



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

TITULACIÓN DE INGENIERO EN GESTIÓN AMBIENTAL

Determinación de patrones proteícos durante el proceso de deshidratación en semillas de diferente comportamiento de conservación.

Trabajo de fin de Titulación

Autor:

Loayza Jaramillo, Freddy Javier

Director:

Romero Saritama, José Miguel. Ing.

Loja – Ecuador

2012

Certificación

Ing.

José Miguel Romero Saritama

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación, denominado: **“Determinación de patrones proteicos durante el proceso de deshidratación en semillas de diferente comportamiento de conservación”** realizado por el profesional en formación: Freddy Javier Loayza Jaramillo, cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, 18 de Julio del 2012

.....,
Ing. José Miguel Romero Saritama
C.I:

Cesión de derechos

Yo, (Freddy Javier Loayza Jaramillo) declaro ser autor del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja, y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro 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 de tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad".

f.

Freddy Javier Loayza Jaramillo

CI. 0704368141

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

“Las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de su autor”.

Nombre del autor

Firma

Freddy Javier Loayza Jaramillo

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, que siempre ha estado iluminando mi camino para poder ser un hombre de bien, y poder terminar este difícil proyecto.

A mi amada esposa Estefanía Iñiguez, quien ha sido mi pilar para seguir adelante en los momentos más difíciles de este largo camino, gracias por tu amor incondicional sin ti no lo habría logrado. A mi amado hijo Cristopher Matías Loayza quien es la razón de mi existir y de mi superación.

Con profundo amor y agradecimiento a mis padres Vilma Jaramillo y Freddy Loayza, por su amor y apoyo incondicional. A mi hermana Andrea Loayza que siempre ha estado cuando más la he necesitado.

A mis abuelitos Mariana Jaramillo y Raúl Jaramillo, quienes han sido mas que unos padres para mí y gracias a ellos soy la persona que conocen ahora. Y a todos mis tíos y tías quienes me ayudaron a formarme.

Y una dedicatoria especial a mis queridos suegros Esmeralda Córdova y Lauro Iñiguez, quienes me brindaron su apoyo incondicional en las buenas y malas, les debo tanto y espero algún día poder retribuir a tanto.

¡Los Amo!

Freddy Javier Loayza Jaramillo
Nombre del autor

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Particular de Loja, al personal docente de la carrera de Gestión Ambiental, que con sus enseñanzas han contribuido a mi formación como profesional.

Al Banco de Germoplasma del Departamento de Ciencias Naturales, por contribuir en mis conocimientos como estudiante y brindarme el apoyo en la realización de mi proyecto de fin de carrera.

Al Ing. José Miguel, y las personas que forman el Instituto de Ecología, por su constante apoyo y orientación en la realización de mi trabajo.

Y un agradecimiento especial a mis Padres, Suegros y Esposa por motivarme y apoyarme a seguir con mis estudios y ser mis pilares para cumplir con mis metas.

¡Gracias!

Freddy Javier Loayza Jaramillo

INDICE

Índice de contenidos

CERTIFICACIÓN.....	I
CESIÓN DE DERECHOS.....	II
AUTORIA.....	III
DEDICATOR.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
INDICE DE CONTENIDOS.....	VI
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	4
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	8
CONCLUSIONES.....	21
RECOMENDACIONES.....	22
BIBLIOGRAFIA.....	23
ANEXOS.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de humedad inicial y los diferentes niveles deshidratados.	5
---	---

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especies en estudio.....	4
---	---

Figura 2. Procedimiento para la obtención de proteínas.....	6
--	---

ÍNDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Porcentajes de germinación y días transcurridos durante la deshidratación.....	8
--	---

Grafica 2. Diferencia significativa en base a la prueba de Tukey.....	9
--	---

Grafica 3. Porcentajes de germinación y días transcurridos durante la deshidratación.....	9
--	---

Grafica 4. Diferencia significativa en base a la prueba de Tukey.....	10
--	----

Grafica 5. Porcentajes de germinación y días transcurridos durante la deshidratación.....	11
--	----

Grafica 6. Diferencia significativa en base a la prueba de Tukey.....	12
--	----

Grafica 7. Porcentajes de germinación y días transcurridos durante la deshidratación.....	12
--	----

Grafica 8. Porcentajes de germinación y días transcurridos durante la deshidratación.....	14
--	----

Grafica 9. Diferencia significativa en base a la prueba de Tukey.....	15
--	----

Grafica 10. Fluctuación en la cantidad de proteínas totales.....	16
---	----

Grafica 11. Regresión lineal programa Xlstat.....	17
--	----

Grafica 12. Fluctuación en la cantidad de proteínas totales.....	17
---	----

Grafica 13. Regresión lineal programa Xlstat.....	18
--	----

Grafica 14. Fluctuación en la cantidad de proteínas totales.....	18
---	----

Grafica 15. Regresión lineal programa Xlstat.....	19
--	----

Grafica 16. Fluctuación en la cantidad de proteínas totales.....	20
---	----

Grafica 17. Regresión lineal programa Xlstat.....	20
Grafica 18. Fluctuación en la cantidad de proteínas totales.....	21
Grafica 19. Regresión lineal programa Xlstat.....	21

RESUMEN:

Las semillas como todo ser vivo tienen proteínas, las cuales son de gran importancia para el normal funcionamiento de estas, un procedimiento para determinar la concentración de proteínas en las semillas, es el análisis Bradford. La pérdida neta de proteínas en las semillas, está relacionado con el envejecimiento por causa de la deshidratación. El objetivo de este estudio fue cuantificar proteínas totales, en diferentes niveles de humedad en semillas con diferente comportamiento de conservación, y determinar la tolerancia a la deshidratación de las de cinco especies.

Los resultados mostraron que *Lafoencia acuminata* y *Senna alata* tienen una tendencia de comportamiento ortodoxo, mientras que *Coccoloba ruiziana* presentó un comportamiento intermedio, y en *Myrtus communis* y *Capparis flexuosa* estas mostraron tendencia a un comportamiento recalcitrante. Cuatro especies presentaron concentraciones similares de proteínas en las semillas que van desde 0,042 hasta las 6,488 ug/ml, excepto *Myrtus communis* que presentó 177,343; 12,919 y 16,455 ug/ml proteínas en los niveles 25, 20 y 10% de humedad respectivamente durante la deshidratación no existiendo correlación entre cantidad de proteínas y niveles de humedad en las semillas.

Palabras clave: Proteínas totales, semillas ortodoxas, semillas recalcitrantes, semillas intermedias, Análisis bradford, deshidratación, semillas.

SUMMARY:

The seeds are like all living proteins, which are important for the normal functioning of these, a method for determining protein concentration in seed is the Bradford analysis. The net loss of the proteins in the seeds is related to aging caused by dehydration. The objective of this study was to quantify total protein, at various levels of moisture in different seed storage behavior, and determine the desiccation tolerance of the five species.

The results showed that *Senna alata* *Lafoencia acuminata* and have a tendency of orthodox behavior while *Coccoloba ruiziana* presented an intermediate behavior, and in the case of *Myrtus communis* and *Capparis flexuosa* these tended to recalcitrant behavior. Four species showed similar concentrations of protein in seeds ranging from 0.042 to the 6.488 ug / ml, except *Myrtus communis* presented 177.343, 12.919 and 16.455 ug / ml protein at levels 25, 20 and 10% humidity respectively for the dehydration no correlation exists between protein and moisture levels in the seeds.

Keywords: Total protein, orthodox seeds, recalcitrant seeds, seeds intermediate bradford Analysis, dehydration, seeds.

INTRODUCCIÓN:

En las semillas como en todo ser vivo existen proteínas, las cuales son de gran importancia para el normal funcionamiento de estas en algunas especies (Beevers & Poulson, 1992). Ellas constituyen más del 50% del peso seco de la célula, las proteínas más comunes que encontramos en las semillas son las globulinas, albuminas, prolaminas y proteínas de almacenamiento (Nielsen et al., 1995). Ciertas cantidades de éstas se acumulan en un corto período de tiempo durante el desarrollo de la semilla en muchas especies. Las proteínas de almacenamiento, las prolaminas, las globulinas y las albuminas se acumulan poco en especies, sin embargo constituyen una alta proporción de la proteína total de la semilla madura (Laurie & Robert, 1990).

Estudios realizados con diferentes especies de semillas, como por ejemplo en el olivo y soja han demostrado que las proteínas de reserva se almacenan en el embrión y el endospermo (Bawley & Black, 1994). Las proteínas de reserva en embriones y células vegetativas, son sintetizadas durante el desarrollo de la semilla e hidrolizadas durante la maduración, imbibición y germinación de estas, proporcionando una de las principales fuentes de carbono, nitrógeno y azufre para el subsiguiente crecimiento y desarrollo. 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 (Bawley & Black, 1994).

