

00345



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DEL DETERIORO EN LOS NIVELES DE
BIOMOLECULAS QUE PARTICIPAN EN LA PROTECCION DEL
ESTADO SECO DE LA SEMILLA DE
Phaseolus vulgaris**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA VEGETAL)
P R E S E N T A

Biol. MARIA DEL SOCORRO DOLORES GONZALEZ DE LA CONCHA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. IRMA OFELIA BERNAL LUGO

MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



CIUDAD UNIVERSITARIA

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

DRA. IRMA OFELIA BERNAL LUGO.
P r e s e n t e

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
de Posgrado
A.D.T. y A.S.P./ R.T.

of. núm. P- 113

Por este conducto, me permito comunicarle que ha sido ratificado como Director (a) de Tesis del (a) BIOLOGA MARIA DEL SOCORRO DOLORES GONZALEZ DE LA CONCHA, quien desarrollará el trabajo titulado "Efecto del deterioro en los niveles de biomoléculas que participan en la protección del estado seco de la semilla de Phaseolus vulgaris

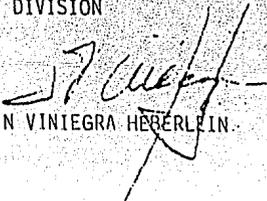
para obtener el grado de Maestría en Ciencias (BIOLOGIA VEGETAL)

Así mismo le comunico, que la Dirección de la Facultad, ha designado a los siguientes miembros como Jurado para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el (a) alumno (a) arriba mencionado (a) tiene los méritos para obtener el grado correspondiente:

PRESIDENTE : DRA. JUDITH GUADALUPE MARQUEZ GUZMAN
PRIMER VOCAL : DRA. ALMA DELFINA LUCIA OROZCO SEGOVIA
SEGUNDO VOCAL : DRA. IRMA OFELIA BERNAL LUGO
TERCER VOCAL : DR. ERNESTO MORENO MARTINEZ
SECRETARIO : DR. DAVID DIAZ PONTONES
SUPLENTE : DRA. CLARA ESQUIVEL HUESCA
SUPLENTE : DR. JORGE RAMIREZ GONZALEZ

En espera de su respuesta, quedo de ustedes,

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL-ESPIRITU"
México, D.F., febrero 11 de 1994.
JEFE DE LA DIVISION


DR. FERMIN VINIEGRA HEBERLEIN

AGRADECIMIENTOS

A mi padre siempre presente, con su inagotable optimismo

A mi madre y a mis hermanos con todo mi cariño.

Gracias Alfredo por tu compañía.

*Para mis hijas Nadia, Diana y Tania, por toda su paciencia, apoyo, entusiasmo
alegría, dulzura.. que facilitaron la realización de esta meta.*

*Gracias a todos mis compañeros del laboratorio 104, especialmente a: Sobeida,
Alicia y Oscar*

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Irma Bernal Lugo, quien en forma incansable me brindó sus invaluable conocimientos y experiencia.

Agradezco a todos los miembros del jurado el tiempo que dedicaron a la lectura de este escrito, a sus valiosos consejos y aportaciones.

Doy las gracias también a Conacyt el apoyo que me brindó para realizar este trabajo, al otorgarme la beca con número 82358.

INDICE GENERAL

Resumen	1
Capitulo I.-INTRODUCCION	4
I.-ANTECEDENTES	5
I.-1.-ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA SEMILLA DE FRIJOL.	5
I.-2.-COCCION Y ENDURECIMIENTO.	9
I.-3.-ENVEJECIMIENTO.	13
I.-4.-CONTRIBUCION DE REACCIONES NO-ENZIMATICAS AL DETERIORO DE LAS SEMILLAS.	14
I.-4.-1.-Peroxidación de Lípidos.	14
I.-4.-2.-Obscurecimiento no enzimático.	16
Capitulo II - OBJETIVO	17
Capitulo III.- MATERIAL Y METODOS.	19
III.-1 -Material Biológico.	19
III.-2.-Cinética de imbibición.	19
III.-3.-Determinación del tiempo de cocción.	20
III.-4.-Contenido de humedad.	22
III.-5.-Viabilidad y vigor.	22
III.-6.-Extracción y cuantificación de proteínas.	23
III.-7.-Determinación de lectinas.	24
III.-7.1.-Preparación de eritrocitos	24
III.-7.2.-Lavado de eritrocitos.	24
III.-7.3.-Sensibilización de globulos rojos	24
III.-7.4.-Microtitulación	24
III.-8.-Determinación de los azúcares.	27
III.-9.-Determinación de fenoles.	29
III.-10.-Análisis estadístico de resultados	29
Capitulo IV.-RESULTADOS	30
IV.-1.-Efecto del almacenamiento en la calidad integral del frijol.	30
IV.-2.-Contenido de humedad.	34
IV.-3.-Cinética de imbibición.	35
IV.-4.-Efecto del deterioro en el contenido de biomoléculas.	36
IV.-4.1.-Azúcares	36
IV.-4.2.-Proteínas.	39
IV.-4.3.-Extractabilidad de fenoles.	42
Capitulo V.-DISCUSION	44
Capitulo VI.-CONCLUSION.	49
BIBLIOGRAFIA.	50
ANEXO	55

RESUMEN

El frijol es una semilla domesticada que se utiliza como insumo agrícola y como alimento. Para el primer caso la calidad de la semilla principalmente es determinada por la viabilidad y el vigor (1, 2). Mientras que el tiempo de cocción juega un papel importante en su calidad alimenticia, valor nutritivo y comercial (3, 4).

Las semillas de frijol muestran dos diferentes manifestaciones de deterioro:

a).- El endurecimiento, que disminuye el valor alimenticio y aumenta su tiempo de cocción con el consecuente gasto de energía, este fenómeno involucra principalmente a los cotiledones.

b).- El envejecimiento, que se manifiesta como una disminución en la viabilidad de las semillas, lo que afecta su valor agrícola, en este caso, se lesionan tanto los cotiledones como el eje embrionario (5, 6, 7).

El deterioro de las semillas en almacén se asocia a cambios físicos y químicos de las estructuras y biomoléculas de las semillas como son: daño a membranas, disminución de la actividad biosintética y enzimática, cambios en la solubilidad de las proteínas y aumento en las lesiones en el DNA.

También se ha reportado que la cantidad de azúcares, ácido fítico, fenoles y ATP varía durante el almacenamiento (7, 8, 9).

La longevidad de la semilla en los bancos de germoplasma (contenido de humedad < 10%, humedad relativa del orden del 50% y temperatura $\leq 10^{\circ}\text{C}$) parece deberse a que el citoplasma está en estado vítreo, este es un líquido-sólido de alta viscosidad, que impide la difusión molecular, evitando o disminuyendo la realización de reacciones (10). Este estado vítreo es inestable y

la temperatura a la que se funde depende también del contenido de humedad. Algunos carbohidratos solubles (sacarosa, rafinosa, estaquiosa y verbascosa), son los agentes vitrificantes de la semilla y por tanto podrían brindar protección a las estructuras celulares en el estado seco (11 y 12).

Cuando las semillas son almacenadas en ambientes tropicales o subtropicales, el contenido de humedad de la semilla se incrementa. Este aumento, incidirá negativamente en la estabilidad del estado vítreo de la semilla, lo cual a su vez acelera el deterioro.

Con la finalidad de establecer si el estado vítreo participa en la protección de la calidad integral de la semilla en el estado seco; en este trabajo se determinó si la calidad de la semilla se asocia a los contenidos de azúcares en el embrión.

Para lo cual se determinó:

- a) -Si la velocidad de deterioro en ejes embrionarios y en cotiledones fue la misma.
- b) -Si existe asociación entre el deterioro de las semillas y la composición de azúcares en ellas.
- c) -Por otro lado en forma indirecta se determinó si los cambios en los contenidos de azúcares se asocian a reacciones deletéreas como la lignificación, la cual puede detectarse a través de cambios en la solubilidad de los taninos, y alteraciones en la estructura de las macromoléculas (lectinas).

Se observó que el endurecimiento se presentó más rápido que el envejecimiento ya que al mes de deterioro el T_{50} (tiempo que tarda en cocerse el 50% de los frijoles), se duplicó en comparación, al T_{50} del control, mientras que la viabilidad decreció solo en un 17%, esto hace suponer que los cotiledones son más sensibles al deterioro realizándose el endurecimiento y el envejecimiento a diferentes velocidades. Por lo tanto el valor alimenticio de la semilla disminuye a mayor velocidad que el valor como insumo agrícola.

Simultaneo a esta disminución en la calidad de la semilla, se observaron cambios en las propiedades fisicoquímicas y en los niveles de algunas moléculas. Por ejemplo, en ambos tipos de tejidos la solubilidad de proteínas, la actividad de lectinas y los niveles de sacarosa y oligosacáridos de la familia de la rafinosa disminuyeron, como consecuencia del deterioro de la semilla, mientras que el nivel de monosacáridos aumentó. La magnitud y la velocidad de estos cambios fueron mayores para ejes que para cotiledones.

Por otro lado la solubilidad de los fenoles presentes en testa fue menor en las semillas deterioradas que en las semillas control.

De los resultados anteriores se pudo concluir que el deterioro de la semilla está acompañado por una disminución de los carbohidratos que estabilizan el estado vítreo (oligosacáridos de la familia de la rafinosa), y que por lo tanto durante el almacenamiento en condiciones adversas (75% de humedad relativa y 30°C) disminuye el papel protector que brinda este estado físico, a la estabilidad de la semilla durante el almacenamiento.

Finalmente dado que los cambios moleculares se realizan más rápido en los ejes, que en los cotiledones, se sugiere que la estructura de la testa está contribuyendo al endurecimiento, pero no en forma importante a la viabilidad, i.e. durante el almacenamiento la rigidez de la testa podría estar aumentando por la polimerización de los fenoles.

I.-INTRODUCCION

Las semillas de frijol, al igual que la mayoría de las semillas domesticadas, son utilizadas por el hombre como insumo en la agricultura, o como alimento para humanos y para animales.

Las propiedades que determinan su calidad como semilla de uso agrícola principalmente son la viabilidad y el vigor (1, 2), mientras que su calidad alimentaria la determinan su tiempo de cocción y valor nutritivo (3, 4).

Durante el almacenamiento, ambos tipos de propiedades se afectan negativamente; por ejemplo, la viabilidad, el vigor y el valor nutritivo disminuyen (1) y el tiempo de cocción se incrementa (4).

Diversos estudios han demostrado que el deterioro de semillas está asociado con cambios físicos y químicos de sus componentes; por ejemplo, la actividad de algunas enzimas, la capacidad biosintética de proteínas y la cantidad de proteína soluble disminuyen, mientras que las lesiones al DNA aumentan. Las pozas de azúcares, ácido fítico, fenoles y ATP son algunos de los metabolitos que varían durante el almacenamiento de la semilla (7, 8, 9,13).

