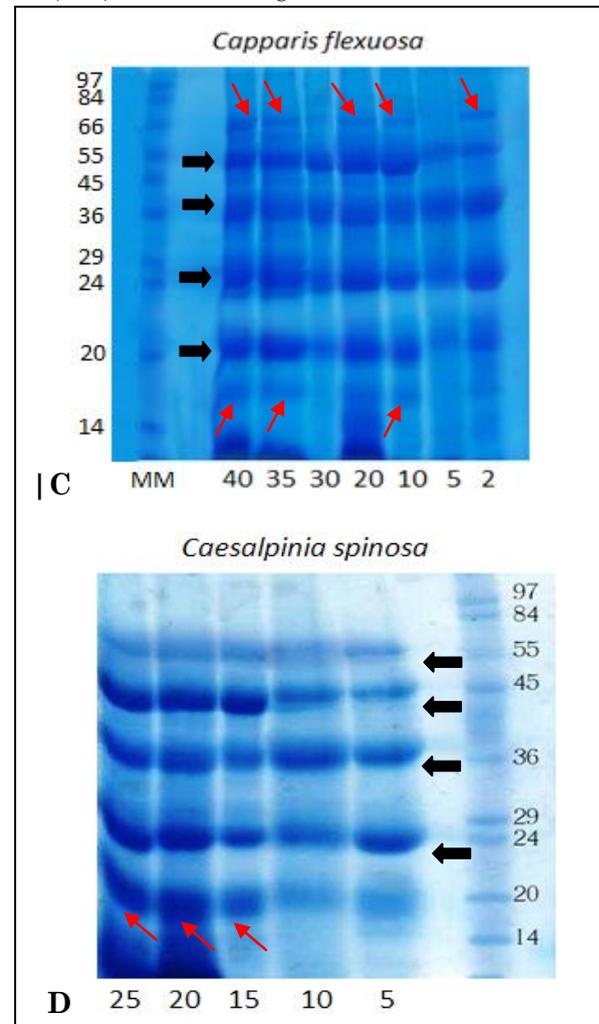
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

result in increased or decreased, so that different behavior didn't modify the bands expression, generally of low molecular weight called LEA 1 (D-19) and 2 (D-11) "dehydrins" <sup>(22)</sup>, which ones could be exposed to considerable concentrations during development and maturation processes, thereby protecting seeds exposed to dehydration processes. <sup>(23)</sup>



**Figure 1.** Electrophoresis of total proteins in orthodox seeds **A)** *I carnea* **B)** *S. mollissima* in polyacrylamide gels at 10%. **A)** Lane 1 to 4: Dehydration levels of 3, 6, 9 and 12 (%), Lane 6 (MM) Molecular weight marker known. **B)**, Lane

1 to 3: Dehydration levels of 2, 3 and 6 (%), Lane 5 (MM) Molecular weight marker known.



**Figure 2.** Electrophoresis of total proteins recalcitrant and intermediate seed: **C)** *C. flexuosa* **D)** *C. spinosa*, in polyacrylamide gels at 10% **C)** Lane 1 to 7 Dehydration levels of 2, 5, 10, 20, 30, 35 and 40 (%), Lane 9 (MM) Molecular weight marker known. **D)**, Lane 1 (MM) Molecular weight marker known, Lane 3 to 7: Molecular weight marker known 5, 10, 15, 20 and 25 (%).

The same way these proteins are considered highly hydrophilic, which express resistance against different types of osmotic stress. <sup>(24)</sup>



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA  
PARTICULAR DE LOJA

---

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

---

## CONCLUSIONS

According to conservation behavior of seeds could reach the conclusion that the species *I. carnea* and *S. mollissima* acquired a high degree of tolerance to dehydration so they could be regarded as orthodox seeds.

Seeds *C. flexuosa* unlike the other species by conservation behavior recalcitrant have a tendency because of their high initial moisture content and loss of viability during drying.

According to the initial moisture content and the results of viability of seeds during the dehydration process, *C. spinosa* exhibits

behavior intermediate conservation.

By electrophoretic analysis dried seeds could be identified protein bands concerning possibly LEA proteins.

The protein band found in all species present dehydrated weight of 24 KDa that they could be included within the group of those involved in dehydration

## ACKNOWLEDGMENTS

A very special thanks goes out the Institute of Ecology of the Universidad Técnica Particular de Loja for allowing to develop our research and most especially to Ing. José Miguel Romero, who helped us in the most restrained and successful way to finish this investigation.

## REFERENCES

1. Hong T, Ellis R. 1990. A comparison of maturation drying, germination, and desiccation tolerance between developing seeds of *Acer pseudoplatanus* L. and *Acer platanoides* L. *New Phytologist* 116: 598-596.
2. Finch-Savage W. 1992. Embryo water status and survival in the recalcitrant species *Quercus robur* L. Evidence for a critical moisture content. *J. Exp. Botany* 43: 663-669.
3. Roberts E. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology, Vol 1*, pp. 499-514.
4. Bewley, J. D., and M. Black. 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. (2nd ed.) New York, Plenum Press.
5. Galau GA, Hughes DW, Dure L 111 (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (Leu) mRNAs. *Plant Mol Biol* 7: 155-170
6. Baker J, Steele C, Dure L 111 (1988) Sequence and characterization of 6 Leu proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol* 11: 277-291.
7. Bray, E.A. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035-1040.
8. Mundy, J., and Chua, N. (1988). Abscisic acid and water- stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7 : 2279-2286.
9. Ingram, J., and D. Bartels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:377-403.



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA  
PARTICULAR DE LOJA

---

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

---

10. Close, T. 1997. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Planta.* 100: 291-296.
11. Swire-Clark, G. A., and R.W. Marcotte. 1999. The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Sacharomyces cerevisiae*. *Plant Mol. Biol.* 39: 117-128.
12. Xu, D., X. Duan, B.M. Wang, B. Hong, D.T.-H. Ho, and R. Wu. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* 110: 249-257.
13. Imai, R., L. Chang, A. Ohta, E.A. Bray, and M. Takagi. 1995. A lea class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Sacharomyces cerevisiae*. *Gene* 170: 243-248.
14. Farnsworth E. 2000. The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds. *Annual Review and Systematics* 31:107-138
15. Ponce R, Díaz D, Pérez M y Márquez J. 1993. Ubicación y cuantificación de taninos y proteínas en la testa de *Ipomoea Purpurea* (L.) Roth en relación con la permeabilidad al agua. *Phyton.* 53: 37-43.
16. Esau K .1985. Anatomía Vegetal. 3<sup>ra</sup> edición. Omega. Barcelona España.
17. Kermode A, Finch-Savage E. 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: Black, M. y H.W. Pritchard, editors. *Desiccation and survival in plants. Drying without dying.* CABI Publishing. pp. 149-184.
18. Rangel M. 2009. Anatomía y tolerancia a la desecación de semillas de cacao (*Theobroma cacao L*), Montecillo, Texcoco, Edo de México.
19. Leprince O, Wertucci C, Hendry G, Atherton N. 1995. The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperatura. *Physiologia Plantarum* 94: 233-240.
20. Farrant M, Pammenter W, Berjak P. 1993. Seed development in relation to desiccation tolerance: A comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seed of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. *Seed Science Research* 3:1-13
21. Fonseca, S.C.L. y H.B. Freire. 2003. Sementes recalcitrantes: Problemas pos-colheita. *Bragantia* 62: 297-303.
22. Battaglia M, Olvera Y, García A, Campos F, y Covarrubias A. 2008. The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. *American Society of Plant Biologists.*
23. Campos F, Cruz F. 2002. Expression of Late Embryogenesis Abundant (Lea) Protein coding genes during osmopriming of maize and bean seeds, *AGROCIENCIA VOL. 36*, México, D.F.
24. Swire-Clark, G.A. , R.W. Marcotte. 1999. The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Sacharomyces cerevisiae*. *Plant Mol. Biol.* 39, 117-128.



**I.** *Presentación del  
Fin, Propósito y Componentes  
del Proyecto*



## I PRESENTACIÓN DE FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

### 1.1 Fin del Proyecto

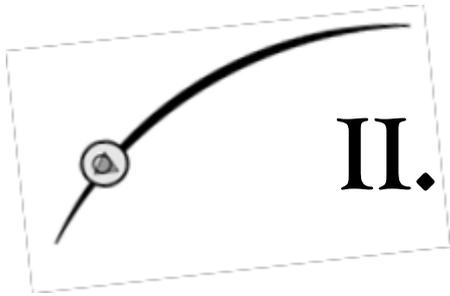
Conocer la posible funcionalidad de las proteínas expresadas durante el proceso de deshidratación de semillas de diferente comportamiento que nos permita dar pautas de nuevas herramientas de conservación de las especies vegetales.