Un procedimiento para la determinación de la concentración de proteínas en las semillas, es el análisis Bradford; que consiste 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, como los detergentes y las soluciones básicas. (Bradford, 1976; Fernández, 2007).

La pérdida neta de las proteínas en las semillas, es quizás el deterioro más básico de todos los eventos relacionados con el envejecimiento por causa de la deshidratación, ya que estos cambios podrían ser la base de todos los demás aspectos de la disminución del metabolismo. La disminución en el contenido de proteínas por envejecimiento de las semillas puede ser debido

a: 1) un daño extenso en la síntesis de proteínas reportado en diferentes sistemas del cultivo (Hallman et al. 1973), una germinación reducida o semillas no viables en el árbol (Espíndola et al. 1994); ó 2) la síntesis o la activación de grandes cantidades de enzimas proteolíticas durante el deterioro de la semilla (Bewley & Negro 1982).

La deshidratación es el procedimiento más delicado en el tratamiento de las semillas y uno de los problemas más difíciles de la conservación *ex situ*. Es necesario efectuar un seguimiento continuo de la deshidratación, porque las distintas etapas del desarrollo de las semillas están condicionadas por factores mecánicos, químicos, morfológicos y fisiológicos que pueden favorecer su germinación, pero también determinar la dormición. Cada tipo de semilla pasa por un proceso diferente de deshidratación que, si se efectúa mal, puede comprometer la viabilidad de la misma (Genmedoc, 2005).

La semilla es uno de los principales recursos para el manejo agrícola y silvícola de las poblaciones vegetales, para la reforestación, para la conservación del germoplasma vegetal y para la recuperación de especies valiosas sobreexplotadas. Éstas pueden almacenarse vivas por largos periodos, asegurándose así la preservación de especies y variedades de plantas valiosas (Trujillo, 1990). Para poder almacenar las semillas a largo plazo es necesario que primero pasen por un proceso de deshidratación, pero lamentablemente todas las semillas difieren en su tolerancia a la desecación. Según este parámetro, las semillas se pueden clasificar en ortodoxas, recalcitrantes e intermedias (Farrant et al., 1993). Las semillas ortodoxas toleran una deshidratación hasta de 5% en el contenido de humedad; por su parte, las semillas que toleran la deshidratación entre 10% y 12,5% de contenido de humedad se consideran intermedias y las que toleran la deshidratación entre 15% y 50% de humedad se denominan recalcitrantes (Farrant et al., 1993; Gentil, 2001).

En la mayoría de especies recalcitrantes, la reducción de humedad produce una reducción de la germinación (Floriano, 2004), un ejemplo claro es la especie ***Quercus nigra***, que cuando su contenido de humedad baja al 30%, la germinación se anula, tal y como han puesto de manifiesto de Zulueta & Montoto (1992). Otro ejemplo que se da en las semillas recalcitrantes, es la familia del café, el contenido de humedad mínimo que toleran las semillas de *C. arabica*, *C. canephora* y *C. liberica* sin reducir su viabilidad, es de aproximadamente 9, 11, y 24% respectivamente (Gentil, 2001 & Eira et al., 2006) con reducción en la viabilidad a bajas temperaturas (Gentil, 2001); a diferencia de las semillas de *C. costatifructa*, *C. racemosa* y *C. sessiliflora* las cuales mostraron un nivel crítico de humedad de semilla de 19, 30 y 30%, respectivamente (Dussert et al., 1998).

Las semillas Ortodoxas sufren deterioro en su viabilidad, pero a una tasa inferior que las semillas recalcitrantes. En estas los cambios en las reservas de alimento almacenado parecen no afectar la viabilidad o vigor de la semilla (Black M. 1992). Un ejemplo claro de esto es la especie *Cratylia argentea*, la cual fue sometida a niveles de deshidratación del 10%, 8% y 6%; siendo su viabilidad del 95%, 86% y 76% respectivamente. (Montoya & Bonilla, 2009).

El objetivo de este estudio fue cuantificar proteínas totales, en diferentes niveles de humedad en semillas con diferente comportamiento de conservación, y determinar la tolerancia a la deshidratación de las de cinco especies.

METODOLOGIA

COLECCIÓN DE MATERIAL:

Se colectaron semillas maduras de las siguientes especies; *Lafoensia acuminata* (Ruiz y Pav.) (Lythraceae); *Senna alata* (L.) Roxb (Cesalpiniaceae); *Coccoloba ruiziana* (Lindau) (Polygonaceae); *Myrtus communis* (Linneo) (Myrtaceae); y *Capparis flexuosa* (Linneo) (Capparaceae) (figura 1), distribuidas en la provincia de Loja. Las semillas fueron transportadas al laboratorio del Banco de Germoplasma de la Universidad Técnica Particular de Loja, en fundas de tela para evitar una deshidratación previa.



Figura 1: Semillas de las cinco especies en estudio **a)** *Lafoensia acuminata*. **b)** *Senna alata*. **c)** *Coccoloba ruiziana*. **d)** *Myrtus communis*. **e)** *Capparis flexuosa*.

CONTENIDO DE HUMEDAD.

Colectadas la semillas, se procedió a calcular en el laboratorio el porcentaje de **humedad inicial** de las mismas, para ello se utilizaron dos réplicas de 10 o 20 semillas, (dependiendo del tamaño) el método realizado fue de secado en estufa a temperatura baja y constante 103 °C por 17 horas (ISTA, 2005), finalizado el procedimiento se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de humedad.

Formula: (%CH= $\frac{pi-pf}{pi} \times 100$)

CH= Contenido de Humedad

pi= peso inicial

pf= peso final

DESHIDRATACIÓN DE SEMILLAS

Determinado el contenido de humedad inicial de las semillas se determinó los diferentes porcentajes de humedad a deshidratar (tabla 1) en base al protocolo **“HANDLING OF DESICCATION AND TEMPERATURE SENSITIVE TREE SEEDS”** establecido por “Thomsen” (2000). Las semillas fueron colocadas en frascos de vidrio herméticos con gel de sílice como deshidratante.

Las semillas fueron pesadas cada 20 minutos durante el primer día y en los posteriores días la toma de datos se realizó de una a dos veces durante el día hasta que las semillas alcanzaron el peso y porcentaje de deshidratación deseado Tabla 1

Tabla 1. Contenido de humedad inicial y los diferentes niveles deshidratados para las semillas de las especies en estudio.

Especie	% CH inicial	% CH a deshidratar.
<i>Lafoensia acuminata</i>	12,37	12,9,6,3,2.
<i>Senna alata</i>	12,5	12,9,6,3,2.
<i>Coccoloba ruiziana</i>	21,44	20,15,12,9,6,3,2.
<i>Myrtus communis</i>	35	30,25,20,15,10,5,3,2.
<i>Capparis flexuosa</i>	45	40,30,20,10,9,6,5,3,2.

VIABILIDAD DE SEMILLAS.

Para determinar la tolerancia a la desecación, se evaluó la viabilidad de las semillas expresada en tiempo y porcentaje de germinación en cada nivel de deshidratación alcanzado para cada especie.

Para los ensayos de germinación se utilizó dos réplicas de 25 semillas en cada nivel, estas fueron sembradas en cajas petri sobre papel absorbente húmedo y colocadas en germinadores con periodos de 12 horas luz y 12 de oscuridad.

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

En todos los niveles deshidratados para cada una de las especies, se realizó la extracción de proteínas de acuerdo al siguiente protocolo: se trituró 0.5

gramos de semillas en morteros sobre nitrógeno líquido (figura 2. a), una vez trituradas se maceró con el buffer de extracción de proteínas (Tampón Tris–HCl 0,01 M, Mercaptoetanol 0,1%, Ácido ascórbico 0,05 M, Tritón X–100 al 0,1%, Polivinilpolipirrolidona (PVP)) en tubos eppendorf y centrifugadas en frío (4°), a 12000-rpm, por 45 minutos. El sobrenadante obtenido se colocó en tubos eppendorf (figura 2. b), en algunos casos fue necesario centrifugar nuevamente por un minuto para eliminar completamente impurezas. El extracto final fue conservado en frío a -20 °C hasta su posterior utilización.

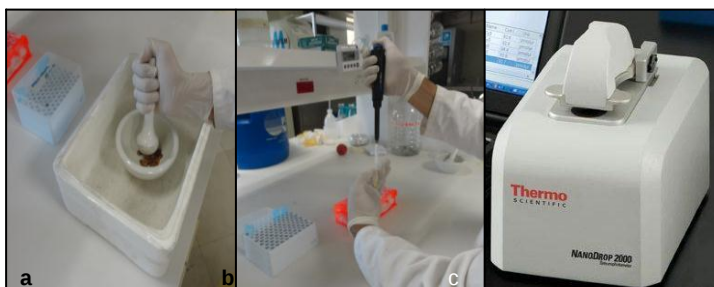


Figura 2: Representación del procedimiento para la obtención de proteínas **a)** trituración de las semillas en morteros sobre nitrógeno líquido. **b)** colocación del sobrenadante en tubos eppendorf. **c)** cuantificación de proteínas en el Nanodrop 2000.