La magnitud y velocidad de este deterioro depende del genotipo, del tiempo de almacenamiento, de la temperatura y de la humedad relativa en el almacén (5). Lo anterior sugiere que las semillas poseen un mecanismo de protección que evita su deterioro en el almacén y que la velocidad a la cual se pierde o disminuye es modulada por humedad y temperatura.

El citoplasma de las células de los embriones de semillas recién cosechadas de maíz, chícharo y frijol soya se encuentran en estado vítreo. Un vidrio es un

líquido-sólido de alta viscosidad que impide la difusión molecular y, por lo tanto, disminuyen o se evitan las reacciones (11).

El estado vítreo es inestable y la temperatura a la cual se funde depende del contenido de humedad y de la composición química (11). La sacarosa y los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (estaquiosa y verbascosa) constituyen los agentes vitrificantes de la semilla (9, 10, 12).

Por lo anterior es razonable hacer la hipótesis siguiente: durante el almacenamiento de las semillas, en condiciones de ambiente tropical o subtropical, el estado vítreo del citoplasma se pierde, con lo cual se favorecen las reacciones deletéreas, que conducen al deterioro de la semilla. Lo anterior puede deberse a que durante el almacenamiento se favorece un cambio cualitativo y/o cuantitativo de los azúcares.

El objetivo de este trabajo fue determinar si durante el almacenamiento se modifican los contenidos de azúcares de la semilla de frijol, y si esta modificación propicia el establecimiento de reacciones deletéreas, que a su vez resultarían en la pérdida de la calidad integral de la semilla.

I.-ANTECEDENTES

I. 1.-ESTRUCURA Y COMPOSICION DE LA SEMILLA DE FRIJOL

La semilla de frijol, se desarrolla a partir de un óvulo, en la madurez consta de las siguientes partes; el embrión, dos cotiledones y la cubierta de la semilla o testa. En la superficie se localiza el hilio esta estructura corresponde a la cicatriz

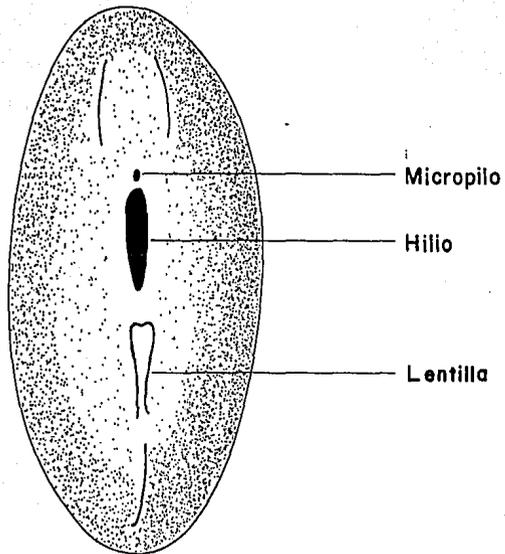
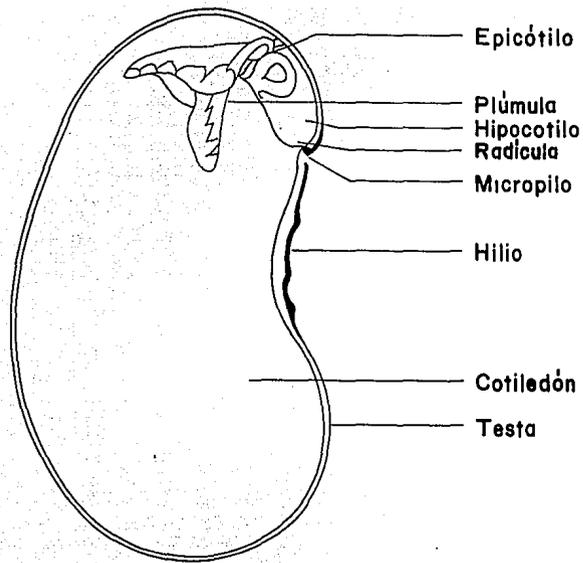


Figura 1.- Semilla de frijol

que se forma al desprenderse la semilla del funículo y el micrópilo que es un poro a veces obliterado en la cubierta de la semilla que se localiza a un lado del hilio, que correspondía en el óvulo al orificio a través del cual entraba el tubo polínico, y la rafe borde situado a un lado del hilio y opuesto al micropilo que representa la base del funículo. La testa tiende a ser; lisa, dura, quebradiza de colores variados (fig 1). Protegido por la testa está el embrión, constituido por el eje embrionario, el cual está formado por el hipocotilo que presenta en un extremo el primordio radical llamado radícula y en el otro los cotiledones y un ápice con las primeras hojas denominadas plúmulas (14, 15).

A continuación se describen las estructuras y componentes de la semilla que participan en el deterioro.

El citoplasma de las células de los cotiledones y del eje embrionario contiene proteínas distribuidas en forma amorfa; y granos elípticos de almidón, embebidos en una matriz que consiste de cuerpos proteicos. Estos poseen inclusiones cristalinas o globoides ricas en ácido fítico. Las proteínas de reserva también se encuentran localizadas en el interior de estos organelos.

Aproximadamente el 60% de las proteínas de frijol son globulinas, cerca del 20% son albúminas y 3% son prolaminas (16). Las lectinas son un tipo especial de globulinas que se caracterizan por ser glucoproteínas con capacidad para aglutinar eritrocitos, por lo que también se les conoce como fitohemaglutininas (17, 18).

El ácido fítico o hexafosfato de mioinositol, es la forma en que las semillas almacenan fosfato inorgánico. Los contenidos de ácido fítico en la semilla de frijol varían de 0.2 a 2.5 % con base en peso seco (19). La estructura polar de esta molécula le proporciona un fuerte potencial quelante por lo que interacciona con cationes mono y divalentes que incluyen a ciertos minerales esenciales de la

dieta como el Zinc, al que hace biológicamente inaccesible para su absorción (19).

En el grano de frijol el 90% del ácido fítico se encuentra soluble (20, 21), quizás en forma de un complejo proteína-ión divalente-fítico. El resto se encuentra en forma insoluble y es depositado en globoides cristalinos del cuerpo proteico (fitato [19]).

La pared celular es la estructura que rodea al protoplasma y está constituida por microfibrillas de celulosa, hemicelulosa y lignina. Las paredes celulares de dos células contiguas están unidas por la lamela media formada principalmente por sustancias pécticas (22). Este cemento intercelular es una mezcla de polisacáridos constituidos por pectinas, polímeros del ácido galacturónico esterificado parcialmente con grupos metilo y donde los grupos carboxilos libres interaccionan con iones inorgánicos, para formar pectatos. La pared celular también contiene del 5 al 10% de compuestos polifenólicos en la forma de complejos polisacáridos-proteína polifenol, además de ciertos polisacáridos neutros (23).

La testa de las semillas de frijol, al igual que la de otras leguminosas, es rica en taninos y ligninas (23, 24). Los taninos son compuestos fenólicos solubles en agua, de peso molecular entre 500 y 3000 daltones y que poseen la capacidad de precipitar alcaloides, gelatinas y otras proteínas (23). Los dos componentes monoméricos más abundantes son los compuestos isoméricos catequina y epicátequina, los cuales se condensan para formar polímeros hexaméricos y heptaméricos.

La lignina es un polímero tipo malla compuesto de alcoholes aromáticos sustituidos. Su estructura tridimensional consiste de cadenas lineales entrecruzadas por una variedad de enlaces covalentes intercadena. Es un

compuesto no cargado, insoluble y ampliamente distribuido en tejidos vegetales donde se encuentra unido en forma covalente a los componentes de la hemicelulosa de la pared celular y de la lamela media (23). Su función es la de disminuir la permeabilidad del agua a través de la pared celular, impartir rigidez y unir células, creando una estructura resistente al impacto, a la compresión y a la deformación. Este compuesto parece estar ausente o se encuentra en muy bajas concentraciones, en el eje embrionario y en los cotiledones (23)

El frijol contiene del 47% a 71% de carbohidratos, dependiendo del cultivar, y de éstos entre el 15 y el 20% no son digeribles pues están formados por, rafinosa, estaquiosa y verbascosa (24).

I. 2.-COCCION Y ENDURECIMIENTO

El 81.8% de las proteínas que consumimos son de origen vegetal (25, 26). Entre los vegetales ricos en proteínas está la familia de las leguminosas la cual comprende 600 géneros con cerca de 1300 especies de las cuales sólo 10 ó 12 son de importancia económica. De éstas, Phaseolus vulgaris constituye la especie más cultivada del género y su representante más conocido es el frijol común (25, 26). Esta especie tiene su origen en América, se consume a nivel mundial, principalmente en Latinoamérica, su producción se impulsa pues se le considera un alimento básico en amplios sectores de la población. Además tiene la capacidad para incorporar nitrógeno atmosférico al suelo (3), lo cual redundará en un beneficio para la práctica agrícola.

En cuanto a su valor nutricional, el frijol es una fuente importante y económica de proteínas, carbohidratos complejos, fibras y algunos minerales como el hierro.

Presenta un alto contenido de lisina, sin embargo tiene pocos aminoácidos azufrados, por lo que el frijol se complementa con el consumo de cereales (arroz, maíz, cebada y ajonjolí). De esta forma el frijol aporta la lisina y los cereales aportan los aminoácidos azufrados metionina y cisteína (25, 26, 27, 28).

No obstante todas las ventajas que presentan, las leguminosas contienen factores tóxicos y antinutricionales que limitan su aprovechamiento, entre éstos están los inhibidores de tripsina, las fitohemaglutininas, los factores bociogénicos, glucósidos cianogénicos, etc. (25, 26, 30, 31)

Para su consumo el frijol, al igual que otras leguminosas, debe ser cocido. Durante este tratamiento térmico ocurren cambios estructurales en las semillas, ya que el dicho tratamiento fractura y solubiliza a la lamela media (32) con lo cual las células se separan, disminuyendo la rigidez de las semillas. En el citoplasma las proteínas se desnaturalizan, de esta manera se facilita la gelatinización de los gránulos de almidón (33). Estos cambios fisicoquímicos inducidos por el calor se reflejan en la suavización de la semilla, la pérdida de la toxicidad, la adquisición de sabor agradable y un aumento en la digestibilidad.

La solubilidad del material intercelular depende tanto de la cantidad de Ca^{2+} y Mg^{2+} que interaccionan con las sustancias pécticas (34), como del tamaño de las fibras (35) por lo que el cambio en solubilidad de las pectinas, observado durante la cocción (32), debe estar relacionado con una disminución en el contenido de cationes divalentes de la lamela media y/o una disminución en el grado de polimerización de las sustancias que la forman.

Los niveles de sodio, potasio, calcio, magnesio y sustancias pécticas son menores en la semilla cocida que en la fresca (36). Los datos antes mencionados apoyan la propuesta de que durante la cocción del frijol, la solubilización de la

lamela media se realiza a través de la despolimerización térmica de las pectinas y por un intercambio de iones divalente por monovalentes.