### 1.2 Propósito del Proyecto

Determinar y evaluar patrones electroforéticos de proteínas totales en cada nivel de deshidratación en semillas de las especies: *Senna mollissima*, *Ipomoea carnea*, *Capparis flexuosa* y *Caesalpinia spinosa*.

### 1.3 Componentes del Proyecto

1. Tolerancia a de deshidratación de semillas de diferente comportamiento de conservación.
2. Proteínas expresadas durante la deshidratación, identificadas mediante electroforesis SDS-PAGE.



## *Introducción*



## II INTRODUCCIÓN

La desecación es un proceso natural que ocurre al final de la formación y desarrollo de la semilla que es considerada necesaria para completar el ciclo de vida de las plantas como una estrategia para favorecer la sobrevivencia de la semilla durante el almacenamiento, así como asegurar la diseminación de las especies.<sup>(1)</sup>

El objetivo del proceso de desecación es reducir el contenido de humedad de la semilla hasta un valor que permita reducir al máximo su actividad metabólica, y evitar daños por congelación cuando se someta a estas a bajas temperaturas.<sup>(2)</sup> Todas las semillas difieren en su tolerancia a la desecación que sigue tras su diseminación. Según este parámetro, las semillas se pueden clasificar en ortodoxas, recalcitrantes e intermedias.<sup>(3)</sup>

Las semillas ortodoxas son aquellas que en su maduración tienen un bajo contenido de humedad, entre un 50% y un 20%, por lo que admiten para su almacenamiento un secado que mantenga entre 5% y 8% de humedad, pudiendo perder su viabilidad con contenidos en agua inferiores al 5%.<sup>(4)</sup>

Estas semillas pueden ser almacenadas a bajas temperaturas y a humedad relativa, condiciones que le ayudan a mantener la viabilidad por periodos prolongados,<sup>(3)</sup> lo cual le permite entrar en quiescencia por largos periodos sin sufrir daños en sus organelas y pérdida de viabilidad.<sup>(5)</sup>

Las semillas ortodoxas adquieren la capacidad de tolerar la desecación durante la última etapa de desarrollo, detectándose cambios físicos (reducción de las vacuolas, reacción del esqueleto y desdiferenciación intracelular), fisiológicos (presencia y uso eficiente de sistemas antioxidantes) y bioquímicos (acumulación de moléculas de proteínas LEAs por sus siglas en inglés Late Embryogenesis Abundant), sacarosa y oligosacáridos, que en conjunto confieren protección a las células durante la pérdida de agua y prolongan la longevidad de las semillas.<sup>(6)</sup>

---

<sup>1</sup> Leprince O, Hendry G, McKersie B. 1993. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci* 3: 231-246.

<sup>2</sup> Gómez J, Mata J, Soto M. 2006. Deterioro de semillas de dos procedencias de *Swietenia Macrophylla* King bajo distintos métodos de almacenamiento. *Ra Ximhai*, Vol. 2, pp. 223-239.

<sup>3</sup> Roberts E. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, Vol 1, pp. 499-514

<sup>4</sup> Serrada R. 2000. *Apuntes de Repoblaciones Forestales*. Fucovasa. Madrid

<sup>5</sup> Karssen CM. 1995. Hormonal regulation of seed development, dormancy, and germination studied by genetic control. In *Seed Development and Germination*, J. Kigel and G. Galili, eds., Marcel Dekker, New York, pp. 333-350.

<sup>6</sup> Pammenter W, Berjak P. 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science. Research* 9: 13-37



A diferencia de las semillas recalcitrantes, que son aquellas que tiene altos contenidos de humedad y no pueden ser deshidratadas para almacenarlas por debajo de un contenido crítico de humedad. <sup>(7)</sup>

La viabilidad de las semillas recalcitrantes se pierde considerablemente cuando el contenido de agua se reduce por debajo del 30%. <sup>(8)</sup> El problema con estas semillas es que es muy difícil el manejo ya que existen pocos métodos para mantenerlas viables y poderlas almacenar. Otro factor que deteriora este tipo de semilla es la baja temperatura. Se puede atribuir esto a que las semillas de este tipo son producidas por árboles de climas tropicales donde el ambiente es húmedo y las temperaturas son cálidas y no bajan drásticamente. <sup>(9)</sup>

El proceso de germinación de las semillas recalcitrantes comienza alrededor o en el momento que llegan a su madurez, por lo tanto la pérdida de humedad después de ser cosechadas es crítica para la viabilidad de la semilla. Por ello una semilla recalcitrante se debe visualizar como una semilla que está en proceso de germinación, no como una semilla en estado latente <sup>(6)</sup>.

Existe una tercera categoría en la que las semillas tienen características de almacenamiento intermedias entre las ortodoxas y las recalcitrantes.

Las semillas intermedias pueden ser desecadas a contenidos de humedad similares a los de las semillas ortodoxas. Sin embargo, las semillas, una vez desecadas, se dañan al someterlas a bajas temperaturas y su viabilidad desciende rápidamente durante el almacenamiento. <sup>(10)</sup>

La principal diferencia entre las semillas ortodoxas y recalcitrantes estriba en la respuesta fisiológica a la deshidratación. Basándose en esta característica se designa a las semillas ortodoxas como tolerantes a la deshidratación y a las recalcitrantes susceptibles a la deshidratación. <sup>(4)</sup>

Además de lo anterior, la mayoría de las semillas recalcitrantes son susceptibles a bajas temperaturas, siendo frecuente que ni siquiera toleren temperaturas próximas al punto de congelación. <sup>(9)</sup>

La tolerancia a la desecación es la capacidad que tienen las semillas de algunas especies para recibir un tratamiento de secado antes de alcanzar su madurez fisiológica y luego germinar.

---

<sup>7</sup> Berjak, P, Farrant J, Pammenter N. 1989. The Basis of Recalcitrant Seed Behavior. En: Recent Advances in the Development and Germination of Seeds. Plenum Publishing Corporation. 89-108 p.

<sup>8</sup> Greggains V, Finch W, Quick W. 2000. Putative desiccation tolerance mechanisms in orthodox and recalcitrant sees of the genus Acer. Seed Science Research 10: 317-327.

<sup>9</sup> King, M, Roberts E. 1979. The Storage of Recalcitrant Seeds - Achievements and Possible Approaches. International Board for Plant Genetic Resources. Rome. 96 p.

<sup>10</sup> Ellis R, Hong T, Roberts H. 1990. An Intermediate Category of seed behavior. Coffee. Journal of Experimental Botany 41:1167-1174



Se cree que tal tolerancia involucra la protección de membranas celulares a los efectos deletéreos causados por la remoción de agua al mantenerse la doble estructura en ausencia de un ambiente hidratado. <sup>(1)</sup> Se han descrito tres tipos de sistemas protectores:

- La acumulación de azúcares no reducidos que estabilizan las membranas y proteínas en condiciones de sequía <sup>(11,12)</sup>; además de que promueve la formación de una fase cristalina en el citoplasma. <sup>(13)</sup>
- La capacidad para impedir o tolerar la acumulación de radicales libres durante la desecación <sup>(14)</sup>
- Las proteínas protectoras LEA, inducidas por el ácido abscísico <sup>(15)</sup>

Ninguno de estos mecanismos es exclusivo de la tolerancia a la desecación, ya que la tolerancia es un carácter multifactorial donde cada componente es indispensable. <sup>(2, 10)</sup>

Durante los procesos de desarrollo y maduración cuando ocurre la desecación natural, las semillas acumulan transcritos y proteínas en una concentración relativamente alta; por esta razón, las proteínas encontradas fueron denominadas “Abundantes en Embriogénesis Tardía” (Late Embryogenesis Abundant o LEA) y a los genes correspondientes, genes *lea*. <sup>(16)</sup> Estas proteínas no sólo se acumulan durante la última etapa en la formación de la semilla <sup>(17)</sup>, sino que también se encuentran en tejidos vegetativos en respuesta a la deshidratación y, en algunos casos, en respuesta a la aplicación de ácido abscísico <sup>(18)</sup>.

Las proteínas LEA se han agrupado en al menos seis familias sobre la base de la similitud en secuencias <sup>(19)</sup>. Aunque no se ha detectado una similitud significativa entre los miembros de las diferentes familias, una característica unificadora y sobresaliente de estas proteínas es su alta hidrofobicidad y su alto porcentaje de residuos de glicina <sup>(20)</sup>. Las proteínas LEA se han identificado en un amplio rango de especies vegetales, al grado que se han considerado ubicuas en el reino vegetal <sup>(18)</sup>. Aunque no se ha demostrado una función precisa para

<sup>11</sup> Crowe J, Hoekstra F, Crowe L. 1992. Anhydrobiosis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 54: 579- 599.