La cuantificación de proteínas totales se la realizó utilizando el método espectrofotométrico de Bradford (1976) donde la curva de calibración se la elaboro utilizando el reactivo de Bradford (Azúl de coomassie G-250, Pierce Chem. USA) y albúmina bovina fracción V (BSA, Sigma) como estándar. La cuantificación se la realizó en el equipo espectrofotómetro Nanodrop 2000 (figura 2. c).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

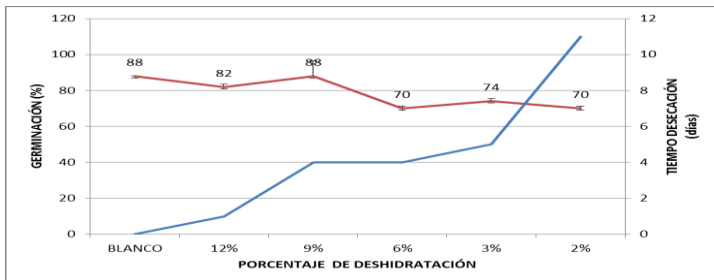
Con los resultados obtenidos en deshidratación, viabilidad y cuantificación de proteínas se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) por el método de **TUKEY**, en el programa estadístico R-PROJECT. 2.15.0. y un Análisis de Regresión Lineal en el programa XLSTAT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. DESHIDRATACIÓN Y VIABILIDAD

Lafoencia acuminata

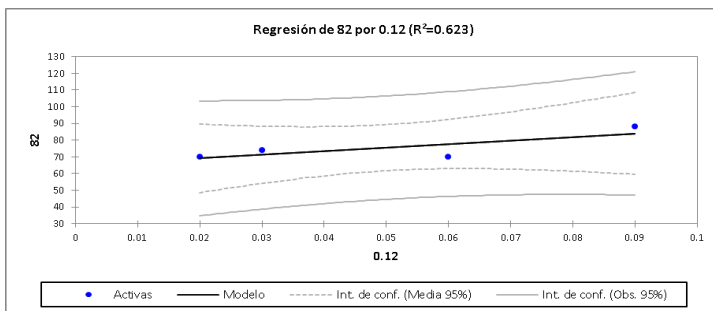
La especie presentó un contenido de humedad inicial relativamente bajo 12.37%, con un porcentaje de germinación inicial del 88% (blanco), y a medida que descendió su contenido de humedad, su germinación también, como nos muestra la gráfica 1.



Gráfica 1: Variación en el porcentaje de germinación acumulada (—) ± ES en cada uno de los niveles deshidratados y los días transcurridos (—) durante la deshidratación.

Durante el proceso de deshidratación que duró 11 días hasta alcanzar el 2% de humedad, el porcentaje de germinación se mantuvo relativamente alto en el 70 %, indicando la capacidad de las semillas para soportar la deshidratación a bajos contenidos de humedad, esta capacidad unido al bajo contenido de humedad inicial de las semillas hace suponer que éstas semillas pueden tener una tendencia ortodoxa pues como menciona Bonner (1996), Magnitskiy & Plaza, (2007) las semillas ortodoxas poseen un contenido de humedad bajo al momento de alcanzar su maduración fisiológica y pueden soportar deshidratación hasta bajos niveles de humedad manteniendo su viabilidad alta. Los altos porcentajes de germinación obtenidos en esta especie puede deberse además, a que las semillas presentan una textura fina, este tipo de cubierta seminal presenta una permeabilidad lo cual facilita el paso del agua al embrión y activa su metabolismo (Carreras, 2001).

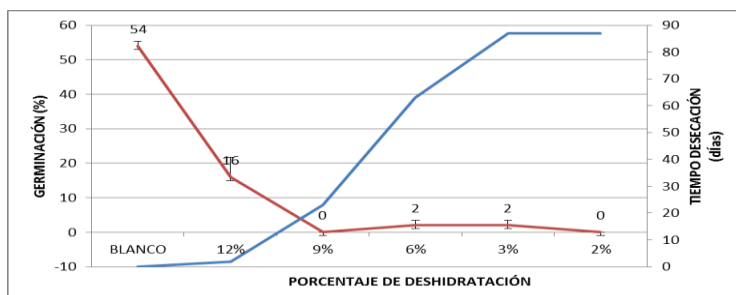
Con respecto al análisis de regresión lineal, este mostró que existe una correlación (R^2 0,623) entre el porcentaje de germinación y el contenido de humedad de las semillas (Gráfica 2), esto además se corroboró realizando una prueba de Tukey, la cual mostró que presentan diferencias significativas los niveles 12%, 2% y el blanco (Anexo 6) con respecto al porcentaje de deshidratación. Confirmando que si existe una correlación entre germinación y deshidratación.



Gráfica 2: Regresión lineal en base al programa estadístico Xlstat

Senna alata

El contenido de humedad inicial de esta especie fue de 12,5%, con un porcentaje de germinación inicial del 54% (blanco), y a medida que su contenido de humedad descendía, su viabilidad se perdía a tal punto que en los niveles 9% y 2% de humedad, su germinación fue nula (gráfica 3).



Gráfica 3: Variación en el porcentaje de germinación acumulada (—)
 ± ES en cada uno de los niveles deshidratados y los días transcurridos
 (—) durante la deshidratación.

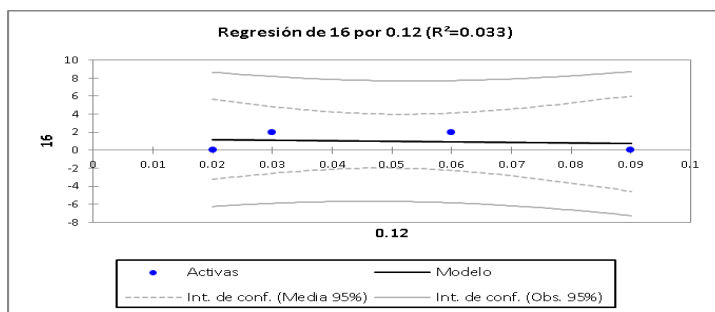
El proceso de deshidratación duró 87 días hasta alcanzar el último contenido de humedad (2%), este largo tiempo de secado en las semillas pudo ser causado por las proteínas denominadas Late Embriogenesis abundant (LEA), las cuales confieren resistencia al secado al momento de ser expuestas a bajas temperaturas en semillas Ortodoxas (Shin et al., 2008).

Durante el proceso de deshidratación el porcentaje de germinación se mantuvo muy bajo en el 16% esto sin tomar en cuenta al blanco (54%). Esta cualidad para soportar ser deshidratadas a bajos contenidos de humedad sin perder su viabilidad, unido al bajo

contenido de humedad inicial de las semillas hace presumir que estas pueden tener una tendencia ortodoxa (Bonner, 1996).

Los bajos porcentajes de germinación adquiridos en esta especie pueden deberse; a que las semillas presentan una testa gruesa, algo que es muy común en la familia de las Caesalpinaceae (Lemes 1998; Bekker, 2003). Debido esta característica las semillas pudieron entrar en un estado de dormancia exógena por impermeabilidad de las cubiertas seminales al agua, retardando así su germinación (Sánchez *et al.* 2003). Por esta razón Lemes (1998) recomienda hacer tratamientos pregerminativos con ácido sulfúrico en *S. alata* para lograr un óptimo porcentaje de germinación.

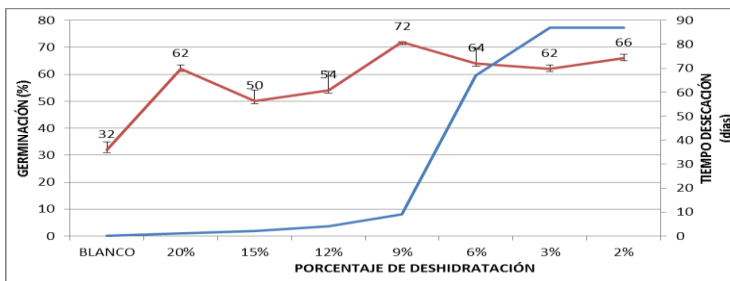
En cuanto a los análisis estadísticos, el de regresión lineal mostró que no existe correlación (R^2 0,033) entre el porcentaje de germinación y el contenido de humedad de las semillas como se muestra en la gráfica 4, y al realizar la prueba de Tukey se determinó que existe una diferencia significativa en los niveles de humedad 12%, 9%, 6%, 3% y el blanco (Anexo 6), con respecto al porcentaje de germinación. Lo que significa que en los tratamientos o niveles de humedad no existe una correlación significativa, es decir que al bajar el contenido de humedad no afecta el porcentaje de germinación.