De lo anterior se concluye, que cualquier factor que modifique cualitativa o cuantitativamente los componentes de la pared celular y/o la susceptibilidad de los gránulos de almidón a la gelatinización o la estabilidad térmica de las proteínas afectará en forma importante el proceso de cocción.

Los factores que se han relacionado con el endurecimiento del frijol durante el almacenamiento son: la humedad, la temperatura y el tiempo de almacenamiento (37). El frijol, con un contenido de humedad entre el 13 y el 18% requiere de tiempos de almacenamiento mayores a 6 meses para endurecerse, siempre y cuando la temperatura de almacenamiento sea menor de 30°C (37), pero si se almacena a 4°C, no se endurece ni aún en 2 años (38); expuesto a 100% de humedad relativa y a 14°C sólo requiere de 14 días de almacenamiento para aumentar su tiempo de cocción (39).

A la fecha, se han identificado dos grupos de alteraciones en las semillas que presentan dificultad para cocerse:

1.-Disminución de la capacidad de la semilla almacenada para distribuir el agua en los cotiledones.

2.-Cambios estructurales y bioquímicos como consecuencia de reacciones específicas inducidas durante el almacenamiento (5, 40).

En el frijol endurecido a temperaturas mayores de 25°C y humedad relativa de 75% o más, el agua absorbida por las semillas se queda entre la testa y los cotiledones, mientras que en el frijol fresco el agua se distribuye uniformemente en los cotiledones (5). Esta diferente distribución del agua contribuye, probablemente, a que la cinética de humectación de los componentes de la

semilla sea diferente en el frijol fresco y en el frijol endurecido y, por consecuencia, la sensibilidad térmica de la semilla varíe en ambos lotes de frijol.

En relación a la segunda propuesta, se han estudiado algunos cambios químicos que ocurren en el frijol durante las diferentes etapas del proceso (36).

Algunos de los compuestos químicos que se modifican en los cotiledones, durante el almacenamiento del frijol en condiciones adversas, son las proteínas, el almidón, las pectinas y los polifenoles.

Jones y Boutler (1983) por técnicas de microscopía de luz reportaron que durante la cocción las células de los cotiledones en frijol duro no se separan, como en el frijol fresco, sino que permanecen unidas por la lamela media, que permanece intacta. Entre las moléculas que se cree que están relacionadas con la disminución en el proceso de la separación celular del frijol endurecido, están los fenoles los cuales podrían lignificar a la lamela media durante el almacenamiento (5, 41, 42, 43). Estos compuestos son algunos de los componentes de los pigmentos que caracterizan los diferentes colores de la semilla y se encuentran principalmente en la testa. El interés en estos compuestos ha aumentado en los últimos tiempos, debido a su influencia adversa sobre el color, sabor y calidad nutritiva del frijol.

Las catequinas disminuyen según aumenta el tiempo de almacenamiento. Esta disminución se acompaña de un incremento en la actividad de la enzima polifenol-oxidasa, de la dureza de la semilla y de un aumento en el tiempo de cocción (44); Aparentemente, el contenido de catequina tiene una relación inversa con la absorción del agua por la semilla y se cree que la menor capacidad de la semilla endurecida para distribuir el agua absorbida, se debe a la polimerización de estos compuestos por acción de la polifenol-oxidasa y también a la probable formación de complejos proteína-fenol (45).

Los niveles de ácido fítico (21), cuerpos proteicos (8) y proteínas (36), disminuyen en el frijol difícil de cocer. Se ha sugerido que los cambios en la composición de la semilla, inducidos durante el almacenamiento, producirían un aumento en la termosensibilidad de las proteínas del citoplasma y en la gelatinización del almidón y por lo tanto, un aumento en el tiempo de cocción (36). La evidencia experimental que apoya esta propuesta es la siguiente:

1.- Al romperse los cuerpos proteicos y disminuir los contenidos de la fitina, los niveles de fosfato y iones inorgánicos aumentan en el citoplasma. En sistemas in vitro se ha demostrado que la temperatura de gelatinización y la desnaturalización de proteínas varía con la composición iónica del medio (46, 47).

2.-La digestibilidad del almidón y de las proteínas disminuye conforme aumenta el tiempo de almacenamiento (26, 48), lo que indica que la estructura de estas macromoléculas se ha modificado.

3.-En frijol fresco (cv. Ojo de Cabra), se ha demostrado que los gránulos de almidón están asociados a vesículas que contienen fenoles (13), y si durante el almacenamiento estas vesículas se rompen, su contenido quedaría libre en el citoplasma y disponible para interactuar con las macromoléculas presentes en este compartimiento celular. Este tipo de modificación química explicaría la disminución de digestibilidad observada en almidón y proteínas de semillas endurecidas.

I. 3.-ENVEJECIMIENTO

Las semillas presentan su máximo potencial de germinación al momento de alcanzar su madurez fisiológica; a medida que el tiempo de almacenamiento se incrementa, pierden vigor gradualmente y finalmente mueren (49).

El envejecimiento o la pérdida de vigor se manifiestan por un retraso en la germinación (tiempo en el cual protuye la radícula) y la emergencia, o bien por una reducción en el porcentaje de germinación (viabilidad), y un incremento en la susceptibilidad al estrés ambiental (50, 51, 52, 53).

Este envejecimiento de semillas involucra muchos cambios físicos y químicos en los componentes de las mismas, tales como; la destrucción de la integridad celular (54, 55), la reducción en la actividad enzimática (7, 56), la peroxidación de lípidos (54), la disminución en la cantidad de proteína extraíble (7) y un aumento de lesiones en el DNA, tales como el rompimiento de cromosomas (7).

Aparentemente, el metabolismo celular no contribuye al deterioro de semillas en el almacén pues para que se inicie el metabolismo celular se requiere de cuando menos un 20% de contenido de humedad de la semilla y generalmente las semillas que se van a utilizar como insumo en la agricultura se almacenan con contenidos de humedad menores al 12% (7).

I.4.-CONTRIBUCION DE REACCIONES NO-ENZIMATICAS AL DETERIORO DE LAS SEMILLAS

1. 4.1.-Peroxidación de lípidos .

En presencia de oxígeno, las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos espontáneamente se oxidan, produciendo radicales libres y/o hidroperóxidos. La velocidad de esta reacción es acelerada por un tipo de enzimas llamadas lipo-oxigenasas, las cuales se encuentran presentes en las semillas. Una vez que un radical libre es formado, generalmente por el ataque del

oxígeno, una cadena de reacciones se inicia, la cual produce a su vez ciclos de reacciones y más radicales libres son producidos.

Las biomembranas presentan el sitio clave para la formación y acción de los radicales libres. Las membranas poseen una mayor área y los lípidos que las constituyen son más insaturados que los lípidos de almacenamiento (57). Existe evidencia experimental que muestra que la peroxidación de lípidos conduce a una disminución en la integridad membranal, la cual se detecta por un aumento en la conductividad del medio en el cual se germinan las semillas. En general, se ha demostrado que las semillas deterioradas, cuando son germinadas, pierden por escape (leakage) una mayor cantidad de sustratos que la semilla control.

Los daños causados por los radicales libres se realizan en regiones cercanas a su lugar de formación ya que su vida media es muy corta. Sin embargo, durante la lipo-peroxidación también se forman especies químicas estables, tal es el caso de los 4-hidroxi-alquenos. Estos aldehídos reaccionan con grupos sulfhidrilos lo cual conduce a una inactivación de las proteínas. Estos compuestos proveen un mecanismo para efectos deletéreos a larga distancia (58).

Los componentes celulares asociados al sitio de formación de radicales libres, pueden ser co-oxidados por transferencia de radicales resultantes de la oxidación de lípidos y esto constituye otra manera de como la generación de radicales libres daña los sistemas celulares. Por ejemplo, se ha demostrado que la per-oxidación de lípidos causa que las proteínas se polimericen (59) y además causa mutaciones en bacterias (60); Por lo tanto, la lipoperoxidación es capaz de dañar a un organismo vivo cuando menos de tres formas:

- a).-Por cambios en la composición de lípidos de membrana.
- b).- Por co-oxidación de componentes celulares.

c).-Por formación de aldehídos citotóxicos.

1.4.2.- Obscurecimiento no enzimático.

La reacción de Maillard y su precursora, la reacción de Amadori, son reacciones que ocurren entre los azúcares reductores y los grupos amino de los aminoácidos o de las proteínas. Estas reacciones no enzimáticas proceden lentamente en solución (61), pero se acelera en condiciones de baja disponibilidad de agua (estado seco), debido a efectos de la concentración de solutos. En los sistemas secos, la reacción de Maillard procede óptimamente a A_w entre 0.3 - 0.9 (62). El deterioro del maíz está asociado a disminución gradual del contenido de rafinosa (9) y a un aumento en el contenido de monosacáridos (62), lo cual incrementa la disponibilidad de azúcares reductores para la reacción de Maillard. Las consecuencias deletéreas de esta reacción serían la pérdida de actividad enzimática (62), y la pérdida de funcionalidad de ácidos nucleicos (7). Los dos efectos se presentan en semillas envejecidas.

II.-OBJETIVO

De los antecedentes descritos en la sección anterior se concluye que el envejecimiento y el endurecimiento del frijol constituyen dos manifestaciones del deterioro de la semilla. En el envejecimiento están involucrados tanto los cotiledones como el eje embrionario, mientras que en el endurecimiento sólo los cotiledones juegan un papel importante. La velocidad y magnitud de cada una de estas manifestaciones depende de las condiciones de humedad y temperatura bajo las cuales se almacena la semilla, así como del tiempo que dura dicho almacenamiento.

A pesar de la enorme cantidad de trabajos de investigación realizados sobre el deterioro de semillas en almacenamiento, el mecanismo por medio del cual la semilla se deteriora, permanece obscuro. A la fecha se han descrito diversos cambios físicos y químicos de algunos de los componentes de la semilla que están asociados al deterioro, algunos de los cuales fueron descritos en la sección anterior, pero no se ha logrado establecer con claridad si son la causa o el efecto del deterioro.

En nuestro laboratorio, estamos interesadas en identificar marcadores bioquímicos que permitan la generación de variedades más tolerantes al almacenamiento en condiciones de ambiente tropical y subtropical. El presente trabajo forma parte de este esfuerzo.

El objetivo particular de este trabajo es establecer si el mecanismo de protección de la semilla en estado seco, está asociado a los contenidos de azúcares del embrión. El logro de este objetivo permitirá sugerir si el estado vítreo del

citoplasma participa en el mecanismo de protección de la semilla en el estado seco.

Para el logro de este objetivo se plantearon las siguientes metas.

1.-Determinar si los cotiledones y el eje embrionario se deterioran a la misma velocidad. Si esto es así, entonces el tiempo de cocción de la semilla deberá aumentar en forma paralela a la pérdida de viabilidad.

2.-Determinar si el deterioro de las semillas está asociado con cambios en la composición de azúcares de las semillas.