<sup>12</sup> Kermode A. 1997. Approaches to elucidate the basis of desiccation tolerance in seeds. *Seed Sci. Res.* 7: 75:95

<sup>13</sup> Burni F, Leopold C. 1992. Pools of water in anhydrobiotic organisms. A thermally stimulated depolarization current study. *Biophysical J.* 63: 663-672

<sup>14</sup> Hendry G, Finch S, Thorpe P, Atherton N, Buckland S, Nilsson K, Seel D. 1995. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus rubur* L. *New Phytol.* 122: 273-279.

<sup>15</sup> Lane B. 1991. Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. *FASEB Journal* 5: 2893-2901.

<sup>16</sup> Bewley J, Black M. 1994. *Seeds: physiology of development and germination.* Plenum Press, New York. 445 pp.

<sup>17</sup> Galau G, Hughes D, Dure L. 1986. Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (LEA) mRNAs. *Plant Mol. Biol.* 7:155-170.

<sup>18</sup> Mundy J, Chua N. 1988. Abscisic acid and water stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7: 2279-2286.

<sup>19</sup> Ingram, J, Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 377-403.

<sup>20</sup> Baker J, Steele C, Dure L. 1988. Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* 11: 277-291.

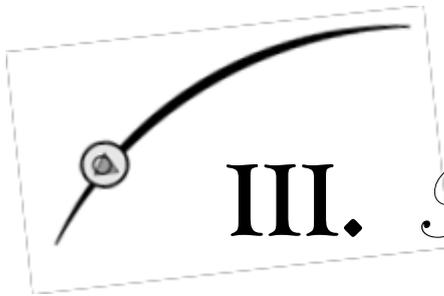


ninguna de las proteínas LEA, evidencia circunstancial e indirecta apuntaría a que estas proteínas cumplen una función como protectoras de estructuras y proteínas celulares durante lapsos de estrés por sequía o congelamiento <sup>(21)</sup>

Por tal motivo el presente estudio tuvo como propósito determinar y evaluar patrones electroforéticos de proteínas totales en diferente nivel de deshidratación en semillas de las especies: *Senna mollissima*, *Ipomoea carnea*, *Capparis flexuosa* y *Caesalpinia spinosa* que nos permitirá profundizar en el conocimiento de los factores que determinan la tolerancia e intolerancia a la desecación de los diferentes tipos de semillas y brindar alternativas que permitan identificar nuevos mecanismos para su conservación.

---

<sup>21</sup> Close T, Kortt A, Chandler P. 1989. A cDNA based comparison of dehydration induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Molecular Biology* 13: 95±10



### III. *Materiales y Métodos*



### III MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. SITIO DE ESTUDIO Y ESPECIES.

La investigación se efectuó en el Laboratorio del Banco de Germoplasma - Instituto de Ecología de la Universidad Técnica Particular de Loja, y se trabajó con semillas maduras de las siguientes especies; *Senna mollissima* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) H.S. Irwin & Barneby (Fabaceae), *Ipomoea carnea* Jacq (Convolvulacea), *Capparis flexuosa* (L.) L (Capparaceae) y *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze (Fabaceae).

#### 3.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD INICIAL.

Para determinar el contenido de humedad inicial (CHI) de las semillas se utilizó el método de secado a temperatura baja y constante <sup>(22)</sup>. Para cada especie se usaron dos muestras colocadas en estufa a  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  durante  $17 \pm 1$  horas (ISTA.2005). Finalizado el procedimiento se calculó el CH utilizando la siguiente fórmula:

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

CH= Contenido de humedad

#### 3.3. DESHIDRATACIÓN DE SEMILLAS.

Determinado el contenido de humedad inicial (CHI) de las semillas se calculó los diferentes niveles a deshidratar (tabla 1) para cada una de las especies en base a la metodología según Thomsen (2000) <sup>(23)</sup>

TABLA 1: Porcentajes de Contenidos de Humedad a deshidratar para cada una de las especies según el contenido inicial de las semillas.

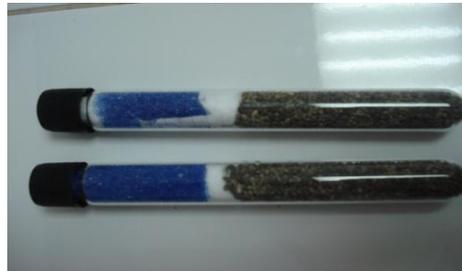
Especies	<i>S. mollissima</i>	<i>I. carnea</i>	<i>C. spinosa</i>	<i>C. flexuosa</i>
Contenido de humedad inicial (%)	6,97	13,3	26,27	45
Niveles a Deshidratar (%)	6	12	25	40
	3	9	20	35
		6	15	30
		3	10	20
			5	10
				5
				2

<sup>22</sup> International Seed Testing Association (ISTA). 2005. International Rules for Seed Testing. Bassersdorf.

<sup>23</sup> Thomsen K. 2000. Handling of Desiccation and Temperature Sensitive Tree Seeds. DFSC Series of Technical Notes. TN56. Danida Forest Seed Centre. Humlebaek, Denmark.



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



**Fotografía. N°1.** Semillas en proceso de deshidratación con gel de sílice.  
**Elaboración:** Las Autoras

### **3.4. VIAVILIDAD DE LAS SEMILLAS.**

Una vez deshidratadas las semillas en los diferentes niveles humedad, se tomó una muestra de 50 semillas en cada uno de ellos y se realizó la prueba de germinación utilizando dos réplicas de 25 semillas colocadas sobre papel absorbente humedecido con agua destilada, en cajas petri (Fotografía 2); mantenidas en los germinadores bajo un régimen de: luz las 24 horas; temperatura a 30°C; humedad 40%. La emergencia de la radícula fue el criterio que se utilizó para determinar si una semilla ha germinado.



**Fotografía. N°2.** Germinación de las semillas.  
**Fuente :** Las Autoras

### **3.5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

Para obtener el extracto proteico, se macero 0,5gr de semillas en 1ml 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%) sobre nitrógeno líquido, hasta obtener una muestra homogénea (Figura 3); se centrifugó durante 45 minutos a 12.000 rpm a -4°C, se separó el sobrenadante. Se lo conservó a -20° C hasta su utilización. (Anexo II)



Fotografía. N°3. Extracción de proteínas de semillas.

Fuente: Las Autoras

### 3.6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

#### 3.6.1. 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.

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	1/16	1/32	1/74
mg/ml	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,054

A cada una de las diluciones se adicionó 145ul de reactivo de Bradford (Azul de Comassie G-250, Sigma), se incubo por 20 minutos en oscuridad y se leyó absorbancia a 595 nm en el Espectrofotómetro Nanodrop 2000. (Fotografía 4)



Fotografía. N°4. Espectrofotómetro Nanodrop.

Elaboración: Las Autoras



### 3.6.2. Cuantificación de proteínas totales

Realizada la curva de calibración, se cuantificó las proteínas totales para cada uno de los niveles deshidratados en todas las especies, para ello se tomaron 5  $\mu$ l de la muestra y se homogenizo con 145ul de reactivo de Bradford y se realizó la lectura en el espectrofotómetro nanodrop.

### 3.7. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

#### 3.7.1. Preparación de los geles

Para la electroforesis se utilizó el equipo Enduro™ Modular Vertical PAGE System de la casa comercial Labnet (Figura 5). Se realizaron minigeles de 0,75 mm de espesor, cada gel consta de un gel concentrador o superior que contiene los pocillos para cargar las muestras, y un gel separador o inferior.



Fot. N°5. Equipo para la Electroforesis  
Elaboración: Las Autoras

Para la preparación de las mezclas correspondientes a los geles superior e inferior se siguió el esquema reflejado en la tabla 3.

TABLA 3. Composición del gel separador y del gel concentrador.

	Gel Separador 10% - 5ml	Gel Concentrador 5% - 3ml
Acrilamida mix 40%	1,25ml	375 $\mu$ l
Tris HCl pH 8.8 1.5M	1,3ml	260 $\mu$ l
Agua destilada	2,35ml	2,295 ml
SDS 10%	50 $\mu$ l	30 $\mu$ l
TEMED	2 $\mu$ l	3 $\mu$ l
APS 10%	50 $\mu$ l	30 $\mu$ l



### 3.7.2. Preparación de las muestras proteicas

El extracto de proteína almacenado fue descongelado y desnaturalizado, para lo cual se utilizó tampón de ruptura 6X con 30ug de muestra a partir de las concentraciones obtenidas por Bradford. Se calculó el volumen que se necesita para los 30ug (tabla 4) en una relación 5:1 (volumen extracto: volumen buffer) (anexo IV). Posteriormente cada muestra fue colocada en agua a ebullición por un espacio de cinco minutos para posteriormente aplicar la muestra con el patrón de peso molecular conocido en los pocillos del gel.