Gráfica 4: Regresión lineal en base al programa estadístico Xlstat.

Coccoloba ruiziana

Su contenido de humedad inicial fue de 21.44%, alcanzando a este nivel un máximo de 32 % de germinación y a medida que descendía su contenido de humedad, su germinación aumentaba, como podemos observar en la gráfica 5.

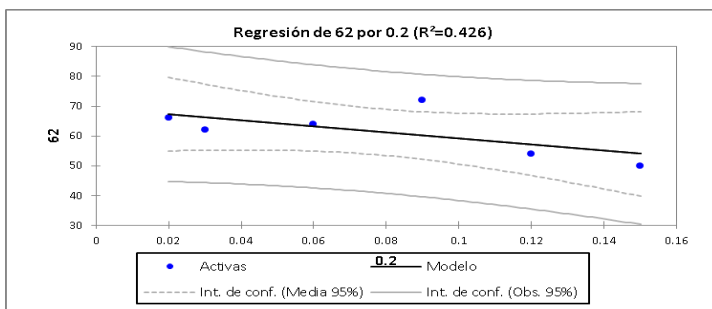


Gráfica 5: Variación en el porcentaje de germinación acumulada (—)
 ± ES en cada uno de los niveles deshidratados y los días transcurridos
 (—) durante la deshidratación.

Durante el proceso de deshidratación que duró 87 días hasta alcanzar el 2% de humedad, el porcentaje de germinación se mantuvo sobre el 50%, mostrando la capacidad de las semillas para soportar la deshidratación a bajos niveles de humedad, esta capacidad unido al contenido de humedad inicial (característico en especies intermedias) corrobora lo expuesto por Hong *et al.* (1996) que menciona, que la mayoría de especies del género *Coccoloba* podría formar parte del grupo de las semillas intermedias.

El aumento del porcentaje de germinación en los contenidos de humedad inferiores, pueden deberse a la falta de maduración fisiológica de las semillas en el árbol, ya que en la mayoría de especies de estas características, su fase final de maduración esta acompañada por deshidratación celular, lo cual las hace tolerantes a la deshidratación, característica que mejora su viabilidad y el potencial de almacenamiento (Nkang, 2002; Hoekstra *et al.*, 1994). Por esta razón el blanco el cual no fue deshidratado pudo tener tan bajo porcentaje de germinación.

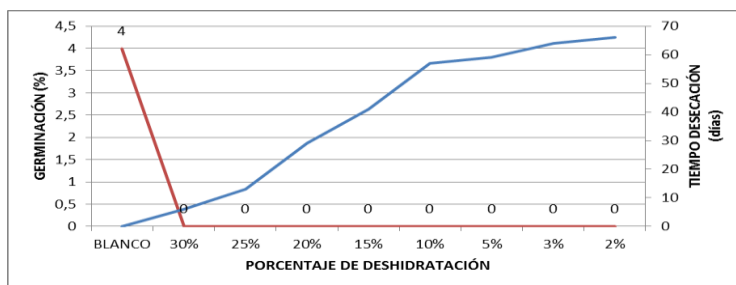
Respecto al análisis estadístico, esta especie mostró a través del análisis de regresión lineal una correlación negativa moderada (R^2 0,426) entre el porcentaje de germinación y el contenido de humedad de las semillas (gráfica 6), se pudo verificar esto mediante la prueba de Tukey, donde los niveles de humedad que presentaron mayor diferencia significativa con respecto al porcentaje de germinación fueron el 20% y el 3% (Anexo 6). Confirmando que a medida que el contenido de humedad descende, el porcentaje de germinación aumenta.



Gráfica 6: Regresión lineal en base al programa estadístico Xlstat.

Myrtus communis

La especie presentó un contenido de humedad inicial relativamente alto 35%, con un porcentaje de germinación inicial del 4% (blanco), y a medida que su contenido de humedad descendía su germinación se hizo nula (gráfica 7).



Gráfica 7: Variación en el porcentaje de germinación acumulada (—)
± ES en cada uno de los niveles deshidratados y los días transcurridos
(—) durante la deshidratación.

El proceso de deshidratación duró 66 días hasta llegar al 2% de humedad, durante este proceso el porcentaje de germinación fue nulo, por lo que se realizó un corte a las semillas para evaluar su estado y se determinó que el 90% de sus embriones no mantenían su estructura normal por lo que posiblemente ya no eran viables. Indicando la incapacidad de las semillas para tolerar la deshidratación a bajos contenidos de humedad, esta incapacidad unido al alto contenido de humedad inicial de las semillas nos hace suponer que éstas pueden tener una tendencia recalcitrante pues como menciona Sánchez *et al.*, (2005) las semillas recalcitrantes poseen un alto contenido de humedad inicial y al ser deshidratadas pierden casi toda su viabilidad. La mayoría de semillas con estos altos contenidos de humedad (30%-60%) no resisten la deshidratación (Floriano 2004), puesto que un secado excesivo puede ocasionar daños

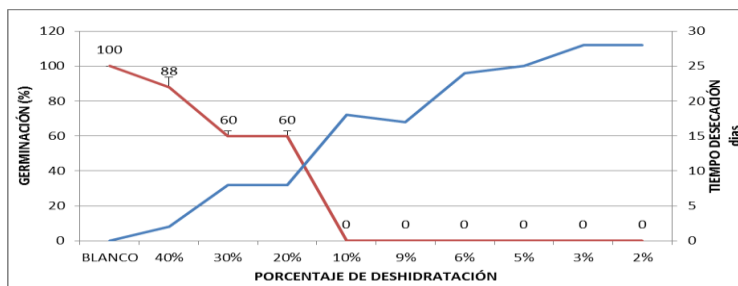
en su membrana (envejecimiento de la misma), ya que estas están acostumbradas a climas con altos contenidos de humedad (Leopold 1995).

Los nulos porcentajes de germinación obtenidos en *M. communis* pueden deberse además; a que su cubierta era de tipo impermeable y al estar expuestas a la deshidratación, su embrión no pudo recibir la humedad necesaria para germinar (Carreras, 2001). Otro factor determinante en su baja germinabilidad pudo ser el estado de madurez de las semillas que con frecuencia es extremadamente difícil de determinar para los tipos recalcitrantes (Berjak & Pammenter, 1997).

Para esta especie no se pudo realizar los respectivos análisis estadísticos de regresión lineal y de varianza (ANOVA), debido a que no existió germinación en ninguno de los niveles deshidratados, obteniendo solamente datos en el blanco.

Caparis flexuosa

Su contenido de humedad inicial fue relativamente alto 45%, con un porcentaje de germinación inicial de 100% (blanco), y a medida que descendía su contenido de humedad, su germinación también lo hacía, a tal punto que del 10% de humedad en adelante su germinación fue nula (gráfica 8).

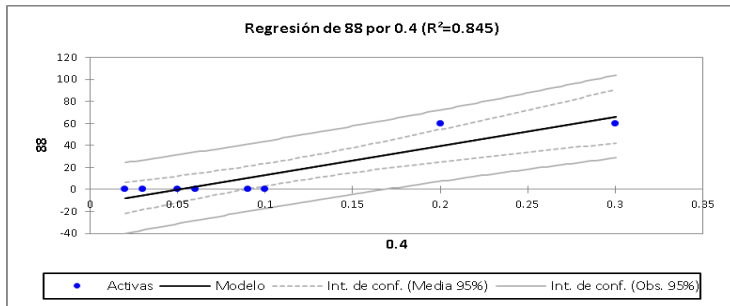


Gráfica 8: Variación en el porcentaje de germinación acumulada (—)
 ± ES en cada uno de los niveles deshidratados y los días transcurridos
 (—) durante la deshidratación.

Durante los 28 días que duro el proceso de deshidratación la viabilidad se mantuvo sobre el 60% en los tres primeros niveles de humedad, mientras que en los demás niveles la germinación fue nula, debido a que fue perdiendo rápidamente su capacidad de germinación al quedar expuesta a condiciones de baja humedad (Kermode & Finch-Savage, 2002) y a su alto contenido de humedad inicial podemos suponer que *C. flexuosa* tiene tendencia a ser recalcitrante. Además las semillas recalcitrantes rodeadas por pericarpio y testa delgadas, como es el caso de *C. flexuosa*, se desecan en un tiempo relativamente corto y genera la muerte de sus semillas cuando son colocadas en condiciones de baja humedad (Pukacka & Ratajczak, 2005).