3.-Determinar si los cambios en los contenidos de azúcares están asociados a reacciones deletéreas, como ejemplo de éstas se escogieron la lignificación y las alteraciones en la estructura de las macromoléculas. Ambas reacciones, fueron cuantificadas de manera indirecta. La primera, por cambios en el contenido de fenoles y la segunda, por cambios en la cantidad de fitohemaglutininas.

Un resultado positivo en 2 y 3, sugeriría que el estado vítreo participa en el mecanismo de protección de la calidad de la semilla en estado seco.

III.-MATERIAL Y METODO

III. 1.-Material Biológico.-

Para la realización de este trabajo se utilizaron semillas de frijol (Phaseolus vulgaris) cv. Flor de Mayo Bajío cosecha 1991. El lote de semillas se dividió en dos partes.

Una llamada grupo control fue almacenado en frascos cerrados a 4 °C para evitar su deterioro, la otra se almacenó a 30 °C y una humedad relativa (HR) de 75% por los siguientes períodos de tiempo, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 meses. Estas muestras constituyeron los grupos experimentales.

III. 2.-Cinética de la Imbibición.

Esta se realizó para determinar si el deterioro induce algunas diferencias en la absorción de agua. La imbibición se realizó con semillas escarificadas y sin escarificar; en ambos grupos control y deteriorados. La escarificación de las semillas se realizó haciendo tres pequeñas perforaciones en la testa, sobre cada cotiledón. Si las semillas deterioradas son capaces de absorber agua en la misma proporción sabremos que la testa no constituye una barrera a la hidratación de la semilla y que el deterioro modificó su capacidad de hidratación. Para cada tratamiento se prepararon cuatro rollos con doce semillas cada uno, los rollos se prepararon de la siguiente forma, los frijoles se colocaron sobre toallas de papel húmedas cuidando que las semillas estuvieran orientadas en la misma dirección, se cubrieron con otra toalla húmeda y los extremos de las toallas se enrollaron. Los rollos se mantuvieron a una temperatura de 30°C en una cámara a 100% de HR. las semillas se pesaron cada tres horas todas las determinaciones se

realizaron por triplicado. La hidratación de la semilla se expresó como % de agua absorbida en base seca.

III.3.-Determinación del tiempo de cocción.

Para realizar esta determinación se utilizó un Mattson modificado (fig. 2) con capacidad para 25 semillas. Este consta de tres planchas circulares de acero inoxidable, unidas entre si por cuatro pequeñas columnas de acero de 3 mm de diametro cada una, la separación entre cada plancha es de 7.5 cm. Para cada determinación se seleccionaron 25 semillas homogéneas e intactas, desechándose las que tenían la testa rota. Ya seleccionadas las semillas se colocaron en un matraz erlenmeyer de 250 ml y se ajustó la cantidad de agua con la siguiente proporción, 10 ml de agua por cada gramo de frijol. Las semillas se mantuvieron en remojo durante 18 horas a 25°C, tiempo que se determinó a partir de las curvas de contenido de humedad realizadas anteriormente, las cuales mostraron que a este tiempo se alcanzó una hidratación máxima y similar para ambos lotes.

Las semillas remojadas se colocaron en los orificios del Mattzon, se insertaron las varillas en sus correspondientes perforaciones y se les colocó en la parte superior su respectiva pesa de 194.14 g. El Mattzon se colocó en la olla con agua hirviendo. El tiempo de cocción se determinó como el tiempo en que la varilla (194.14 g) penetró al frijol. Cada determinación se realizó por triplicado.

Este parametro se reporta como Tc 50, es decir, el tiempo que tardan en cocerse el 50% de los frijoles.

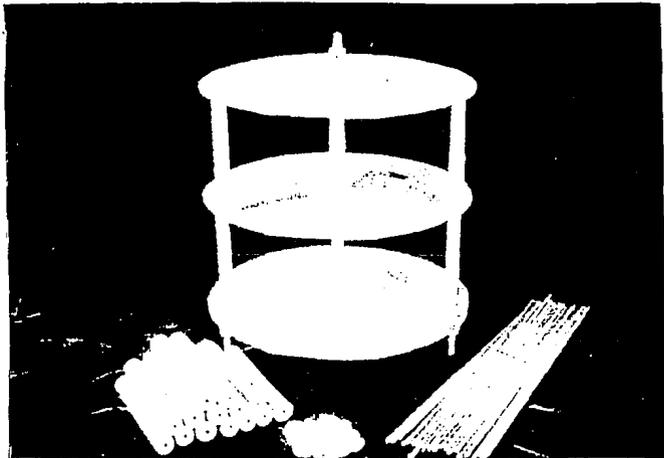
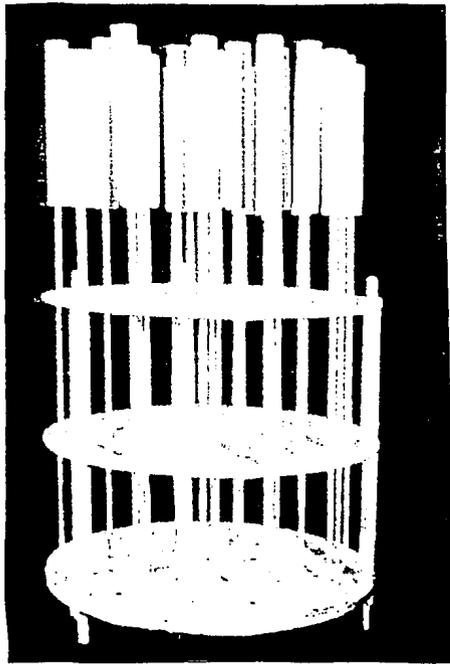


Figura. 2.- Mattzon

III. 4.- Contenido de Humedad

Para realizar esta determinación se utilizaron cajas de aluminio: se verificó que las tapas sellaran perfectamente; cada caja y su tapa se identificaron con el mismo número; en cada caja se colocó un gramo de semillas manteniéndose a 130 °C hasta que llegó a peso constante, las determinaciones se realizaron por triplicado.

La humedad se determinó de la siguiente forma :

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i (c+s) - P_f (c+s)}{P_f (c+s) - P (c)}$$

En donde:

P_i = Peso inicial

c = caja de aluminio

s = semillas

P_f = Peso final.

III.5.-Viabilidad y Vigor

Para estas determinaciones se siguió la técnica descrita por Moreno (64). Para Phaseolus vulgaris se colocaron las semillas en "rollos", éstos se prepararon con cuatro hojas de toallas de papel húmedas, dos abajo de las semillas y dos cubriéndolas. Ya cubiertas las semillas, las orillas de las toallas se doblan. Finalmente las toallas se enrollaron y las plántulas se observaron diariamente durante siete días. Cada rollo se preparó con 12 semillas y las determinaciones se realizaron por triplicado.

La viabilidad se determinó como el porcentaje de semillas que germinaron en este período de tiempo. En cuanto al vigor, dependiendo de las características de desarrollo las plántulas se clasificaron en: normales vigorosas, normales débiles y anormales.

III. 6.-Extracción y cuantificación de proteínas

La semilla se disectó en eje embrionario y cotiledones, a estos últimos se le eliminó manualmente la testa. Cada uno de los componentes del embrión se molió por separado en un molino de café, tipo 518 Moulinex (México). La harina se tamizó a través de una malla de 0.028 pulgadas.

Se extrajeron dos fracciones de proteínas una denominada "totales" y la otra "globulinas", cada determinación se realizó por triplicado.

Se pesaron 0.1 g de harina de los cotiledones ó 0.03 g de harina de eje embrionario. A éstos se les adicionó 5 ml de buffer de extracción, conteniendo: fosfato de sodio 0.1M (pH =7), 0.85 M de cloruro de sodio y 0.34%(v/v) de β mercapto etanol. El homogeneizado se realizó en frío usando un Polytron, durante 30 seg. 3 veces, dejando un minuto entre cada homogenización. Éste homogenado permaneció en agitación con un agitador magnético, durante 90 min. a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó en una centrífuga Beckman J2- 20.1 (E.U.A.) a 17400 g durante 20 min. y se transvasó el sobrenadante a otro tubo, para centrifugarse a 39200 g durante 20 min. El sobrenadante fue pasado a través de un filtro millipore de 0.45 μ m. A este sobrenadante se le determinaron proteínas por el método de Lowry (65). Este es un método espectrofotométrico, para determinar proteínas en una solución que se basa en la reacción que tiene el Cu^{2+} con los péptidos en una solución alcalina, en la que se produce un color púrpura. El color producido por el método de Lowry, es resultado de la reacción de biuret, más la reducción del reactivo de Folin Ciocalteau, por residuos de tirosina, las muestras se leyeron a 750 nm.

El extracto de "globulinas" se preparó con 1 g de harina de cotiledón y 0.25 g de harina de ejes. La harina se suspendió en 10 ml de solución salina al 0.17 M

(NaCl) y se agitó mecánicamente durante 2 h. a 4 °C. Transcurrido este tiempo el extracto se centrifugó a 10 000 g durante 15 minutos el residuo se eliminó y el sobrenadante se filtró a través de millipore (0.45 µ). Al filtrado se le determinó el contenido de proteínas (65)

III.7.- Determinación de lectinas

Las lectinas son glicoproteínas que constituyen una fracción de las globulinas.

Algunas variedades de Phaseolus vulgaris contienen altos niveles de fitohemaglutininas y son termolábiles. Este grupo de proteínas ha sido caracterizado y detectado de acuerdo a su acción sobre los eritrocitos. Ya que poseen una afinidad específica para ciertos azúcares que existen en su membrana celular. Son capaces de unirse a los carbohidratos sin modificarlos y esto les da la capacidad de aglutinar células en suspensión que presenten dichos azúcares receptores en la cara exterior de su membrana citoplasmática (66,67,68).

Para que sea posible la interacción lectina-eritocito es necesario como mínimo dos grupos activos. Para facilitar el acceso de las lectinas hacia estos grupos receptores de las membranas celulares se realiza una hidrólisis enzimática leve con tripsina, esta sensibilización expone los grupos receptores (68).

III. 7.-1.-Preparación de los eritrocitos.

Para evitar la hemólisis de los eritrocitos, previo a su utilización, todo el material de vidrio se enjuagó con solución salina al 0.9%.

Se colocaron diez mililitros de sangre de conejo (diez ml) en un matraz erlenmeyer que contenía anticoagulante (15 a 20 U.I. de heparina / 1 ml de sangre), y se agitó suavemente. Con esto la sangre se mezcló con la heparina y se evitó su coagulación (68).

III.7.-2.-Lavado de eritrocitos

Para lavar los eritrocitos la sangre se transvasó a tubos de centrífuga y se le agregó solución salina al 0.9% (1 ml de sangre / 5 ml de solución salina). Los tubos se centrifugaron a 1500 r.p.m. por 10 min en una centrífuga Damon / IECHN - SII; (E.U.A.). El sobrenadante se decantó. El proceso de lavado de la pastilla de eritrocitos se repitió hasta que el sobrenadante fue transparente (usualmente con tres lavados fue suficiente). Los eritrocitos deben ser lavados con el fin de eliminar la heparina y la hemoglobina liberada por ruptura de eritrocitos (68).