TABLA 4. Volumen de proteína y buffer desnaturalizante determinado según las concentraciones de Bradford en 30 ug de proteína y la cantidad de muestra final que se coloca en la corrida electroforética.

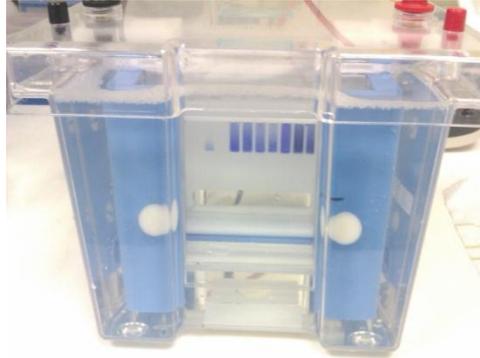
Especie	Contenido de humedad (%)	Proteína (ul)	Buffer desnaturalizante (ul)	Cantidad de muestra para la corrida electroforética (ul)
<i>Ipomoea carnea</i>	3	25	5	30
	6	35	7	30
	9	47.61	9.52	30
	12	47.61	9.52	30
<i>Capparis flexuosa</i>	2	36.58	7.3	20
	5	25	5	20
	10	20.70	4.14	20
	20	18.77	3.75	20
	30	18.79	3.79	20
	35	20.70	4.14	20
	40	25	5	20
<i>Caesalpinia spinosa</i>	5	25	5	30
	10	38.46	7.69	30
	15	23.13	4.62	30
	20	35	7	30
	25	20.97	4.19	30
<i>Senna mollissima</i>	2	48.15	9.63	30
	3	84.98	16.99	30
	6	24.77	4.95	30

### 3.7.3. Desarrollo de la electroforesis

Polimerizados los geles se colocaron en la cámara de electroforesis con el buffer de corrida (Anexo 4) se cargaron las muestras y el marcador (SigmaMarker™) de peso molecular 6,500- 200,000Da, se aplicó una corriente eléctrica de 80V para el gel concentrador y de 120



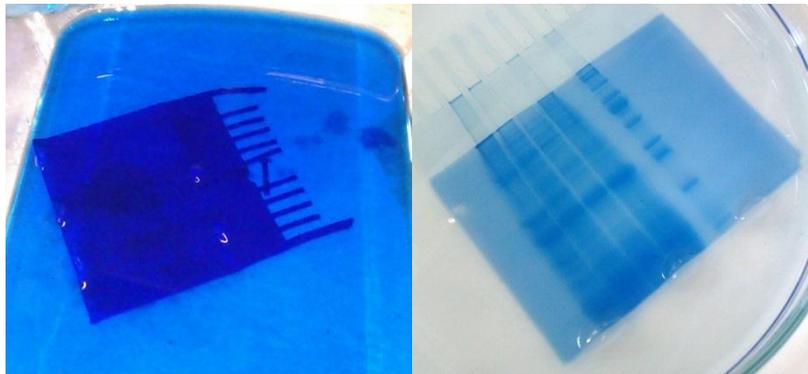
V para el gel separador, se utilizó una fuente de poder ENDURO™ (300V) por un período de 3 horas aproximadamente (Fotografía 7).



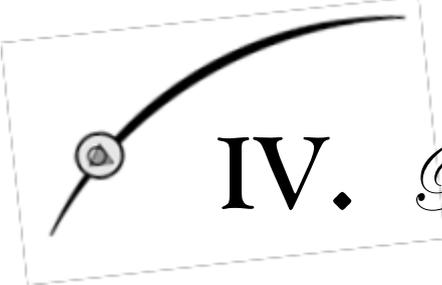
**Fotografía. N°6.** Desarrollo de la Electroforesis  
**Fuente:** Las Autoras

#### 3.7.4. 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 cambios de la solución hasta que las bandas se volvieron visibles. Fotografía 8



**Fotografía. N°7.** Tinción y decoloración del gel  
**Fuente:** Las Autoras



## IV. *Resultados y Análisis*



## IV RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 4.1. Deshidratación y Viabilidad

Como podemos observar en la tabla 5, el tiempo de secado para alcanzar el contenido de humedad esperado mostró una notable variación para cada especie que fue de 1 a 90 días, ésta puede deberse a la textura de las semillas, ya que la cubierta gruesa de la semilla (testa) funciona como barrera mecánica que evita la deshidratación. <sup>(24)</sup> Por lo tanto las semillas rodeadas de testa delgadas, se desecan rápidamente y en un tiempo relativamente corto y a un porcentaje más alto cuando son colocadas en condiciones de baja humedad. <sup>(25)</sup> Sin embargo en semillas de *C. spinosa* a pesar de su gruesa testa el tiempo de secado fue relativamente corto lo cual podría ser que las semillas al momento de la colección no alcanzaron su alto grado de madurez permitiendo que su testa no presente la correspondiente consistencia y por ende un corto tiempo de deshidratación. <sup>26</sup>

TABLA 5. Tiempo de secado, contenido de humedad y germinación inicial de las semillas.

Especie	Contenido de Humedad inicial (%)	Germinación Inicial (%)	Tiempo de Secado (días)
<i>S. mollissima</i>	6,97	52	2 a 30 d
<i>I. carnea</i>	13,3	56	3 a 90 d
<i>C. spinosa</i>	26,27	96	1 a 11 d
<i>C. flexuosa</i>	45	88	2 a 20 d

Otro factor que pudiese afectar al tiempo de secado son las proteínas (especialmente las LEA y dehidrinas) pues como menciona Shin et al.( 2008) <sup>(27)</sup> éstas confieren resistencia a la

<sup>24</sup> Chacón P, Bustamante R. 2001. The effects of seed size and pericarp on seedling recruitment and biomass in *Cryptocarya alba* (Lauraceae) under two contrasting moisture regimes. Vegetative 152 (2):137-144.

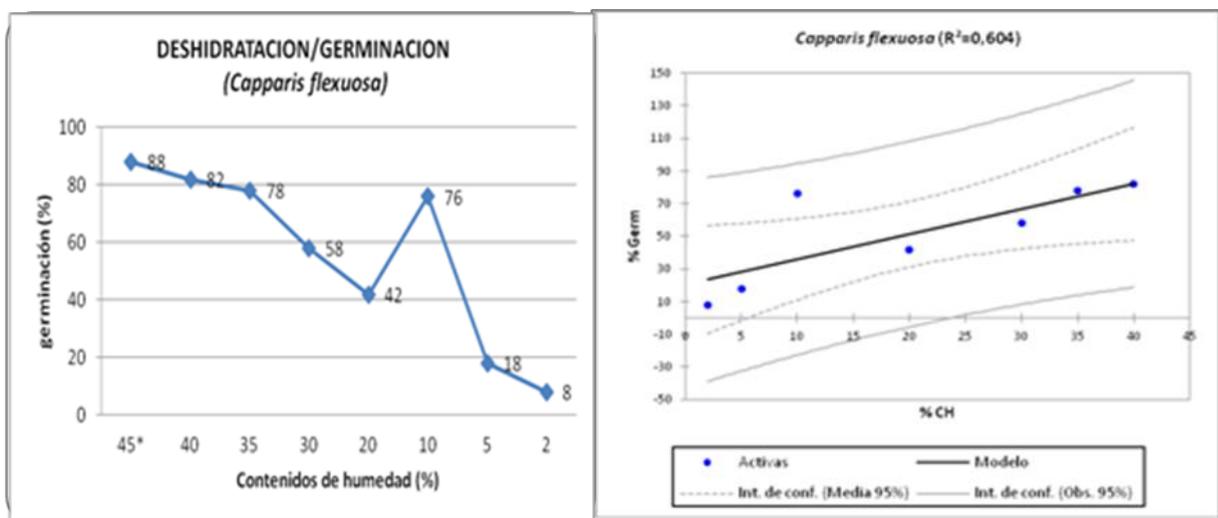
<sup>25</sup> Pukacka S. y Ratajczak E. 2005. Antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acer saccharinum* seeds. J Plant Physiol.

<sup>26</sup> Vásquez T, Corvera R, Nimer G, (2007). Viabilidad de semillas de Shiringa (*Hevea brasiliensis*) sometidas a diferentes tratamientos de almacenamiento Proyecto Diversidad Biológica de la Amazonía Peruana

<sup>27</sup> Shih Ming-Der, Hoekstra Folkert, Hsing Yue- ie, 2008 Late Embryogenesis Abundant Proteins ; Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica, Taipei 11529, Taiwan

deshidratación en semillas ortodoxas al reducir la desnaturalización de proteínas de membrana, lo que permite preservar la configuración fija de membrana durante la pérdida de agua. <sup>(1)</sup>

Con respecto a la viabilidad de las semillas durante la deshidratación, en la Gráfica 1 se indica que el porcentaje de germinación inicial de *C. flexuosa* antes de la deshidratación fue del 88% (característica de semillas recalcitrantes) pero conforme su contenido de humedad disminuyó la germinación tiende también a bajar notablemente hasta llegar a un 8% en el último contenido de humedad (2%). Es así que semillas recalcitrantes se diseminan en una condición húmeda y metabólicamente activa <sup>(1)</sup>, perdiendo rápidamente su capacidad de germinación al quedar expuestas a condiciones de baja humedad. <sup>(28)</sup>



A

B

Gráfica 1. A) Variación del Porcentaje de germinación en semillas de *C. flexuosa* durante el proceso de deshidratación. B) Correlación entre contenido de humedad y germinación de *C. flexuosa*.