En esta especie se presento un alto grado de contaminación en sus semillas lo cual también pudo afectar a la muerte de las mismas.

El análisis estadístico de regresión lineal mostró que existe una correlación elevada (R^2 0,845) entre el porcentaje de germinación y el contenido de humedad de las semillas (gráfica 9), y al realizar la prueba de Tukey para confirmar esto, nos mostró que los niveles de humedad 40%, 20% y el blanco (Anexo 6) fueron los que presentaron diferencias significativas en relación al porcentaje de germinación.



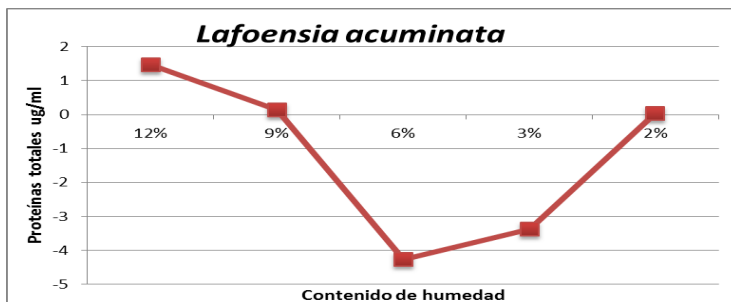
Gráfica 9: Regresión lineal en base al programa estadístico Xlstat.

2. PROTEÍNAS TOTALES

Lafoensia acuminata

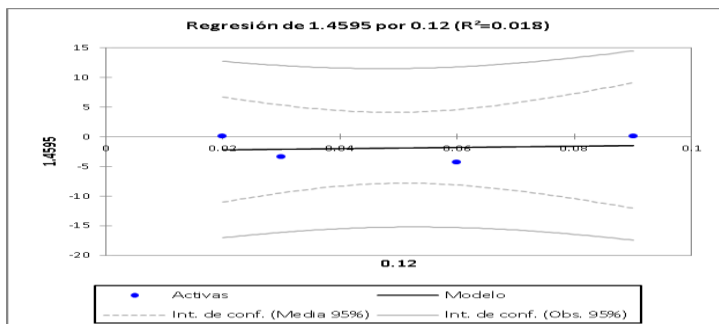
Todos sus niveles de humedad presentaron bajas concentraciones de proteínas, obteniendo una mayor concentración cuando las semillas tuvieron un 12% de humedad y como podemos observar en la gráfica 10, el contenido de humedad con menor concentración de proteínas fue 6%. Estas bajas concentraciones pueden deberse a la baja presencia de ácido abscísico (ABA) que es el que influye en la síntesis de varias clases de proteínas (Bewley & Black, 1994). Otro factor a tomar en cuenta es la testa delgada que posee *L. acuminata*, esta es una característica de las semillas que presentan bajas concentraciones de ABA (bewley & black, 1994), debido a este factor pudo existir una pérdida neta de las proteínas en las semillas causada por el envejecimiento de las mismas, los cambios que se dan a consecuencia de dicho envejecimiento podrían ser la base de todos los demás aspectos relacionados con la pérdida de las proteínas (chaitanya & naithani 1998).

O bien puede deberse a características intrínsecas de la planta y a las condiciones ambientales que hicieron que esta produzca semillas con bajos niveles de proteínas (Rengel, 2009).



Gráfica 10: Fluctuación en la cantidad de proteínas totales en diferentes porcentajes de contenido de humedad en *L. acuminata*.

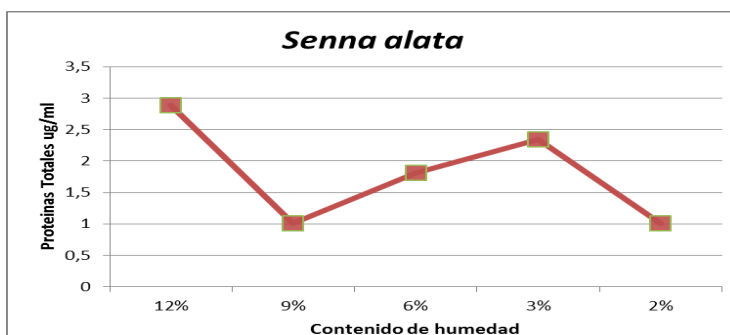
El análisis estadístico de regresión lineal mostró que no existe una correlación (R^2 0,018) entre el contenido de humedad de las semillas y cantidad de proteínas presentes en las mismas (gráfica 11). Es decir que la cantidad de proteínas presentes en las semillas no se ven afectadas por los diferentes niveles de deshidratación.



Gráfica 11: Regresión lineal en base al programa estadístico Xlstat.

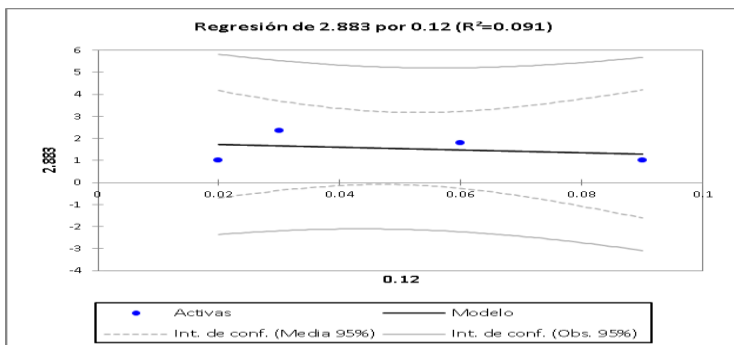
Senna alata

Para esta especie ya hubo un aumento en el contenido proteico, el 12% fue el que mayor proteínas mostró, mientras que el 9% y el 2% fueron los que menos proteínas presentaron (gráfica 12). Estos resultados al igual que en *L. acuminata* pudieron estar relacionados con características intrínsecas de la planta que afectaron su fisiología y mecanismos bioquímicos alterando la cantidad de proteínas en las semillas (Rengel, 2009). También se pudo deber a los bajos niveles de ABA, los cuales alcanzan su máximo nivel durante las etapas más tardías del desarrollo de la semilla y están directamente relacionados con la síntesis de proteínas (Kermode, 1990).



Gráfica 12: Fluctuación en la cantidad de proteínas totales en diferentes porcentajes de contenido de humedad en *S. alata*.

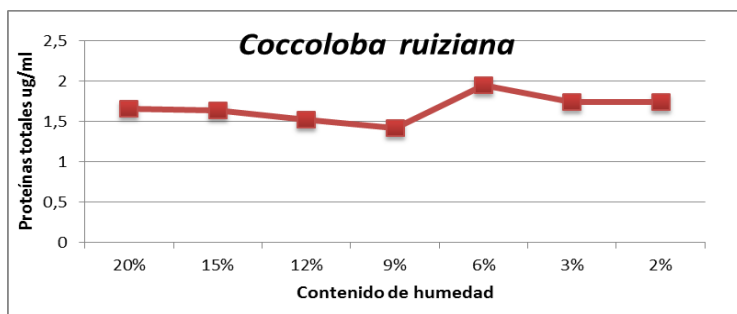
El análisis estadístico de regresión lineal mostró que la correlación es casi nula (R^2 0,091) entre el contenido de humedad y la cantidad de proteínas presentes en las semillas (gráfica 13). Es decir que la cantidad de proteínas presentes en las semillas no se ven afectadas por los diferentes niveles de deshidratación.



Gráfica 13: Regresión lineal en base al programa estadístico Xlstat.

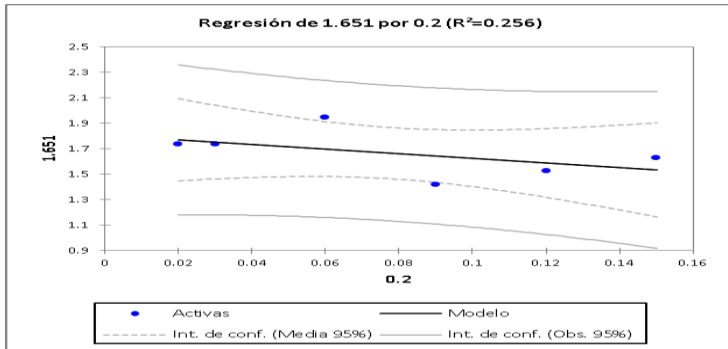
Coccoloba ruiziana

Esta especie fue la que mostró mayor equilibrio en el número de proteínas totales presentes en cada nivel, pero aun así la concentración de proteínas fue baja. Siendo el 6% el que presentara más proteínas y el 9% el que menos mostrara (gráfica 14). Estas bajas concentraciones pueden deberse a los mismos factores que influyeron en las dos anteriores especies (*L. acuminata* & *S. alata*), los cuales podrían estar relacionados con características intrínsecas de la planta que altera sus características fisiológicas (Magnitskiy *et al* 2007), y a los bajos niveles de ABA los cuales están directamente relacionados con la síntesis de proteínas (Bewley & Black, 1994).