Los eritrocitos ya lavados se resuspenden al 4% (1 ml de eritrocitos + 24 ml de solución salina al 0.9%).

III.7.-3.-Sensibilización de glóbulos rojos

Se incubaron diez ml de suspensión de glóbulos rojos al 4% con 1 ml de solución de tripsina al 0.1% (en 0.9% de NaCl) por una hora a 37 °C. Transcurrida la hora, los globulos rojos se transvasaron a tubos de centrifuga. Para eliminar la enzima del sobrenadante, se lavaron tres veces con solución salina al 0.9% . Después del último lavado, el paquete de glóbulos rojos se resuspendió, al 5% (1 ml de eritrocitos + 19 ml de cloruro de sodio al 0.9%) (68).

III. 7.-4.-Microtitulación

La determinación de las lectinas se basa en su capacidad aglutinante hacia los eritrocitos, por esta razón se les llama hemaglutininas. Para la cuantificación de lectinas, en este trabajo se utilizó la técnica de microtitulación (68) que consiste en una serie de diluciones en donde el título final de aglutinación se observa visualmente .

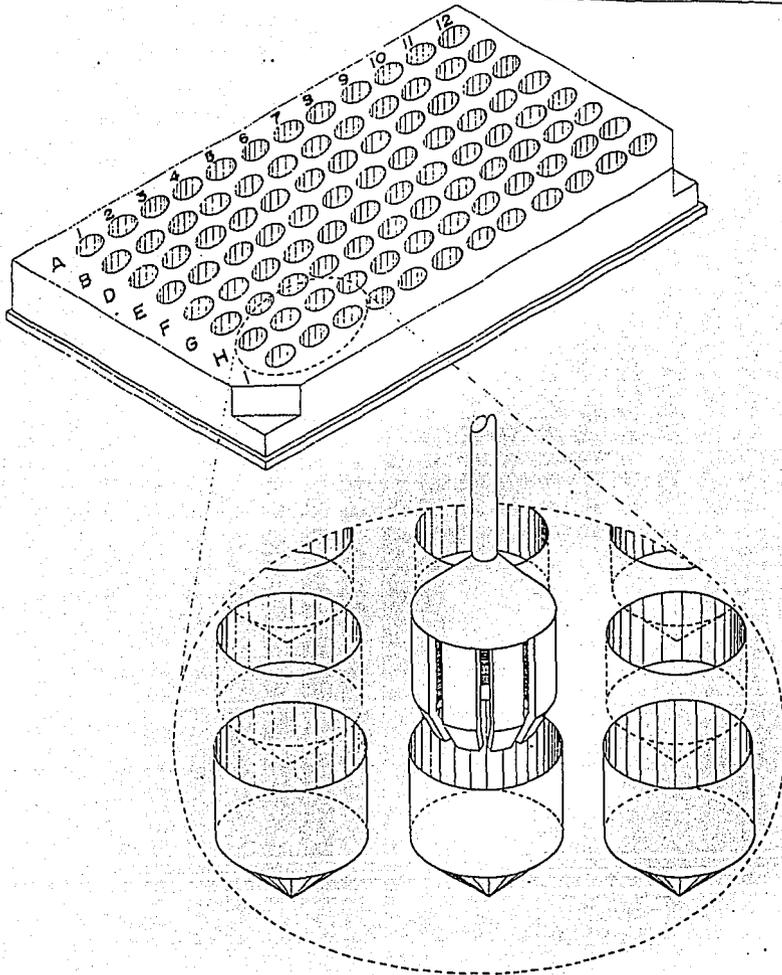


Figura 3.-Microtitulación

Se utilizaron placas con horadaciones tipo V Micro-Well (fig 3). En cada hilera de pozos se colocaron 50 μ l de solución salina al 0,9% evitando tocar las paredes del pozo.

El microdilutor (50 μ l) se llenó con el extracto problema por contacto con la superficie del extracto problema. Introduciendo el microdilutor en el pozo y girándolo suavemente, se realizaron diluciones sucesivas. Finalmente, en cada pozo se colocaron 50 μ l de la solución de glóbulos rojos sensibilizada y ajustada, la placa se gira sobre la mesa con el fin de homogeneizar, posteriormente se incubó a 37 °C durante 1 hora (68).

Lectura

Cada placa tiene marcadas coordenadas en relación al origen, a la derecha para leer los títulos de dilución los pozos están numerados y hacia abajo están marcados con letras.

La placa se colocó en un dispositivo de lectura observándose a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba considerándose como título de dilución el último pozo donde se observó la aglutinación.

III.8.- Determinación de azúcares

Para realizar estos análisis, primero se seleccionó el peso óptimo de cada tejido a utilizar en estas determinaciones, realizándose las preparaciones como sigue se prepararon homogenados tanto de ejes como de cotiledones, de la siguiente forma: se pesaron 50 mg de harina de cotiledones y 20 mg de harina de ejes y se homogeneizaron en 1 ml de alcohol etílico al 80% en un Trearor Tissue , modelo 985 - 370, a una velocidad de 30,000 r.p.m., durante 30 seg. 3 veces, Esta operación se realizó en frío. A continuación se extrajeron a 60 °C, durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron durante 5 minutos en una Microfuge E ^{T.M.} de Beckman (E.U.A.), los sobrenadantes se dejaron secar en una estufa Precision modelo 19 (Scientific Group E.U.A.), a 60 °C con vacío.

Una vez que la muestra se secó, se resuspendió en 1 ml de agua destilada. Con los extractos así obtenidos, se determinó el contenido de azúcares utilizando "kits" de Boehringer Mannheim; para determinar glucosa, fructuosa y sacarosa se utilizó el kit No 716260, para la rafinosa y la galactosa se utilizó el "kit" No 428167. Las muestras se leyeron a 340 nm en espectrofotómetro Shimadzu modelo UV 160U (Japón).

III.9.-Determinación de fenoles

Para realizar estas determinaciones se prepararon los extractos de la siguiente forma; se pesaron 0.025 g de testa y para cotiledones 0.050 g, poniéndose en agitación durante cinco minutos, en cinco mililitros de metanol, transcurrido este tiempo se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 r.p.m., en una centrífuga Beckman GS - GR (E.U.A.) a este primer sobrenadante se le determinaron los contenidos de fenoles. A la pastilla se le realizó un segundo extracto esta vez con cinco mililitros de metanol:agua (1:1) y se procedió a centrifugar como en el primer extracto, a este segundo sobrenadante también se le determinaron fenoles. A la pastilla se le realizó una última extracción con 5 ml agua y se procedió a centrifugar como en los anteriores extractos, posteriormente también se le determinaron fenoles.

El contenido de fenoles en las muestras se determinó utilizando reactivo de vainillina (vainillina al 1% en metanol) al que se le agregó HCl al 8 % en metanol. Antes de utilizarse este reactivo se incubó durante 20 minutos a 30 ° C (69).

A continuación se colocó en cada tubo 1 ml de muestra y se agregó 1 ml de reactivo de vainillina cada minuto hasta completar 5 ml de reactivo en cada tubo. Posteriormente se incubó a 30 ° C durante 20 minutos, después se leyeron a 500

nm en el Espectrofotómetro Sequoia- Turner modelo 340 (Taiwan). Cada muestra tuvo un duplicado y su blanco correspondiente. La curva patrón se preparó con una solución de catequina metanol, utilizando concentraciones de 0.1 hasta 0.9 mg/ml.

Esta prueba se utiliza para determinar taninos condensados o sus monómeros, específicamente aquellos que corresponden a los flavonoles y dihidrochalconas.

III. 10 Análisis estadístico de resultados.

Los resultados obtenidos de los experimentos se sometieron a las siguientes pruebas, primeramente se realizó la prueba de T a las repeticiones de cada variable estudiada, para cada tiempo de deterioro, esto se llevo a cabo con el fin de demostrar que cada medición, corresponde a una muestra de la misma población, esta prueba se realizó utilizando un coeficiente de confiabilidad de 0.005.

A cada parámetro estudiado se le realizó un análisis de varianza (ANOVA), para determinar si las diferencias encontradas entre el grupo control y los tiempos de deterioro son significativas, se trabajo con una probabilidad de 0.0001.

Posteriormente para comparar las medias de los tratamientos se realizó la prueba de Tukey con un $\alpha = 0.05$.

Finalmente los datos obtenidos fueron representados graficamente, ajustandose en la mayoría de los casos a un modelo lineal; se eligió el modelo lineal, por dos razones su simplicidad y los valores de R obtenidos.

IV.-RESULTADOS

IV. 1-EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA CALIDAD INTEGRAL DEL FRIJOL

La calidad integral de la semilla de frijol comprende dos aspectos: Sus características culinarias, determinadas por el tiempo de cocción y sus propiedades agronómicas de viabilidad y vigor. Ambos disminuyeron cuando la semilla se almacenó a 75% de HR y 30°C (Fig. 4).

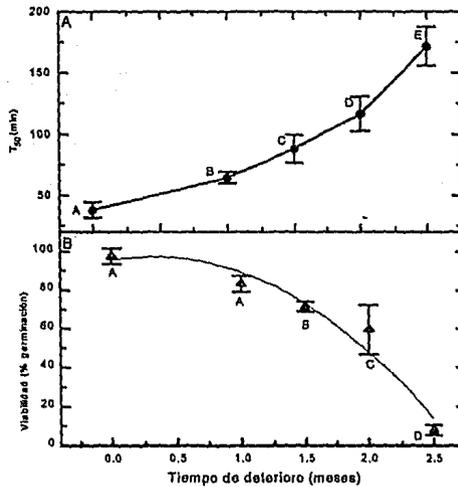


Fig. 4.-Efecto del almacenamiento en la calidad integral de la semilla de frijol. En las graficas se observan los ajustes correspondientes. (A) - Tiempo de cocción T_{50} ($R=0.94$). (B) Viabilidad ($R=0.977$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias.

El efecto negativo del almacenamiento en ambos casos fue significativo (101.34, $P > 0.0001$), en el tiempo de cocción ($F=101.34$) desde el primer mes (fig. 4 A) mientras que para la viabilidad ($F= 65.67$) fueron necesarios 1.5 meses de almacenamiento (Fig. 4 B).

El efecto del almacenamiento en el vigor de las semillas fue valorado por comparación de la capacidad de desarrollo de las plántulas provenientes de lotes de semillas almacenadas con la que presentaban las del control. Esta evaluación se hizo tanto en forma visual, de acuerdo a los criterios del cuadro 1, y cuantificada como peso seco y longitud de cada una de las regiones de la plántula.