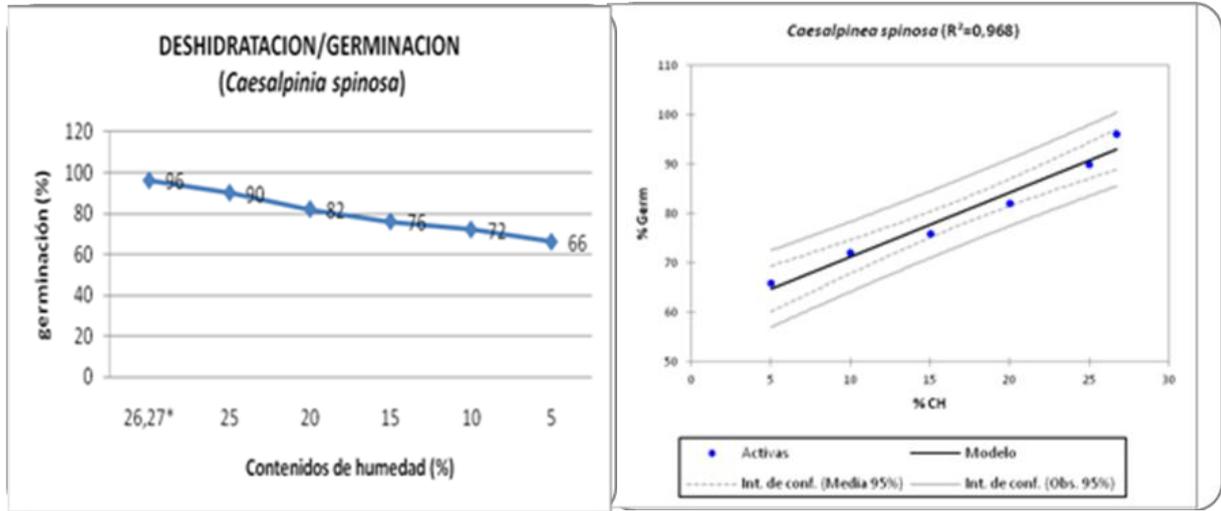
Como se puede observar en la gráfica 1 B, existe una correlación positiva moderada entre germinación y contenido de humedad del 64%, es decir a medida que se disminuye el contenido de humedad la germinación también tiende a bajar.

Para *C. spinosa* su estado inicial ocupó un alto grado de germinación del 96% permaneciendo viable en los siguientes niveles deshidratados, se podría decir que perdió un 30% de viabilidad desde el primer al último contenido de humedad, por lo que su germinación no se vio afectada

<sup>28</sup> Kermode A, Finch-Savage E. 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: Black, M. y H.W. Pritchard, editors. Desiccation and survival in plants. Drying without dying. CABI Publishing. pp. 149-184.



superando un 66%. En estudios similares se menciona que las semillas de esta especie presentan una alta viabilidad cuando se ha reducido su contenido de humedad, conservan un alto vigor y una germinación en forma más sincronizada, las plántulas crecen más rápido y uniformemente. <sup>(29)</sup> De igual manera existe una correlación positiva del 97% entre las dos variables.



A

B

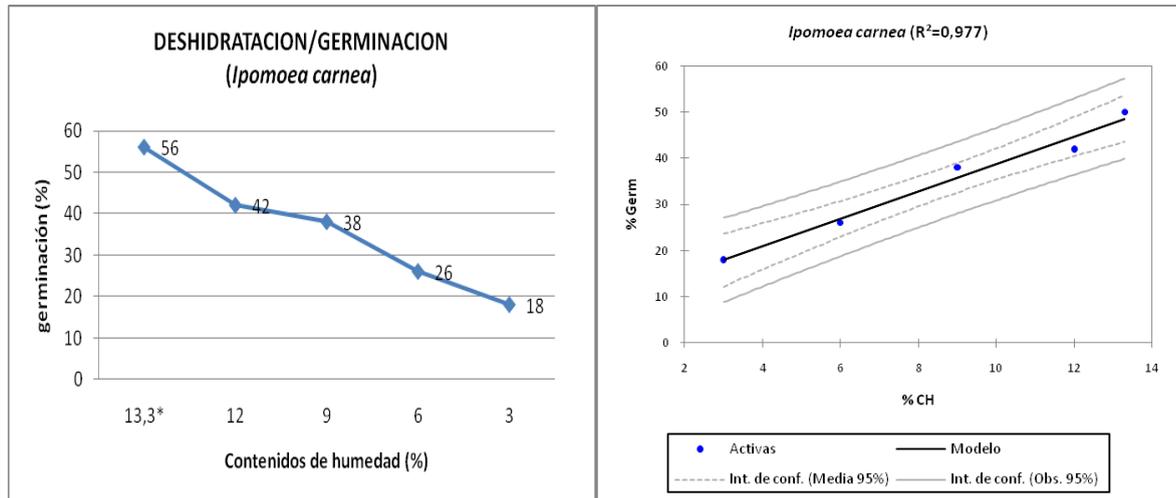
Gráfica 2. A) Porcentaje de germinación de semillas *C. spinosa* con sus cinco diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas. B) Correlación entre contenido de humedad y germinación de *C. spinosa*.

En cambio para semillas de *I. carnea* que presentaron un contenido de humedad inicial relativamente bajo, se mostró una germinación del 56%. La cual representa una de las especies con menor porcentaje de germinación en nuestro estudio, obteniendo un 42% de germinación en el primer contenido de humedad y un 18% cuando se redujo su contenido de humedad al 3% (Gráfica 3). El punto crítico donde la semilla perdió mayormente su viabilidad estuvo entre 6 y 3% del contenido de humedad. Esto se le puede atribuir a que esta especie presenta una latencia impuesta por la testa ya que en estudios realizados con esta especie indican que al eliminar la cubierta seminal observaron que el embrión de la semilla recién deshidratada cuenta con la madurez fisiológica para llevar a cabo la germinación. <sup>(30)</sup> Pero en el caso de *C. spinosa* la testa no parece ser el problema para la germinación sino algunos factores como la

<sup>29</sup> Perry, D. 1984. Manual de Métodos de Ensayo del Vigor. Instituto Nacional de Semilla y Plantas de vivero. Madrid. España

<sup>30</sup> Ponce-Salazar RM, J Márquez-Guzmán, AE Brechú-Franco y G Laguna-Hernández (1990). Desarrollo e histoquímica de la cubierta seminal de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth (Convolvulaceae) y su relación con la impermeabilidad de la testa. Phytón. 5 1 : 5-12.

variabilidad interespecífica en la capacidad de germinación que puede ser atribuida a diferencias en las condiciones climáticas entre las áreas de crecimiento de las especies, pues como indicó Silvertown (1981), el hábitat que ocupan las especies es el último responsable del comportamiento de la germinación de sus semillas.<sup>(31)</sup> Existe una correlación positiva del 97% entre las dos variables contenido de humedad y germinación.



A

B

**Gráfica 3.** A) Porcentaje de germinación de semillas de *I. carnea* con diferentes porcentajes de contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas. B) Correlación entre contenido de humedad y germinación de *I. carnea*

Las semillas de *S. mollissima*, presentaron un contenido inicial de humedad del 6,97%, y una germinación del 52% (Gráfica. 4). La capacidad de germinación después de la pérdida de humedad fue escasa llegando a obtener 16% en su último contenido de humedad. Esos resultados pudieron deberse a que al estar expuestas a deshidratación, posiblemente requerían más tiempo para germinar, observándose un escaso desarrollo que no sobrepasó un 50% de germinación.