Gráfica 14: Fluctuación en la cantidad de proteínas totales en diferentes porcentajes de contenido de humedad en *C. ruiziana*.

El análisis estadístico de regresión lineal mostró que la correlación que existe entre las variables de contenido de humedad y la cantidad de proteínas presentes en las semillas (gráfica 15), es negativa moderada (R^2 0,256) significando que la cantidad de proteínas presentes en las semillas se ven afectadas en un mínimo porcentaje por los niveles de deshidratación.

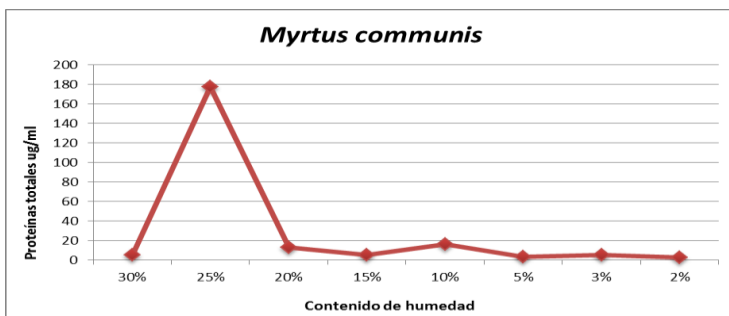


Gráfica 15: Regresión lineal en base al programa estadístico Xlstat.

Myrtus communis

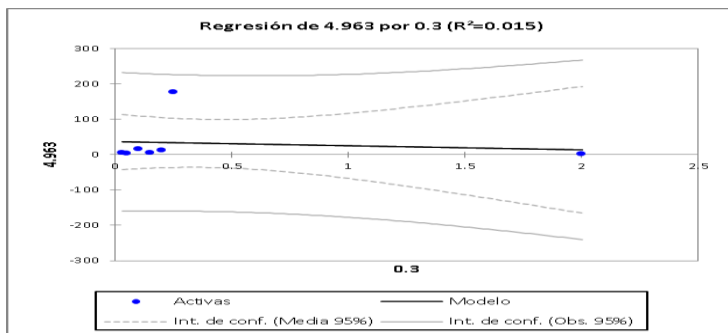
Myrtus communis presentó el mayor porcentaje de proteínas totales de las cinco especies en estudio, siendo el 25% el que más número de proteínas totales presentó, y el 2% el que menos proteínas mostró en el proceso de cuantificación (gráfica 16). Esta gran cantidad de proteínas podría estar asociada a la presencia de las proteínas deshidrinas (Galau et al., 1986), las cuales incluyen una serie de proteínas hidrofílicas resistentes al calor asociadas con la adquisición de tolerancia a la deshidratación (Ried & Walker-Simmons, 1993). Su síntesis parece estar asociada con niveles altos de ABA que alcanzan su máximo nivel durante las etapas más tardías del desarrollo de la semilla (Kermode, 1990).

La presencia de bajas concentraciones de proteínas en el 2% y 5% de humedad, pueden deberse a la existencia de diversos mecanismos asociados con la tolerancia a la desecación de semillas por lo tanto acumulación de moléculas de protección (LEA), sacarosa y oligosacáridos (Leprince et al. 1995).



Gráfica 16: Fluctuación en la cantidad de proteínas totales en diferentes porcentajes de contenido de humedad en *M. communis*.

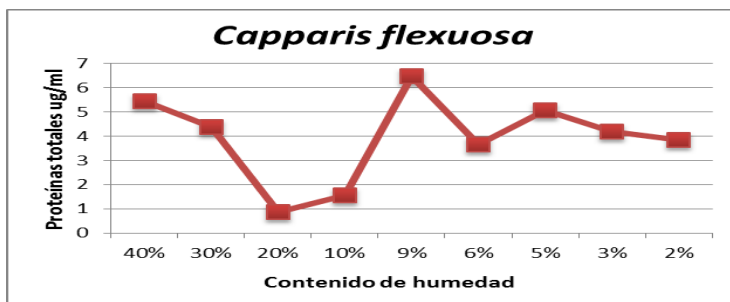
El análisis estadístico de regresión lineal mostró que no existe una correlación (R^2 0,015) entre el contenido de humedad de las semillas y cantidad de proteínas presentes en las mismas (gráfica 17). Es decir que la cantidad de proteínas presentes en las semillas no se ven afectadas por los diferentes niveles de deshidratación.



Gráfica 17: Regresión lineal en base al programa estadístico Xlstat.

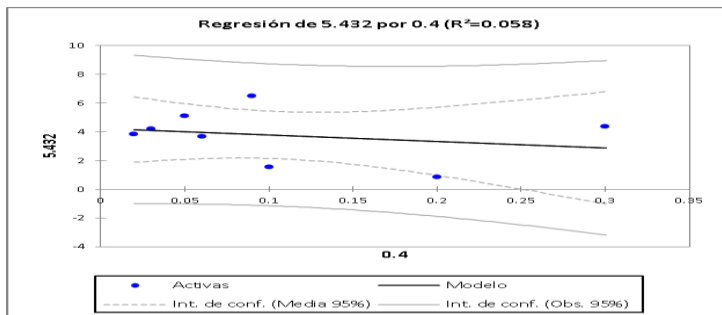
Capparis flexuosa

Sus niveles mostraron una concentración más elevada de proteínas a diferencia de las otras especies, sobre todo en el 40, 9 y 5%. Mientras que el 20 y 10% fueron los que mostraron menor concentración (gráfica 18). Estos porcentajes pudieron estar dados por la ausencia o la expresión inefectiva de moléculas de protección (LEA), sacarosa y oligosacáridos, los cuales pueden determinar la sensibilidad a la desecación (Farrant *et al.* 1993). El aumento proteico en semillas puede deberse a distintas características como acumulación de sacarosa y oligosacáridos, reducción de la superficie de las membranas, presencia y eficiencia en los sistemas antioxidantes y principalmente la participación de mecanismos de reparación durante la rehidratación características intrínsecas de la planta que están sujetas a condiciones de presencia o ausencia de proteínas (Leprince *et al.* 1995).



Gráfica 18: Fluctuación en la cantidad de proteínas totales en diferentes porcentajes de contenido de humedad en *C. flexuosa*.

El análisis estadístico de regresión lineal mostró que no existe correlación (R^2 0,058) entre las variables de contenido de humedad y la cantidad de proteínas encontradas en las semillas de esta especie (gráfica 19). Es decir que la cantidad de proteínas presentes en las semillas no se ven afectadas por los diferentes niveles de deshidratación.



Gráfica 19: Regresión lineal en base al programa estadístico Xlstat.

CONCLUSIONES

- En base a sus porcentajes de germinación, tolerancia a la deshidratación y a sus contenidos de humedad inicial de las semillas se podría concluir que *Lafoencia acuminata* y *Senna alata* son especies que presentan una tendencia de comportamiento ortodoxo; y en base a estos mismos parámetros *Coccoloba ruiziana* presenta una tendencia de comportamiento de conservación intermedio.
- En el caso de *Myrtus communis* y *Capparis flexuosa*, presentaron un alto contenido de humedad inicial, una poca tolerancia a la deshidratación y porcentajes de germinación nula en sus últimos niveles (10,9,6,5,3,2%), por todo se podría concluiría que las semillas de las dos especies presentar una tendencia de comportamiento recalcitrante.
- Mediante el análisis estadístico regresión lineal en el programa Xlstat y en la prueba de Tukey, podemos concluir que existe una correlación entre la germinación de semillas y su deshidratación, es decir que las semillas pierden su viabilidad mientras su contenido de humedad desciende, a excepción de *Coccoloba ruiziana*, que su viabilidad aumentó cuando su contenido de humedad descendía. Y en el caso de las proteínas y el contenido de humedad no existe una correlación es decir que la cantidad de proteínas no se ve afectada por la deshidratación.
- En lo que se refiere a cuantificación de proteínas todas las especies excepto *Myrtus communis*, presentan una concentración similar de proteínas que a lo largo de todo el proceso de deshidratación no varía demasiado. Por lo que se podría concluir que la deshidratación no influye directamente en las concentraciones de proteínas encontradas en las semillas.

RECOMENDACIONES

- Realizar los procesos de extracción de proteínas y contenidos de humedad, 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.
- Se recomienda también hacer estudios con especies que posean contenidos de humedad inicial más altos que los estudiados aquí, para así obtener mayor información útil para la conservación de especies.
- Se debe realizar estudios posteriores de conservación de las semillas en diferentes contenidos de humedad y con diferentes tiempos de conservación para confirmar verdaderamente su comportamiento de conservación de las semillas.