Cuadro 1.- Criterios utilizados para determinar el efecto del almacenamiento de la semilla en el desarrollo de las plántulas. ❶

Tiempo de almacenamiento			
Región de la plántula	Desarrollo normal vigoroso	Desarrollo normal débil	Desarrollo anormal
Raíz			
.-Primaria	+	-	-
.-Secundaria	+	+	-
Hipocotilo			
.-bien desarrollado	+	-	-
.-roto y/o necrosado.	-	+	-
.-corto y engrosado	-	-	+
Cotiledones.			
.-dos	+	-	-
.-uno	-	+	-
.-> uno	-	-	+
.-Epicotilo			
.-dos hojas primarias.	+	-	-
.-una hoja primaria.	-	+	-
.-yema terminal	+	+	-

❶.- Modificado de Moreno (64)

+.-Presente

-.-Ausente

Los resultados de la evaluación visual (cuadro 2), indican que el desarrollo mostrado por la radícula de plántulas deterioradas fue similar a el del control

hasta los dos meses de deterioro. A diferencia de lo que se observó en otras partes de las plántulas, cotiledón, hipocotilo y epicotilo, donde a cualquier tiempo de deterioro su capacidad de desarrollo disminuyó respecto a la del control (cuadro 2), siendo esta disminución mucho más dramática a los dos meses de deterioro.

Cuadro 2.-Características de desarrollo de plántulas de semillas control y almacenadas.

Tiempo de almacenamiento					
Región de la plántula	0 meses	1.0 meses	1.5 meses	2.0 meses	2.5 meses
Raíz					
-Normal vigoroso	100 %	100 %	100 %	100%	-
-Normal débil	-	-	-	-	100 %
-Anormal	-	-	-	-	-
Hipocotilo					
-Normal vigoroso	97.0% 02.9%	86.2 % 13.8 %	86.2 % 13.8 %	27.27% 75.45%	- 08.3% -
-Normal débil	-	-	-	-	-
-Anormal	-	-	-	-	-
Cotiledón					
-Normal vigoroso	97.7% 02.9%	91.7% 08.3%	89.0% 11.0%	- 100%	- -
-Normal débil	-	-	-	-	100%
-Anormal	-	-	-	-	-
-Epicotilo					
-Normal vigoroso	99.7 % + 02.9 % +	91.7 % + 08.3 % +	89.0 % + 11.0 % +	- 100 %	- -
-Normal débil	-	-	-	-	100%
-Anormal	-	-	-	-	-
Viabilidad del lote	97.7%	83.3%	72.29%	61.0%	8.3%

☐ -El porcentaje que aparece en la tabla se obtuvo considerando como 100% a las semillas que si germinaron.

☐ -La población total está constituida por 180 semillas y cada lote por 12 semillas.

Cuantitativamente la capacidad de desarrollo y por tanto el vigor de las semillas decreció a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento, y esto se reflejó en que el peso seco (cuadro 3) y la talla del tallo (cuadro 4), disminuyeron a medida

que aumentó el tiempo de almacenamiento siendo más sensible al deterioro la talla del tallo, ya que desde el primer mes de almacenamiento se observó una reducción significativa de casi el 50% en comparación con el control (cuadro 3), mientras que el peso seco del tallo aún cuando disminuyó desde el primer mes, esta diferencia no fue significativa (cuadro 4). A partir de este tiempo de almacenamiento la capacidad del tallo para acumular peso seco disminuyó en forma significativa (cuadro 4).

Cuadro 3.- Peso seco de tallo y de raíz de plántulas de semillas almacenadas.

Tiempo de almacenamiento de las semillas (meses)	Peso seco g / individuo	
	Tallo	Raíz
0	0.117 ± 0.011 ^A	0.024 ± 0.001 ^a
1.0	0.098 ± 0.012 ^A	0.014 ± 0.002 ^b
1.5	0.097 ± 0.008 ^B	0.0096 ± 0.002 ^c
2.0	0.062 ± 0.016 ^C	0.0045 ± 0.00045 ^d
2.5	0.010 ± 0.009 ^D	0.0024 ± 0.00027 ^e

☐.- Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes, con su desviación estandar.

☐.- Números seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes a un $\alpha=0.05$.

Cuadro 4.-Talla del tallo y de la raíz de plántulas de semillas almacenadas.

Tiempo de almacenamiento de las semillas (meses)	Talla cm / individuo	
	Tallo	Raíz
0	27.443 ± 0.63 ^A	16.266 ± 2.0 ^a
1.0	17.423 ± 1.69 ^B	13.41 ± 2.01 ^a
1.5	16.366 ± 0.814 ^C	11.03 ± 1.05 ^b
2.0	13.866 ± 2.45 ^D	10.26 ± 0.95 ^c
2.5	7.633 ± 0.66 ^E	4.70 ± 0.4 ^d

☐.- Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes, con su desviación estandar.

☐.-Números seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes a un $\alpha=0.05$

En cuanto a la radícula (cuadro 3 y 4), se puede observar que tanto el peso seco como la talla de esta, disminuyó en forma proporcional al tiempo de

almacenamiento ($R= 0.99$), siendo en el primer caso las diferencias significativas desde el primer mes (cuadro 3), a diferencia de la segunda en donde las diferencias resultaron ser significativamente diferentes a partir de 1.5 meses de deterioro (cuadro 4).

IV. 2.- CONTENIDO DE HUMEDAD

Durante el primer mes de almacenamiento el incremento en el contenido de humedad (CH) de la semilla (fig 5.) fue discreto de 8% a 9%, pero significativo, ($P > 0.0001$), con una $F= 587.28$. A partir de este momento el contenido de humedad

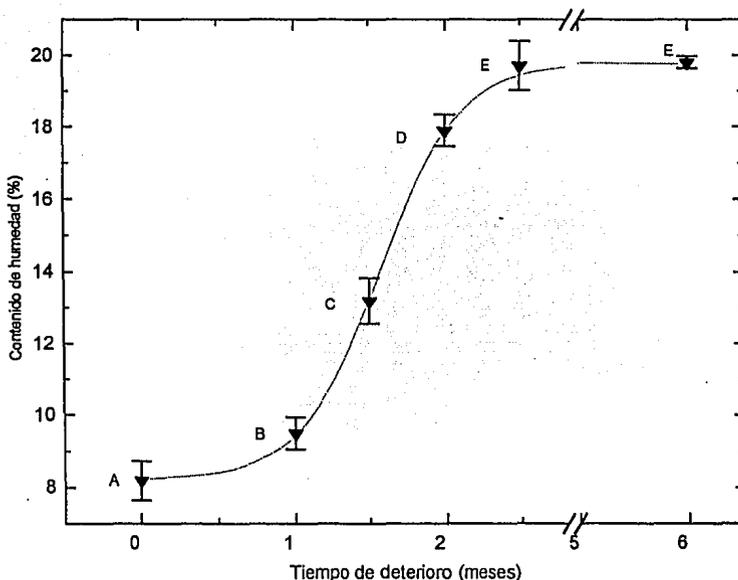


Fig. 5 Contenido de humedad de semillas de frijol almacenadas por diferentes períodos, se ajusta a una sigmoide (Boltzman). Puntos con letras diferentes indican que las diferencias son significativas a un $\alpha= 0.05$

en la semilla se incrementó en forma significativa. Este aumento en el contenido de humedad de la semilla presentó un patrón sigmoïdal (Boltzman), hasta alcanzar a los dos meses de almacenamiento, un valor constante para la hidratación ($\approx 20\%$ C.H.) mismo que se mantuvo hasta los seis meses de almacenamiento que fue el periodo más largo de estudio (fig. 5).

IV.3- CINETICA DE IMBIBICION

Se realizaron cinéticas de imbibición de semillas sin escarificar y escarificadas en los grupos control y con tres meses de deterioro (fig. 6). Las semillas del grupo control, escarificadas y no escarificadas tienen una velocidad de imbibición muy semejante, mientras que en el caso de las deterioradas, las escarificadas tienen una velocidad de imbibición mayor que las no escarificadas durante las primeras 9 hrs. (fig. 6).

Posteriormente la velocidad de las no escarificadas fue ligeramente mayor pero significativa, sin embargo los valores de las pendientes resultaron muy semejantes. La cantidad de agua embebida por las semillas del grupo control fue mayor que en las semillas deterioradas. Después de 40 hrs de imbibición el grupo control alcanzó un 60% más de agua en relación al grupo de deterioradas para cada lote. Por otro lado las dos curvas de imbibición (escarificadas y sin escarificar) resultaron muy semejantes.

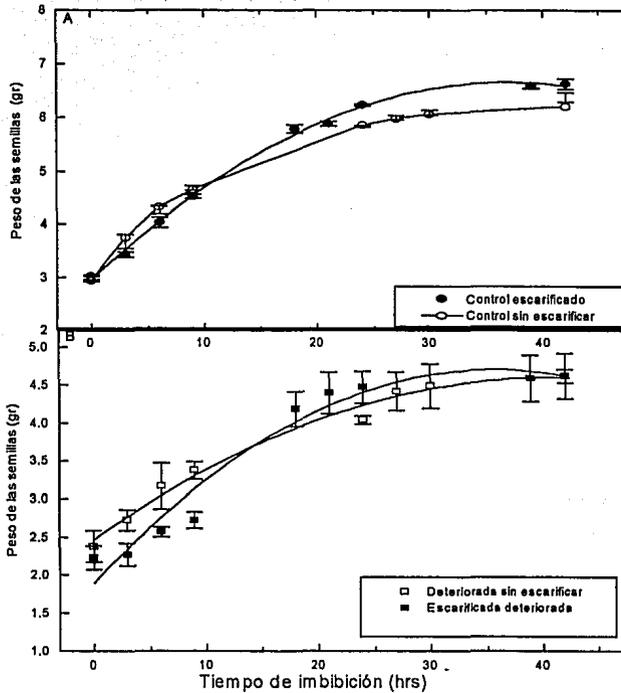


Fig. 6.- Efecto de la testa en las características de imbibición de la semilla; (A).- Grupo control sin escarificar ($R = 0.99$), control escarificada ($R = 0.98$). (B).-Deterioradas no escarificadas ($R = 0.97$) y deteriorada escarificada ($R = 0.98$).

IV.4.- EFECTO DEL DETERIORO EN EL CONTENIDO DE BIOMOLECULAS

IV. 4.1.-Azúcares

El mayor contenido de azúcares tanto en los ejes como en los cotiledones lo constituyeron los oligosacáridos de la familia de la rafinosa, seguido de la sacarosa (cuadro 6 y 7).

El almacenamiento de la semilla produjo un aumento en los niveles de monosacáridos (cuadro 5). En los ejes este aumento se detectó después de 1.5 meses de almacenamiento, mientras que en los cotiledones el aumento se inició en tiempos más tempranos de deterioro, siendo las diferencias significativas después de un mes de almacenamiento (cuadro 5).

Cuadro 5.- Contenido de monosacáridos presentes en frijol flor de mayo.

Tiempo de almacenamiento de las semillas (meses)	Monosacáridos % de Peso seco	
	Cotiledones [ⓐ]	Ejes [ⓑ]
0	0.4125 ± 0.062 ^A	0.460 ± 0.052 ^A
1.0	0.775 ± 0.15 ^A	0.395 ± 0.032 ^A
1.5	0.83 ± 0.18 ^B	0.397 ± 0.033 ^A
2.0	1.52 ± 0.24 ^C	0.723 ± 0.14 ^B
2.5	1.608 ± 0.12 ^D	0.931 ± 0.068 ^C

ⓐ.- Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes, con su desviación estandar.