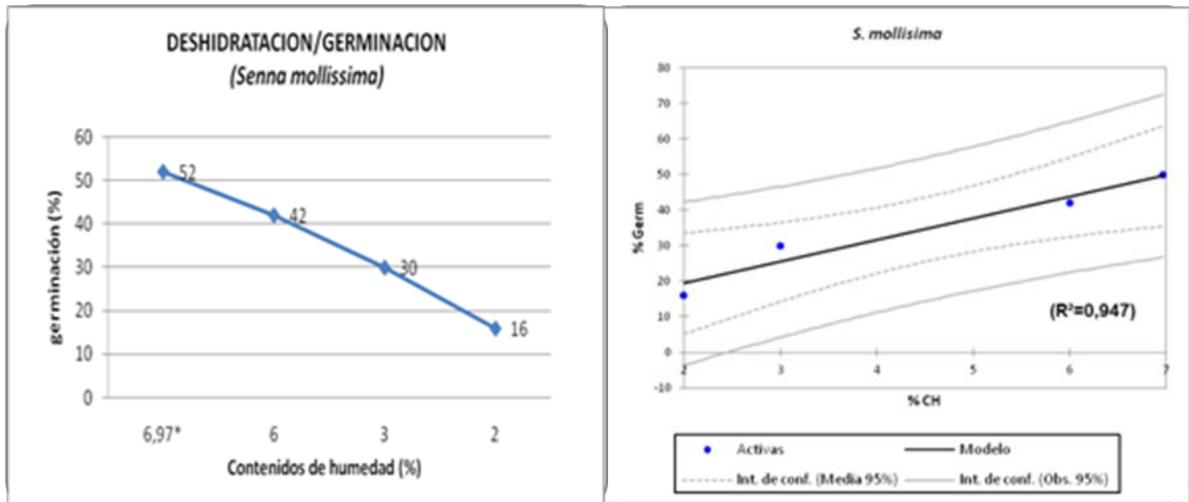
Evidentemente existe la presencia de latencia física causada por una testa impermeable que impide el ingreso de agua y posiblemente el intercambio gaseoso<sup>(32)</sup>, debido a que las semillas ortodoxas permanecen viables después de su desecación.<sup>(16)</sup> Como se puede observar en el

<sup>31</sup> Silvertown, J. W. (1981). Seed size, life span and germination date as coadapted features of plant life history. *Amer. Naturalist* 118: 860-864.

<sup>32</sup> Fenner M, Thompson K. 2006. Genetic and physiological evidence for the role of gibberellic acid in the germination of dormant *Avena fatua* seeds. *Journal of Experimental Botany* 49: 89-94.



gráfico 4B existe una correlación entre germinación y contenido de humedad del 94% es decir mientras baja el CH, también baja el porcentaje de germinación de las semillas.



A

B

**Gráfica 4.** A) Porcentaje de germinación de semillas de *S. mollissima* con sus cuatro diferentes contenidos de humedad, luego de ser deshidratadas. B) Correlación entre contenido de humedad y germinación de *S. mollissima*.

El análisis de correlación entre porcentajes de germinación y contenido de humedad en las especies en estudio mostraron una correlación positiva estadísticamente significativa. Esto lleva a pensar que la germinación depende notablemente de su contenido de humedad, al señalar que la variación en la germinación se explica mediante la variación en su contenido de humedad.

#### 4.2. PROTEINAS TOTALES

Con respecto al contenido de proteínas totales las semillas presentaron variaciones en la concentración proteica. Como podemos observar en la tabla 6. En *I. carnea*, la cantidad de proteínas resultó con escasas concentraciones en todos los niveles deshidratados, similares resultados se presentaron en *S. mollissima*, esto posiblemente podrían deberse al comportamiento de conservación de las semillas y a la presencia de ácido abscísico (ABA) que influye en la síntesis de varias clases de proteínas implicadas en la adquisición del estado latente y la tolerancia a la deshidratación.<sup>(33)</sup> Por otra parte pueden influir las condiciones atribuidas a características propias de la planta y condiciones ambientales<sup>(34)</sup>, a las cuales fueron

<sup>33</sup> Bewley, J.D. y 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.

<sup>34</sup> Rangel M. 2009. Anatomía y tolerancia a la desecación de semillas de cacao (*Theobroma cacao L*), Montecillo, Texcoco, Edo de México



sometidas, lo que hizo que sus mecanismos bioquímicos y fisiológicos fueran alterados de tal manera se obtuvo una escasa concentración de proteínas.

TABLA 6: Concentración de proteínas totales en ug/ml en especies y sus distintos niveles de deshidratación.

Especie	Contenidos de humedad (%)	Proteínas totales ug/ml
<i>Ipomoea carnea</i>	3	-2,076
	6	0,179
	9	0,63
	12	0,63
<i>Senna mollissima</i>	2	0,623
	3	0,353
	6	1,211
<i>Caesalpinia spinosa</i>	5	2,339
	10	0,78
	15	1,297
	20	0,388
	25	1,43
<i>Capparis flexuosa</i>	2	0,82
	5	15,48
	10	1,449
	20	1,598
	30	1,596
	35	1,449
	40	25,67

En tanto que en semillas de *C. flexuosa* existió un mayor aumento de concentración proteica preferentemente en el segundo y último nivel de deshidratación. (Tabla 6), siendo escasa en los demás contenidos de humedad, por lo que podrían existir diversos mecanismos asociados con la tolerancia a la desecación de semillas por lo tanto acumulación de moléculas de protección (LEA), sacarosa y oligosacáridos, <sup>(35)</sup> ya que la ausencia o la expresión inefectiva de uno o más de estos procesos puede determinar la sensibilidad a la desecación. <sup>(36)</sup>

Sin embargo en semillas de *C. spinosa* la concentración proteica mejoró en los niveles (5, 15 y 25% CH), (tabla 6), ya que la variación en la tolerancia a la deshidratación y aumento proteico en semillas puede deberse a distintas características como acumulación de moléculas de reserva (sacarosa y oligosacáridos), reducción de la superficie de las membranas y el citoesqueleto, presencia y eficiencia en los sistemas antioxidantes y principalmente la participación de

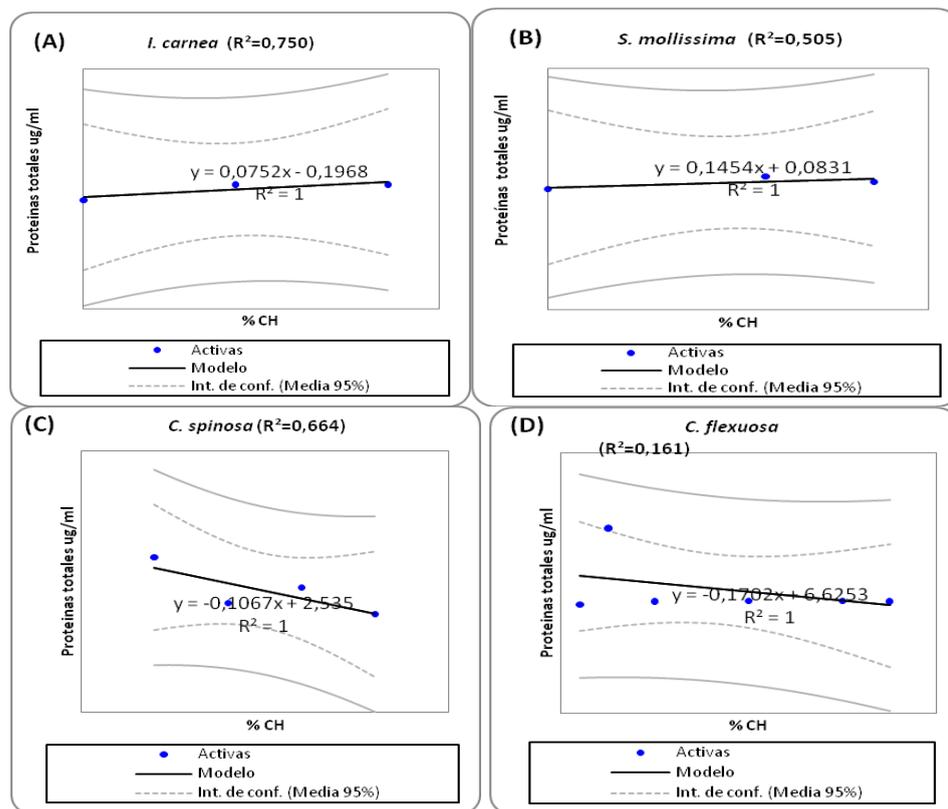
<sup>35</sup> Leprince O, Wertucci C, Hendry G, Atherton N. 1995. The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature. *Physiologia Plantarum* 94: 233-240

<sup>36</sup> Farrant M, Pammenter W, Berjak P. 1993. Seed development in relation to desiccation tolerance: A comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seed of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. *Seed Science Research* 3:1-13.



mecanismos de reparación durante la rehidratación características intrínsecas de la planta que están sujetas a condiciones de presencia o ausencia de proteínas. <sup>(1)</sup> Es así que todas las especies presentan una cantidad considerable de proteínas que no aumenta ni disminuye a lo largo de todo el proceso de deshidratación, de manera que estas no se ven afectadas en lo absoluto y por lo tanto expresan similares resultados en todas las semillas de diferente comportamiento. Durante los procesos de desarrollo y maduración, cuando ocurre la desecación natural, las semillas acumulan transcritos y proteínas de protección entre otros componentes involucrados en estados de deshidratación presentados en concentraciones considerables, protegiendo de esta manera a semillas expuesta a estos procesos. <sup>(37)</sup>

Para confirmar los resultados obtenidos mediante ensayo Bradford se realizó un análisis de correlación en todos los CH con el programa XLstat obteniéndose los resultados mostrados en la gráfica 5.