BIBLIOGRAFIA:

- Bonilla M., Osorio L. & Ferrandis P. 2010. Características de la Germinación y del Banco de Semillas del Suelo de *Podocarpus angustifolius* griseb. La Habana, Cuba. Simposio Internacional, 2-6.
- Bonner F. 1996. Responses to Drying of Recalcitrant Seeds of *Quercus nigra* L. *USDA Forest Service, Southern Forest Experiment Station, Starkville, Mississippi, 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.
- Cardoso, M.L., Alonso, S.I., Clausen, A.M. & Castaño J. 2007. Dormición y Germinación de Semillas de Agropiro Alargado Recientemente Cosechado. *Revista Argentina de producción animal* 27 (3): 159-167.
- Carreras M., Pascualides A. & Planchuelo A. 2001. Comportamiento germinativo de las semillas de *Crotalaria incana* L. (Leguminosae) en relación a la permeabilidad de la cubierta seminal. *Córdoba, Argentina. AGRISCIENTIA, VOL. XVIII: 45-50*.
- Drzewiecki J., Delgado-Licon E. 2003. Identification and Differences of Total Proteins and Their Soluble Fractions in Some Pseudocereals Based on Electrophoretic Patterns. *J. Agric. Food Chem.* 1-2.
- 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.
- González J., García E., Vargas J., Trinidad A., Romero A. & Cetina V. 2006. Evaluación de la Producción y Análisis de Conos y Semillas de

Pinus Cembroides Zucc. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 12(2): 133-138.

- Ihaka R. & Gentleman R. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5: 299–314.
- Jiménez J. C., Alche j. & Rodríguez-García M. Alpeorujó. 2005. Semillas de Olivo Representan el Mismo Tipo de Proteínas de Almacenamiento. Est. Exp. Del Zaidin. Granada, España.
- Kermode, A.R. & W.E. Finch-Savage 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.
- Krishna Chaitanya, K.S., Keshavkant, S. & Naithani, S.C. 2000. Changes in total protein and protease activity in dehydrating recalcitrant sal (*Shorea robusta*) seeds. *Silva Fennica* 34(1): 71–77.
- Lemes M. 1998. Estudio de Propagación en *Senna alata* (L.) Roxb. (guacamaya francesa). Ciudad de La Habana, Cuba. *Rev Cubana Plant Med*;3(2):64-68.
- Leprince O., Vertucci C., Hendry G. & Atherton N. 1995. The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature. *Physiol. Plant.* 94: 233-240.
- Magnitskiy S. & Plaza G. 2007. Fisiología de Semillas Recalcitrantes de Árboles Tropicales. Bogotá, Colombia. *Agronomía Colombiana* 25(1), 96-103.
- Moreno, F., G. Plaza & S. Magnitskiy. 2006. Efecto de la testa sobre la germinación en semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.). *Agron. Colomb.* 25 (1), 290-295.

- Pukacka, S. & E. Ratajczak. 2005. Antioxidative response of ascorbateglutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acer saccharinum* seeds. *J. Plant Physiol.* (En prensa).
- Rangel M. 2009. Anatomía y tolerancia a la desecación de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L), Montecillo, Texcoco, Edo de México.
- Rosenberg L. & Rinne R. 1990. Protein Synthesis During Natural and Precocious Soybean Seed (*Glycine max* [L.] Merr.) Maturation. Agricultural Research Service (R.W.R.), University of Illinois, Urbana, Illinois 61801. *Plant Physiol.* 87, 474-478.
- Ruiz M., Pérez M., Argüello J. & Babinec, F. 2003. Madurez Fisiológica de la Semilla de *Bromus auleticus* trin. (cebadilla chaqueña). La Pampa. Argentina. *RIA*, 32 (2): 3-20.
- Sánchez C., Perán R., Márquez B., Barceló A. & Pliego F. 2003. Efecto de la Desecación Parcial Sobre la Germinación de Embriones Zigóticos Inmaduros de Aguacate. *Málaga, España. Actas V Congreso Mundial del Aguacate 2003. pp. 83-87.*
- Sánchez J., Muñoz B., Reino J. & Montejo L. 2003. Efectos Combinados de Escarificación y de Hidratación Parcial en la Germinación de Semillas Envejecidas de Leguminosas. *Pastos y Forrajes Vol. 26, No.1: 27-30.*
- Shih Ming-Der, Hoekstra Folkert & Hsing Yue-ie, 2008. Late Embryogenesis Abundant Proteins ; Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica, Taipei 11529, Taiwan.
- Vargas G. & Pire R. 2010. Efecto de dos condiciones de almacenamiento en la germinación de semillas de uva de playa (*Coccoloba uvifera* (L.) Jacq.). Villahermosa, Tabasco, México. *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 27: 559-573.

- Vásquez T, Corvera R , Nimer G, (2007). Viabilidad de semillas de Shiringa (*Hevea brasiliensis*) sometidas a diferentes tratamientos de almacenamiento. Iquitos, Perú. Biodamaz, 3-5.

ENLACES WEB

- Berjak P. & Pammenter N. Semillas Ortodoxas y Recalcitrantes. Durban 4041 Sudáfrica. Consultado; el 16 de Abril del 2012. Disponible en: www.rngr.net.
- Fernández E. & Galván A "Métodos Para la Cuantificación de Proteínas". Córdoba, Argentina. Consultado; el 12 de Diciembre del 2011. Disponible en; <http://www.uco.es/>.

ANEXOS

Anexo 1

Procedimiento de Germinación de Semillas

- ❖ Enjuague las semillas con agua destilada por varios segundos.
- ❖ Inmersión alcohol al 70% por 2 minuto.
- ❖ Enjuague con agua destilada (repita este paso 3 veces).
- ❖ Llevar las cajas Petri, y las pinzas a la cabina de flujo laminar y dejar esterilizar por 15 minutos.
- ❖ Sembrar en cajas Petri utilizando como sustrato papel absorbente. Expuestas a 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Anexo 2

Tablas de los Resultados de Germinación (%)

Lafoencia acuminata

Contenido de humedad: 12%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	32,00	5,66	2,83	32,00	5,66	2,83
3	16,00	11,31	5,66	48,00	16,97	8,49
4	10,00	2,83	1,41	58,00	14,14	7,07
7	16,00	0,00	0,00	74,00	14,14	7,07
10	6,00	8,49	4,24	80,00	5,66	2,83
14	2,00	2,83	1,41	82,00	2,83	1,41

Contenido de humedad: 9%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
7	24,00	28,28	14,14	24,00	28,28	14,14
10	44,00	16,97	8,49	68,00	45,25	22,63
14	10,00	14,14	7,07	78,00	31,11	15,56
20	10,00	14,14	7,07	88,00	16,97	8,49

Contenido de humedad: 6%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
7	16,00	11,31	5,66	16,00	11,31	5,66
10	36,00	5,66	2,83	52,00	5,66	2,83
14	14,00	2,83	1,41	66,00	8,49	4,24
22	4,00	5,66	2,83	70,00	2,83	1,41

Contenido de humedad: 3%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
9	32,00	5,66	2,83	32,00	5,66	2,83
13	28,00	0,00	0,00	60,00	5,66	2,83
21	14,00	8,49	4,24	74,00	2,83	1,41

Contenido de humedad: 2%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
10	30,00	2,83	1,41	30,00	2,83	1,41
14	14,00	2,83	1,41	44,00	5,66	2,83
18	26,00	2,83	1,41	70,00	2,83	1,41

Senna alata

Contenido de humedad: 12%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
39	2,00	2,83	1,41	2,00	2,83	1,41
53	2,00	2,83	1,41	4,00	5,66	2,83
62	2,00	2,83	1,41	6,00	8,49	4,24
81	4,00	0,00	0,00	10,00	8,49	4,24
105	2,00	2,83	1,41	12,00	5,66	2,83
109	2,00	2,83	1,41	14,00	8,49	4,24
131	2,00	2,83	1,41	16,00	11,31	5,66

Contenido de humedad: 9%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Contenido de humedad: 6%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
7	2,00	2,83	1,41	2,00	2,83	1,41

Contenido de humedad: 3%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
18	2,00	2,83	1,41	2,00	2,83	1,41

Contenido de humedad: 2%

DÍA	GD%	sd	se	GA%		se
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Coccoloba ruiziana