ⓑ.- Números seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes a un $\alpha = 0.05$

ⓐ F= 5.81

ⓑ F= 25.36

Cuadro 6.- Contenido de sacarosa presentes en frijol flor de mayo.

Tiempo de almacenamiento de las semillas (meses)	Sacarosa % Peso seco	
	Cotiledones [ⓐ]	Ejes [ⓑ]
0	2.208 ± 0.278 ^A	3.0 ± 0.11 ^A
1.0	2.75 ± 0.140 ^B	2.65 ± 0.10 ^B
1.5	2.65 ± 0.550 ^B	2.21 ± 0.15 ^C
2.0	2.3 ± 0.100 ^B	2.24 ± 0.16 ^D
2.5	2.04 ± 0.163 ^C	2.05 ± 0.1 ^E

ⓐ.- Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes, con su desviación estandar.

ⓑ.- Números seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes a un $\alpha = 0.05$

ⓐ F= 22.75

ⓑ F= 25.76

Los niveles de sacarosa en los ejes disminuyeron rapida y significativamente durante el primer mes y medio de almacenamiento, a partir de

este tiempo el decremento se continua pero a una menor velocidad, mientras que en los cotiledones el efecto del almacenamiento en los niveles de sacarosa fue diferente y significativo ya que durante el primer mes de almacenamiento se observó un aumento rápido en el contenido de sacarosa (cuadro 6). Estos niveles se mantuvieron hasta los 2.0 meses de deterioro en que se detectó una disminución en los niveles de este azúcar.

El nivel de oligosacáridos de la familia de la rafinosa (cuadro 7), en los ejes disminuyó en forma rápida y significativa desde el primer mes de almacenamiento. Por su parte los cotiledones requirieron de dos meses de almacenamiento para disminuir los niveles de rafinosa y posteriormente los decrementos fueron menores pero significativos.

Cuadro 7- Contenido de oligosacáridos de la familia de la rafinosa presentes en frijol flor de mayo.

Tiempo de almacenamiento de las semillas (meses)	Oligosacáridos % de Peso seco	
	Cotiledones ^❶	Ejes ^❷
0	13.70 ± 0.255 A	8.405 ± 0.970 a
1.0	13.42 ± 1.400 A	5.39 ± 1.250 b
1.5	11.70 ± 1.200 A	4.16 ± 0.612 c
2.0	8.71 ± 0.399 B	3.12 ± 0.280 d
2.5	6.45 ± 1.05 C	2.98 ± 0.132 e

❶.- Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes, con su desviación estandar.

❷.- Números seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes a un $\alpha = 0.05$

❶ F= 28.03

❷ F =20.85

Se ha sugerido que en las semillas los azúcares desempeñan un papel protector contra su deterioro en almacén. Especialmente la sacarosa y los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (9, 10), Con el fin de demostrar si en frijol estos azúcares desempeñan un papel similar se graficó la relación rafinosa / sacarosa de los ejes vs. la viabilidad (fig. 9 A), así como la relación rafinosa / sacarosa presente en los cotiledones vs. T_{50} (fig. 9 B). (Modelo, fuerza de dependencia)

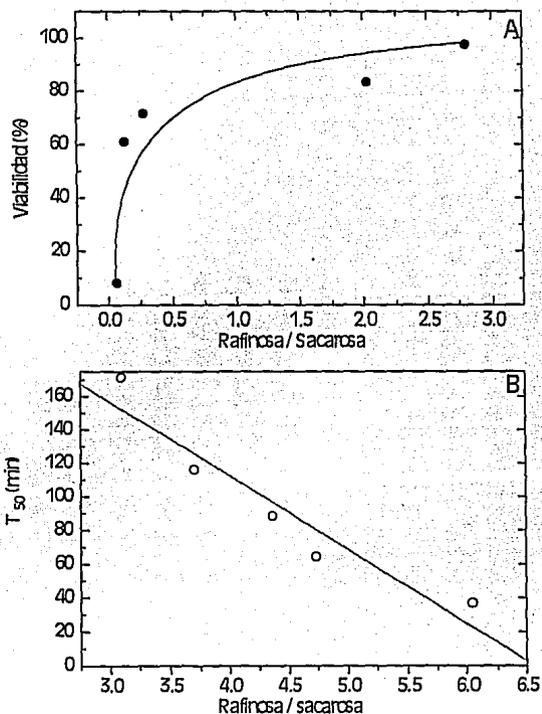


Fig. 7.- Relación aparente entre; la proporción rafinosa / sacarosa y viabilidad, A ($R = 0.89$). En la fig. B con el T_{50} de las semillas de frijol ($R = - 0.952$).

Aparentemente tanto el fenómeno del endurecimiento como el del envejecimiento están asociados a la relación de contenidos de rafinosa respecto de la sacarosa.

IV. 4.-2.-Proteínas.

Las proteínas de las semillas se han clasificado, extraído y caracterizado tomando en cuenta su solubilidad. De esta forma tenemos a las Albuminas (Proteínas solubles en agua), las Globulinas (Proteínas solubles en solución salina), las Prolaminas (Proteínas solubles en álcalis diluidos y en soluciones alcohólicas).

salina), las Prolaminas (Proteínas solubles en álcalis diluidos y en soluciones alcohólicas).

Aproximadamente el 60% de las proteínas de frijol son globulinas y se extraen generalmente de la semillas completas, de los cotiledones o de los ejes con soluciones de cloruro de sodio (16). El contenido total de proteínas fue mayor en eje embrionario (cuadro 8 columna 4) que en cotiledones cuadro 9 columna 4. Esta diferencia se debió a que la fracción extraída con alta fuerza iónica y mercaptoetanol, y que de aquí en adelante llamaré proteínas (-SH -), fue mayor en eje embrionario que en cotiledones (cuadro 8 y 9), mientras que la fracción de globulinas fue muy semejante en eje embrionario y en cotiledones.

Cuadro 8 Efecto del almacenamiento en la solubilidad de proteínas del eje embrionario.

Tiempo de almacenamiento (meses)	Globulinas ① (mg/g ps)	Proteína (-S H-) (mg/g ps)	ProteínaTOTAL ② (mg/ ps)
0	265.5 ± 2.61 ^a	428.90	694.00 ± 80.8 ^d
1.0	246.33 ± 8.51 ^a	274.60	521.00 ± 26.10 ^a
1.5	212.00 ± 8.8 ^b	293.00	505.00 ± 38.10 ^d
2.0	180.00 ± 6.71 ^c	210.5	390.50 ± 30.4 ^g
2.5	167.30 ± 10.8 ^c	176.00	343.30 ± 49.39 ^g

□- Los valores representan la media de tres experimentos independientes ± desviación estandar.

□- Los valores seguidos de letras diferentes son significativos a un $\alpha = 0.05$

①.- Proteína soluble en cloruro de sodio 0.17 M (F= 84.54)

②.- Proteína soluble en cloruro de sodio 0.85 M y 0.34 % de β mercapto etanol. (F = 28.22)

El almacenamiento disminuyó la solubilidad de las proteínas totales tanto en cotiledones como en el eje embrionario (ver columna 4 del cuadro 8 y la del cuadro 9). En ambos casos esta disminución fue significativamente diferente desde el primer mes de deterioro. En los cotiledones esta disminución se debió a que la fracción de las globulinas decreció en mayor proporción que las proteínas (-SH-), mientras que en el eje embrionario la solubilidad de ambas fracciones disminuyó en forma paralela.

Cuadro 9.-Efecto de almacenamiento en la solubilidad de proteínas de cotiledón

Tiempo de almacenamiento (meses)	Globulinas (●) (mg/g ps)	Proteína (-SH-) (mg/g ps)	ProteínaTOTAL (⊙) (mg/g ps)
0	252.38 ± 7.87 ^a	66.12	318.50 ± 6.94 ^a
1.0	228.01 ± 2.70 ^b	70.52	298.53 ± 12.02 [†]
1.5	199.00 ± 9.36 ^c	63.80	262.80 ± 03.04 [‡]
2.0	N.D. ^c	N.D.	193.01 ± 03.37 ^h
2.5	117.88 ± 1.69 ^d	52.87	170.75 ± 04.94 [†]

□- Los valores representan la media de tres experimentos independientes ± desviación estandar.

□- Los valores seguidos de letras diferentes son significativos a un $\alpha = 0.05$

●.- Proteína soluble en cloruro de sodio 0.17 M (F = 201.96)

⊙.-Proteína soluble en cloruro de sodio 0.85 M y 0.34% de β mercapto etanol (F = 263.16).

Para el grupo control la actividad de lectinas expresada como el título de dilución fue similar en ambas estructuras de la semilla (fig. 8).

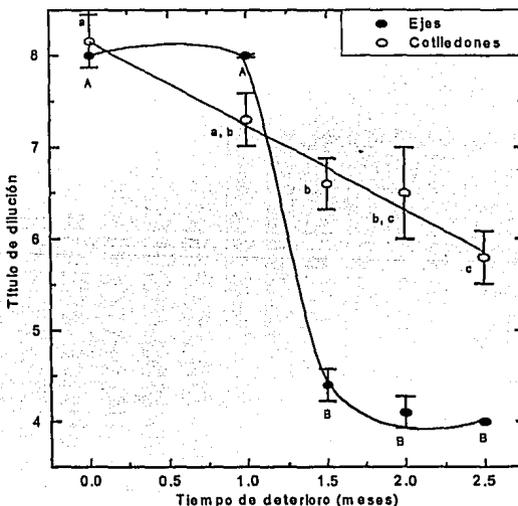


fig. 8.- Efecto del deterioro en el título de lectinas; Para los ejes el valor de R = 0.96, en los cotiledones el valor de R = 0.981. Puntos con letras similares indican que las diferencias son significativas a un $\alpha = 0.05$.

A medida que aumentó el tiempo de almacenamiento la actividad de las lectinas en los cotiledones disminuyó, esta disminución fue significativa a partir de 1.5 meses de deterioro ($F = 28.22$); a diferencia de lo observado en eje embrionario, donde la actividad de lectinas disminuyó de manera no significativa durante el primer mes de deterioro para luego disminuir abruptamente el valor de F en este caso fue de 9.08 (fig.- 8). Mayores tiempo de almacenamiento no afectan la actividad de lectinas del eje embrionario

IV. 4.-3.-Extracción de fenoles

La cantidad de taninos solubles en metanol o en metanol / agua , expresado como equivalentes de catequina presentes en la testa, disminuyó significativamente después de 1.5 meses de almacenamiento; A partir de este momento, la concentración de taninos continuó disminuyendo en forma proporcional al tiempo de almacenamiento (fig.- 9). La misma tendencia se observó en cotiledones.