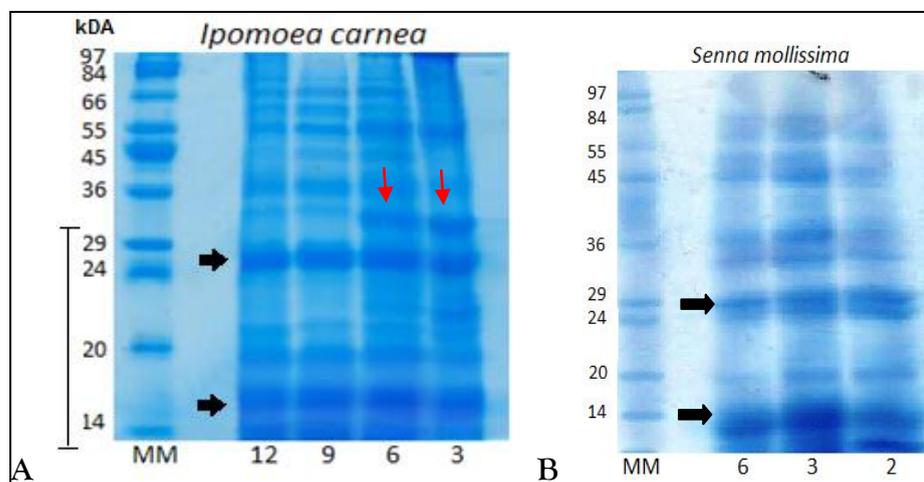
Gráfica 5. Análisis de correlación entre porcentaje de Contenido de humedad (CH) y concentración de proteínas totales (ug/ml), con un intervalo de confianza del 95% A) *I. carnea*, B) *S. mollissima*, C) *C. spinosa* y D) *C. flexuosa*.

<sup>37</sup> Campos F, Cruz F. 2002. Expression of Late Embryogenesis Abundant (Lea) Protein codifying genes during osmopriming of maize and bean seeds, AGROCIENCIA VOL. 36, México, D.F.

De esta manera se puede observar que en todas las especies no existe una relación relevante entre concentración de proteínas y contenido de humedad ya que el valor de R no fue cercano o próximo a 1 y el análisis de varianza presentó un escaso grado de significancia entre las dos variables, pudiéndose establecer que no ocurre una alta concentración de proteínas totales al deshidratar a mayor porcentaje las semillas.

### 3.3. ELECTROFORESIS SDS -PAGE

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. (Fig.1 y 2). En semillas de *I. carnea*, se presentó un efecto más notorio en todos los CH con bandas de 14 y 24 KDa, del mismo modo se observó una marcada intensidad en los contenidos de humedad de 3 y 6% con bandas de 29 KDa. (Fig.1A). Lo que podría significar que a mayor deshidratación existe mayor concentración de proteínas posiblemente aquellas que permitan tolerar altos grados de deshidratación como las proteínas LEA 1 (D-19) y 2 (D-11) “dehidrinas”<sup>(38)</sup>, las que se encuentran dentro de un intervalo de 6,8 a 20,3 y 5,3 a 66.3 KDa,<sup>(39)</sup> son consideradas como altamente hidrofílicas, las cuales expresan resistencia contra diferentes tipos de estrés osmótico.<sup>(40)</sup>



**Figura 1.** Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas en semillas usando (MM) marcador molecular sigma de 6,500- 200,000Da. Las flechas negras indican bandas bien definidas en todos los niveles de deshidratación y las flechas rojas indican bandas que se presentaron en algunos niveles deshidratados.

<sup>38</sup> Battaglia M, Olvera Y, García A, Campos F, y Covarrubias A. 2008. The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. American Society of Plant Biologists

<sup>39</sup> Der Shih M, Hoekstra F, Hsing Y. 2008. Late Embryogenesis Abundant Proteins; Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica, Taipei 11529, Taiwan.

<sup>40</sup> Swire-Clark, G.A., R.W. Marcotte. 1999. The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Sacharomyces cerevisiae*. Plant Mol. Biol. 39, 117-128.



Del mismo modo en *S. mollissima* se encontró una notable intensidad de bandas en todos los niveles deshidratados con pesos de 14, 24 y 29 KDa, a nivel de todo el perfil electroforético (Fig.1B), existiendo bandas representativas correspondientes al 3 y 6%, con 36 y 45 KDa, de forma similar se expresaron bandas a la altura de 20 KDa, mostrando mayor énfasis en los niveles 2 y 3 %, (Fig. 1B) (Tabla 7). De tal manera se define a estas bandas como aquellas de bajo peso molecular y posiblemente pertenecientes a las proteínas LEA del grupo 1 y 2 que son abundantes durante la maduración y el estrés a la desecación celular. <sup>(41)</sup> Conteniendo a la vez altas cantidades de residuos de Glicina, lo que hace que semillas con características ortodoxas como las posibles semillas de *I. carnea* y *S. mollissima*, del presente estudio permanezcan viables por largos periodos de tiempo. <sup>(42)</sup>

TABLA 7. Presencia de Bandas de proteínas en semillas de (*I. carnea* y *S. mollissima*), en distintos contenidos de Humedad (%)

	Contenidos de humedad				
	(%)	3	6	9	12
<i>Ipomoea carnea</i>	Bandas individuales (KDa)	29	29	-	-
	Bandas compartidas (KDa)		14, 20, 24 y 55		
	Contenidos de humedad (%)	2	3	6	
<i>Senna mollissima</i>	Bandas individuales (KDa)	20	20, 36 y 45	36 y 45	
	Bandas compartidas (KDa)		14, 24 y 29		
	Contenidos de humedad (%)	2	3	6	

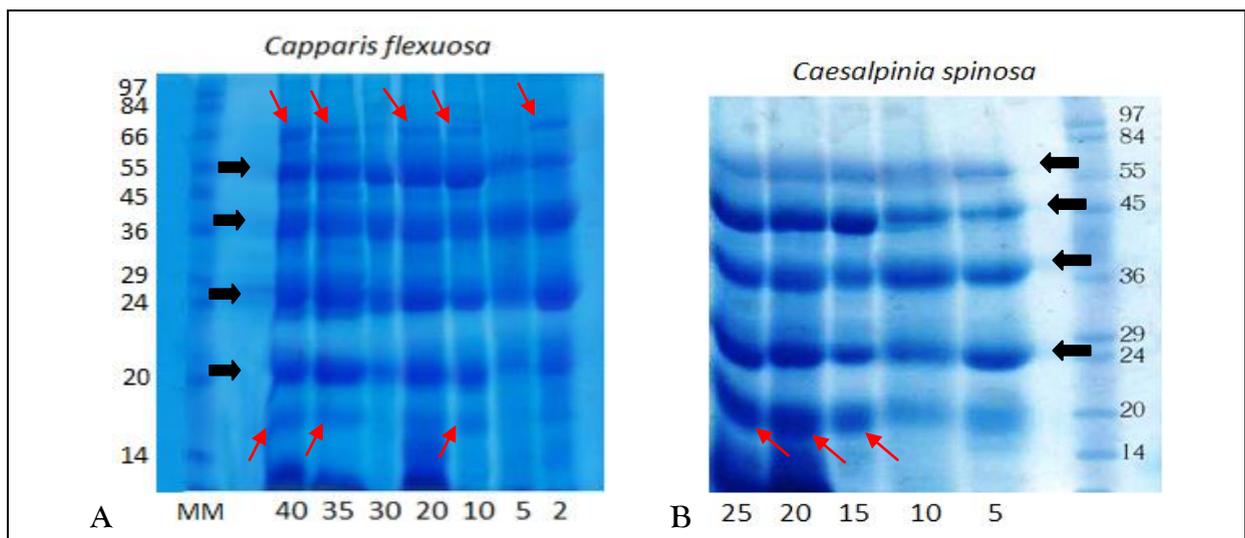
Para las especies *C. flexuosa*, como podemos observar en la fig 2A se presentó una intensidad de bandas en todos los niveles de deshidratación, concernientes a los pesos 20, 24, 36 y 55, KDa, siendo más marcadas en los niveles 10, 20, 35 y 40% de deshidratación.

<sup>41</sup> Dure L. 1993. Structural motifs in Lea proteins. p. 91-103. American. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD.

<sup>42</sup> Baker J, Steele Cy, Dure L. 1988. Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. Plant Mol. Biol. 11: 277-291.