Contenido de humedad: 20%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
7	4,00	5,66	2,83	4,00	5,66	2,83
8	6,00	2,83	1,41	10,00	2,83	1,41
9	6,00	8,49	4,24	16,00	11,31	5,66
10	2,00	2,83	1,41	18,00	8,49	4,24
16	26,00	8,49	4,24	44,00	0,00	0,00
24	4,00	0,00	0,00	48,00	0,00	0,00
27	4,00	0,00	0,00	52,00	0,00	0,00
31	2,00	2,83	1,41	54,00	2,83	1,41
34	2,00	2,83	1,41	56,00	0,00	0,00
41	6,00	2,83	1,41	62,00	2,83	1,41

Contenido de humedad: 15%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
5	6,00	2,83	1,41	6,00	2,83	1,41
6	14,00	2,83	1,41	20,00	0,00	0,00
7	8,00	0,00	0,00	28,00	0,00	0,00
8	4,00	5,66	2,83	32,00	5,66	2,83
9	2,00	2,83	1,41	34,00	2,83	1,41
15	10,00	2,83	1,41	44,00	5,66	2,83
19	2,00	2,83	1,41	46,00	8,49	4,24
23	2,00	2,83	1,41	48,00	11,31	5,66
26	2,00	2,83	1,41	50,00	8,49	4,24

Contenido de humedad: 12%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
3	4,00	0,00	0,00	4,00	0,00	0,00
4	4,00	0,00	0,00	8,00	0,00	0,00
5	10,00	8,49	4,24	18,00	8,49	4,24
6	2,00	2,83	1,41	20,00	5,66	2,83
7	8,00	0,00	0,00	28,00	5,66	2,83
13	10,00	2,83	1,41	38,00	8,49	4,24
17	6,00	2,83	1,41	44,00	5,66	2,83
19	6,00	2,83	1,41	50,00	8,49	4,24
28	2,00	2,83	1,41	52,00	11,31	5,66
38	2,00	2,83	1,41	54,00	14,14	7,07

Contenido de humedad: 9%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
8	30,00	14,14	7,07	30,00	14,14	7,07
12	10,00	14,14	7,07	40,00	0,00	0,00
14	6,00	2,83	1,41	46,00	2,83	1,41
16	6,00	2,83	1,41	52,00	0,00	0,00
19	6,00	2,83	1,41	58,00	2,83	1,41
23	2,00	2,83	1,41	60,00	5,66	2,83
26	2,00	2,83	1,41	62,00	8,49	4,24
33	6,00	2,83	1,41	68,00	5,66	2,83
40	2,00	2,83	1,41	70,00	2,83	1,41
54	2,00	2,83	1,41	72,00	0,00	0,00

Contenido de humedad: 6%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
17	10,00	8,49	4,24	10,00	8,49	4,24
20	26,00	8,49	4,24	36,00	0,00	0,00
24	12,00	5,66	2,83	48,00	5,66	2,83
26	4,00	0,00	0,00	52,00	5,66	2,83
31	4,00	0,00	0,00	56,00	5,66	2,83
34	2,00	2,83	1,41	58,00	2,83	1,41
39	4,00	5,66	2,83	62,00	8,49	4,24
46	2,00	2,83	1,41	64,00	11,31	5,66

Contenido de humedad: 3%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
11	30,00	8,49	4,24	30,00	8,49	4,24
14	10,00	2,83	1,41	40,00	5,66	2,83
19	6,00	2,83	1,41	46,00	2,83	1,41
26	4,00	5,66	2,83	50,00	2,83	1,41
39	12,00	0,00	0,00	62,00	2,83	1,41

Contenido de humedad: 2%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
11	44,00	0,00	0,00	44,00	0,00	0,00
14	8,00	5,66	2,83	52,00	5,66	2,83
19	4,00	5,66	2,83	56,00	0,00	0,00
26	8,00	0,00	0,00	64,00	0,00	0,00
32	2,00	2,83	1,41	66,00	2,83	1,41

Caparis flexuosa

Contenido de humedad: 40%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
4	38,00	8,49	4,24	38,00	8,49	10,49
6	42,00	2,83	1,41	80,00	5,66	7,66
11	8,00	5,66	2,83	88,00	11,31	5,66

Contenido de humedad: 30%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
6	22,00	2,83	1,41	22,00	2,83	1,41
10	24,00	0,00	0,00	46,00	2,83	1,41
15	14,00	2,83	1,41	60,00	5,66	2,83

Contenido de humedad: 20%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
6	14,00	2,83	1,41	14,00	2,83	1,41
10	30,00	14,14	7,07	44,00	11,31	5,66
15	12,00	0,00	0,00	56,00	11,31	5,66
20	4,00	5,66	2,83	60,00	5,66	2,83

Contenido de humedad: 10%

DÍA	GD%	sd	se	GA%	sd	se
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Anexo 3

Protocolo para 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.

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%	100ul
Tritón X-100 al 0,1%	100ul
Agua destilada	Aforar hasta 100ml

Anexo 4

Protocolo para Cuantificación de Proteínas Bradford

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*.

Soluciones para cuantificación de proteínas

Preparación de la solución madre

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

Preparación de la curva de calibración

Preparar una solución madre de ABS a una concentración de 4mg/ml; diluyendo 4mg de ABS en 10 ml de 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 elaborar las soluciones seriadas se disponen 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.

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 en oscuridad.

Cuantificación en el Nanodrop

El procedimiento usado para la cuantificación de proteínas totales en el Nanodrop fue el siguiente:

- Para realizar la cuantificación, poner las muestras de calibración en cubetas, las cuales se las colocaron una por una en el nanodrop. Una vez prendida la computadora ingresar en el programa, escoger la opción Proteínas de Bradford. Luego seleccionar la opción de cubeta de la medida y después la ventana de curva estándar.

En la ventana de curva estándar (a la derecha de la pantalla) ingresar los valores de las diferentes diluciones (las colocamos de menor a mayor ejm: 0,054/0,125/0,25 así hasta llegar al 4). Recuerde que debe estar seleccionada la opción add to report para grabar los datos.

Antes de correr las muestras colocar una muestra como blanco que puede ser agua (aproximadamente unos 200 ul) y presionar la tecla Blank Finalmente correr en las cubetas cada una de las muestras en nuestro caso de cada uno de los niveles de deshidratación.

Anexo 6

Análisis Estadístico, resultados y gráficas de Tukey en el programa R.

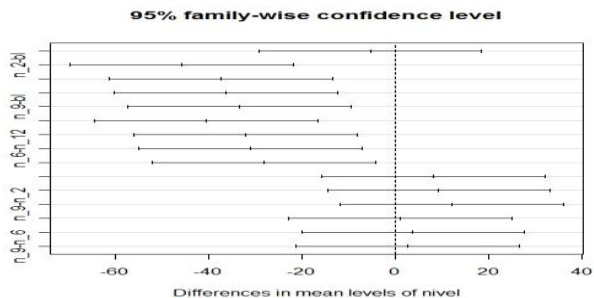
Lafoencia acuminata

```
aov.lafo=aov(germinacion~nivel,lafo)
summary(aov.lafo)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
nivel	5	39065	7813.0	10.388	2.326e-08 ***
Residuals	126	94768	752.1		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level



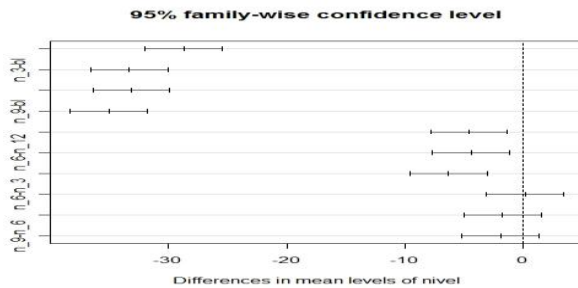
Senna alata

```
aov.senna=aov(germinacion~nivel,senna)
summary(aov.senna)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
nivel	4	113860	28464.9	305.82	< 2.2e-16 ***
Residuals	650	60499	93.1		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level



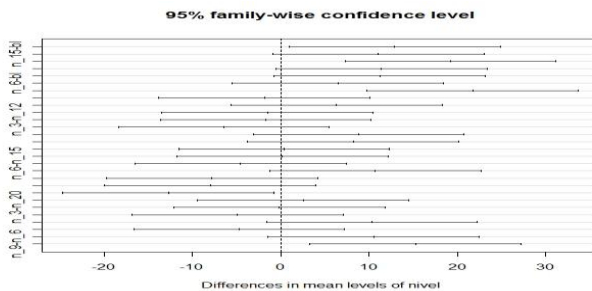
Coccoloba uvifera

```
aov.coco=aov(germinacion-nivel,coco)
summary(aov.coco)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
nivel	7	17483	2497.54	5.9996	1.113e-06 ***
Residuals	424	176505	416.29		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level



Capparis flexuosa

```
aov.cappa=aov(germinacion~nivel,cappa)
summary(aov.cappa)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
nivel	4	88672	22168.1	31.142	< 2.2e-16 ***
Residuals	95	67624	711.8		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