A la vez existe la presencia de bandas individuales en los niveles 10, 35 y 40 % con bandas de 14, KDa, en tanto que fueron más significativas aquellas bandas concernientes a 66 KDa en todos los niveles a excepción del 5 y 30% de deshidratación que ocurrió una pérdida absoluta de bandas. (Tabla 8)

Esta especie presenta una mayor expresión de proteínas de alto y bajo peso molecular con cual alcanza 66 KDa de tal manera se podría atribuir características de proteínas involucradas a procesos de desecación como las proteínas LEA de tipo 2 las dehidrinas, asociadas a los procesos de deshidratación y tolerancia a la desecación que suelen formar hélices anfífilas<sup>(43)</sup>, que actúan secuestrando iones en el citoplasma de células estresadas, conformando el citoesqueleto o un citoplasma hidrófilo y manteniendo 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.<sup>(44)</sup>



**Figura 2.** Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas en semillas usando (MM) marcador molecular sigma de 6,500- 200,000Da. En las dos especies las flechas negras indican bandas repetidas en todos los niveles de deshidratación y las flechas rojas indican bandas que se presentaron en algunos niveles deshidratados.

En tanto que para *C. spinosa* se exhibió una expresión en los 5 niveles con bandas de 24, 36, 45 y 55 KDa (Tabla 8), siendo de menor intensidad las bandas de 55 KDa (Fig. 2B).

<sup>43</sup> Nambara. E, Marion-Poll. A, 2003, ABA action and interactions in seeds. Trends Plant Sci. 8(5): 213-217.

<sup>44</sup> 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.



Simultáneamente se observó presencia de bandas en 20 KDa a nivel de todo el perfil electroforético mostrando una diferencia con disminución de intensidad en el nivel 5 y 10% de deshidratación, (tabla 8). En particular la deshidratación no afectó la expresión de proteínas puesto que se evidenció la presencia de proteínas a lo largo de todo el perfil electroforético posiblemente concuerdan con las proteínas existentes en las demás especies de carácter ortodoxo y recalcitrante quienes expusieron posibles proteínas LEA de tipo 1 y 2 dehidrinas con similares pesos moleculares.

TABLA 8. Bandas de proteínas en semillas de *C. flexuosa* y *Caesalpinia spinosa*, en distintos contenidos de humedad (%).

		Contenidos de Humedad (%)	2	5	10	20	30	35	40
<i>Capparis flexuosa</i>	Bandas individuales (KDa)		66	-	14, 66	66	-	14, 66	14, 66
	Bandas compartidas (KDa)				20, 24, 36 y 55				
	Contenidos de Humedad (%)		5	10	15	20	25		
<i>Caesalpinia spinosa</i>	Bandas individuales (KDa)		-	-	20	20	20		
	Bandas compartidas (KDa)				24, 36, 45 y 55				
	Contenidos de Humedad (%)		5	10	15	20	25		

Es así que todas las especies analizadas con ensayos electroforéticos abarcan una mayor cantidad de proteínas involucradas en procesos de desecación como podrían ser las proteínas LEA tipo 1 y 2 dehidrinas, que tienen características altamente hidrofílicas, las cuales expresan resistencia contra diferentes tipos de estrés osmótico. <sup>(45)</sup>

Algunas involucradas con una alta resistencia a estados de desecación, ayudando a mantener una cantidad mínima de agua durante este proceso de tal manera que estabiliza la estructura

<sup>45</sup> Swire-Clark, G.A. , R.W. Marcotte. 1999. The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Sacharomyces cerevisiae*. Plant Mol. Biol. 39, 117-128.

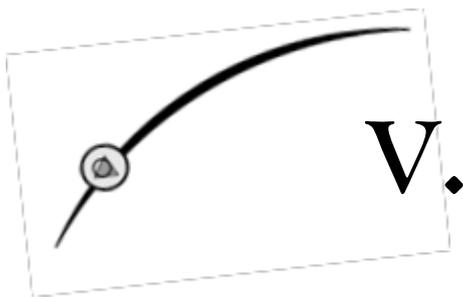


citoplasmática <sup>(46)</sup>, con membranas estables encontrándose en altas cantidades durante la desecación y además pueden ejercer funciones protectoras en diferentes tipos de estrés. <sup>(47)</sup> Ocasionando que semillas ortodoxas y recalcitrantes lleguen a tolerar procesos de desecación, como los expuestos en nuestro estudio.

---

<sup>46</sup> Lane B. 1991. Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. FASEB J 5 2893-2901

<sup>47</sup> 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.



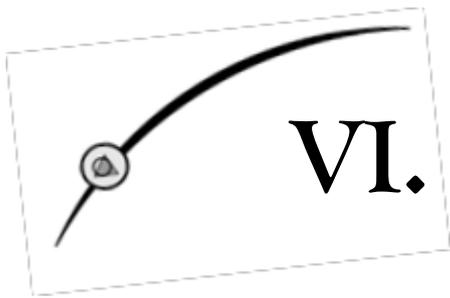
V.

*Conclusiones*



## V CONCLUSIONES

- ✓ Según el comportamiento de conservación de las semillas se pudo llegar a concluir que las especies *I. carnea* y *S. mollissima* adquirieron un alto grado de tolerancia a la deshidratación por lo cual se las podría considerar como semillas ortodoxas.
- ✓ Las semillas de *C. flexuosa* a diferencia de las otras especies según su comportamiento de conservación poseen una tendencia recalcitrante debido a su alto contenido de humedad inicial y a la pérdida de su viabilidad durante su deshidratación.
- ✓ Según el contenido de humedad inicial y los resultados de viabilidad de semillas durante el proceso de deshidratación, *C. spinosa* presenta un comportamiento de conservación intermedio.
- ✓ Mediante el análisis electroforético en semillas deshidratadas se pudo identificar bandas de proteínas que por su peso molecular podría posiblemente pertenecer a las proteínas denominadas LEA (Late embryogenesis Abundant).
- ✓ Las bandas proteicas encontradas en todas las especies sometidas a deshidratación presentaron pesos moleculares de 24 KDa que se las podría incluir dentro del grupo de las proteínas involucradas en la deshidratación.

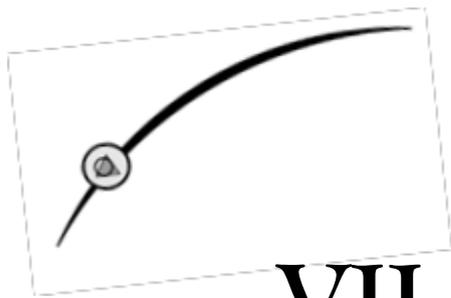


**VI.** *Recomendaciones*



## VI RECOMENDACIONES

- ✓ Trabajar con más especies para identificar patrones generales a nivel de más especies con diferente comportamiento de conservación.
- ✓ Utilizar otros contenidos de humedad críticos hasta donde la especie tolere para poder encontrar bandas proteicas relacionadas con este tipo de cambio.
- ✓ Realizar un nuevo estudio con una modificación en el protocolo de electroforesis como concentración de acrilamida y voltajes al momento de la corrida del gel.



## VII. *Anexos*



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

### Materiales

- Cajas petri.
- Papel Absorbente.
- Agua destilada.
- Parafina
- Mechero
- Alcohol 70%
- Semillas de *Senna mollissima*, *Ipomoea carnea*, *Capparis flexuosa* y *Caesalpinia spinosa*.

### 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.



EXTRACCIÓN DE PROTEINAS	ANEXO II
-------------------------	----------

### 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 (10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l).
- Pera

### Soluciones para la Extracción de Proteínas.

#### ✓ Tris-HCl 0.01M

100ml	
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%	100 $\mu$ l
Tritón X-100 al 0,1%	100 $\mu$ l
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.



CUANTIFICACION DE PROTEINAS BRADFORD

ANEXO III

**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 *Senna mollissima*, *Ipomoea carnea*, *Capparis flexuosa* y *Caesalpinia spinosa*.

**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 toman 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.



<b>ELECTROFORESIS SDS-PAGE</b>	<b>ANEXO IV</b>
--------------------------------	-----------------

**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 *Senna mollissima*, *Ipomoea carnea*, *Capparis flexuosa* y *Caesalpinia spinosa*.
- 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
Acilamida 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 $\mu$ l	1.53 ml	2.295 ml
Tris HCl pH 6.8 1.5M	86.66 $\mu$ l	173.32 $\mu$ l	260 $\mu$ l
10% SDS	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l
10% APS	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l
TEMED	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	3 $\mu$ l
40% Acrylamide mix	125 $\mu$ l	250 $\mu$ l	375 $\mu$ l

- 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.<sup>48</sup>

<sup>48</sup> Sambrook and Rusell 2006. The condensed Protocols from molecular cloning; primera edición. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Ney York.