La cantidad de taninos expresado como equivalentes de catequina solubles en metanol y agua (1:1) presentes en testa disminuyó en forma proporcional al tiempo de deterioro, durante las primeras 6 semanas de almacenamiento. Tiempos mayores de almacenamiento no modifican la solubilidad de estos compuestos (cuadro. 10) La misma tendencia se observó en el cotiledones

Cuadro 10.-Efecto del deterioro en la solubilidad de fenoles presentes en cotiledones, expresado como equivalentes de catequina.

Extracción	Control mg de catequina	1 mes mg de catequina	1,5 meses mg de catequina
Me:Me	5.8±.12	4.0±.16	1.3±.001
Me:Agua	3.0±.001	--	--

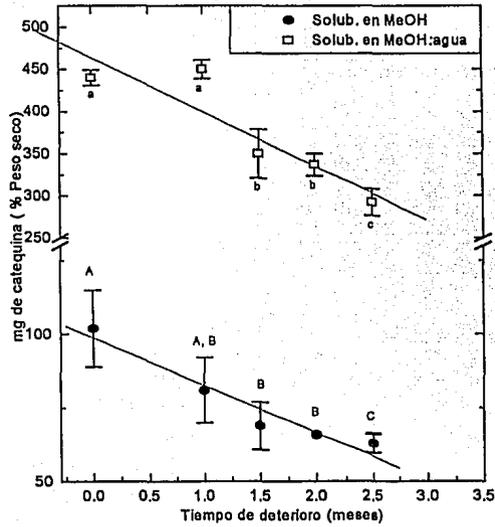


Fig. 9.- Efecto del deterioro en la solubilidad de fenoles presentes en testa solubles en metanol ($R = 0.94$) y en metanol - agua ($R = 0.97$). Puntos marcados con la misma letra indican que las diferencias no son significativas.

V.-DISCUSION

Debido a su importancia en el campo de la productividad agrícola, así como en el uso y procesamiento de productos agronómicos y el de la nutrición, la sensibilidad al deterioro de semillas ha sido ampliamente estudiada por agrónomos, fisiólogos y productores de granos y semillas.

Existen amplias y muy bien documentadas revisiones (7, 36, 39, 70) acerca del deterioro de semillas en las que el consenso general es el hecho de que el almacenamiento de granos y semillas en condiciones de alta temperatura y humedad relativa disminuyen notablemente la calidad integral de la semilla. Sin embargo la sensibilidad al deterioro varía enormemente entre géneros y aún entre cultivares de las mismas especies (70), lo que sugiere que algunas variedades tienen en sus semillas un mecanismo de protección contra el envejecimiento.

Aparentemente el sistema membranal constituye la estructura celular más sensible al deterioro (71), aunque la función de otras estructuras, tales como: la pared celular, las mitocondrias, los ribosomas etc. (32, 72), y macromoléculas como el ADN y las proteínas (7), también se dañan durante el deterioro por lo que el mecanismo de protección de la semilla en el almacén debe ser adecuado para brindar estabilidad a estas estructuras sensibles.

Las semillas secas contienen grandes cantidades de carbohidratos solubles, en el caso del frijol estos son principalmente sacarosa (3.5 - 4%) y los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (aproximadamente 14%); se ha propuesto que estos polialcoholes juegan un papel esencial en proteger el estado seco de la semilla (73).

La evidencia de que los azúcares contribuyen a la estabilidad del estado seco de la semilla provienen de estudios realizados tanto en sistemas in vivo como in vitro (74, 75, 76). Como corolario de estos trabajos se han propuesto dos

mecanismos por los cuales los azúcares estarían realizando esta función protectora; 1) Formación de un puente de hidrógeno entre los grupos oxhidrilos y la cabeza polar del fosfolípido de la membrana estabilizando la estructura lamelar. Cuando la semilla se hidrata esta interacción se realiza con moléculas de agua. Además, estos azúcares también preservan la actividad de enzimas deshidratadas (77).

2) Inducen y mantienen el estado vitrificado del citoplasma. Se ha demostrado que en la semilla fresca su citoplasma se encuentra en estado vítreo. Un vidrio es un líquido de muy alta viscosidad, tal que detiene las reacciones químicas que requieren difusión molecular y a través de estas características podría estar involucrado en la conservación funcional de estructuras celulares y macromoléculas en el estado seco de la semilla (73, 78, 79).

Con el propósito de investigar si efectivamente los azúcares participan en el mecanismo de protección de la calidad integral de la semilla, analizamos los cambios en la composición de azúcares solubles en el eje y en los cotiledones, a medida que la semilla se va deteriorando.

El contenido de humedad de la semilla de frijol almacenada a alta temperatura y HR se incrementó a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento (fig. 5) A los 30 días de almacenamiento, éste incremento fue muy pequeño menos del 1%, a este mismo tiempo de deterioro tanto la calidad culinaria, como la agrícola, disminuyeron en forma discreta pero significativa (fig. 4 y cuadro 2). Por ejemplo el T_{50} aumentó significativamente desde el primer mes de almacenamiento, mientras que el peso seco acumulado por la radícula decreció en un 42% y la talla del tallo en un 37%, sin embargo la viabilidad de la semilla a estos tiempos no está afectada. Esto sugiere que la calidad culinaria y por tanto la sensibilidad de los cotiledones al deterioro es mayor que la de los ejes embrionarios, ya que en estos solo el vigor, que depende de la interacción con el cotiledón se ve afectada, no así la viabilidad que depende solo de las características del eje embrionario. Para efectos de discusión de aquí en adelante solo se considerará la viabilidad como marcador de la sensibilidad del eje al deterioro y el T_{50} como

marcador de los cotiledones. Asociada a ésta pérdida de calidad, en la semilla almacenada por 4 semanas, se detectaron cambios pequeños en los niveles de azúcares, dependiendo del azúcar analizado y el tejido que se utilizó el cambio fue o no significativo.

En los cotiledones los contenidos de monosacáridos aumentaron pero no significativamente respecto a los presentes en las semillas sin deteriorar (cuadro 5), la sacarosa aumentó significativamente, durante el primer mes de almacenamiento, a partir de este tiempo su contenido disminuyó conforme aumentó el tiempo de almacenamiento; los oligosacáridos de la familia de la rafinosa también disminuyeron pero este decremento no fue significativo.

Los ejes por su parte mostraron que al mes de deterioro la cantidad de monosacáridos aumentó pero a este periodo de tiempo el incremento no fue significativo; el contenido de disacáridos así como la cantidad de oligosacáridos de la familia de la rafinosa disminuyeron en forma significativa (cuadros 5, 6 y 7).

Las características del estado vítreo: viscosidad, estabilidad y magnitud, están determinadas por su composición de azúcares y agua. La composición de azúcares en los cotiledones fue diferente de la de los ejes, por lo que es de esperarse que las características del estado vítreo de los cotiledones sean diferentes que las de los ejes y por lo tanto el nivel de protección que brindan al tejido será diferente. Esto se refleja en el hecho de que la sensibilidad al deterioro de cada una de las regiones de la semilla fue diferente. A nivel funcional esta diferencia se manifestó en el hecho de que la velocidad con la cual se incrementó el deterioro de los cotiledones, valorada como un aumento en el T_c fue mayor que la que presentaron los ejes, cuantificado como viabilidad. Así mismo los cambios en la proporción de azúcares y contenido de humedad de la semilla producidos durante el almacenamiento afectarían en forma negativa las características de dicho estado físico, lo que a su vez también se reflejaría como una disminución en el mecanismo de protección de la semilla de frijol. Esta última sugerencia se apoya en el hecho como se indicó anteriormente, de que una de las funciones del estado vítreo es la de evitar que se lleven a cabo reacciones deletéreas del tipo

de las aquí estudiadas, como son la lignificación en los cotiledones y testa, cuantificada como una disminución en la solubilidad de los taninos; la pérdida de la funcionalidad macromolecular, cuantificada como una disminución en la actividad de lectinas; y disminución en la solubilidad de proteínas.

La presencia franca de estas reacciones deletéreas se detectaron, tanto en eje como en cotiledones a partir después de las 4 semanas, tiempo al cual el contenido de humedad de la semilla almacenada se incrementó en forma exponencial respecto al tiempo de almacenamiento, hasta lograr a los dos meses equilibrarse con la A_w del ambiente (0.75) (fig. 5).

Considerando que las semillas secas contienen una cantidad de enzimas ya formadas cuya función está restringida por la actividad del agua presente en la semilla (a mayor contenido de humedad en la semilla mayor A_w) (80). Los resultados de este trabajo se pueden interpretar a la luz de una activación enzimática por un incremento en el contenido de humedad de la semilla almacenada o bien a la permisividad de la reacción por cambios en el estado físico de la semilla. La composición de azúcares de la semilla se modificó de manera significativa a partir de las 4 semanas de almacenamiento, coincidiendo con el tiempo de almacenamiento al cual las reacciones deletéreas aquí cuantificadas también se detectaron a este mismo tiempo de deterioro. Por ejemplo los procesos de insolubilización de proteínas ricas en cisteína y de fenoles podrían realizarse por la acción de radicales libres los cuales se ha demostrado que pueden formarse a contenidos de humedad de menos del 9% (81), siempre y cuando, el citoplasma de la semilla no se encuentre en estado vitrificado.

Mientras que para el cambio en composición de azúcares y pérdida de actividad de lectinas se tiene que invocar la presencia de glucosidasas las cuales se activarán a contenidos de humedad en el rango de 9 - 11%. (81). Estas condiciones son las prevalecientes durante el primer mes de almacenamiento. Cualquiera que sea el mecanismo que conduzca a los cambios de composición química de la semilla, el cambio por se indica que después de 30 días de

almacenamiento el mecanismo de protección del estado seco de la semilla se ha disminuido en forma tal que permite el establecimiento de estas reacciones deletéreas, cuya velocidad, en algunos casos (pérdida de actividad de lectinas en ejes), aumenta a medida que el agua del sistema se va incrementando y se acumulan en magnitud tal que pueden ser fácilmente detectadas.

La pérdida del estado vítreo del citoplasma también se puede realizar por un aumento de temperatura y/o aumento del contenido de humedad (82).

Aparentemente tanto en el eje como en los cotiledones, el estado vítreo del citoplasma probablemente disminuyó, en forma más discreta en la primera región que en la segunda, durante las primeras cuatro semanas de almacenamiento. Lo que se reflejó en que el tiempo de cocción (T_c) aumentase en forma significativa y la viabilidad no decreciese en forma importante. Lo anterior sugiere que si en ambos tejidos el citoplasma se encuentra en estado vítreo el del eje es más estable o de mayor magnitud que el de los cotiledones. A partir de las cuatro semanas el contenido de humedad de la semilla se incrementó de manera exponencial, lo que hace suponer que el estado vítreo del citoplasma se haya fundido por completo y que el aumento en contenido de humedad haya reducido la viscosidad del estado vítreo fundido, disminuyendo aún más la protección brindada al sistema.

Los datos de la fig. 7 en la cual se analiza la posible asociación entre envejecimiento y tiempo de cocción (endurecimiento de frijol) con la relación de rafinosa/sacarosa presente en cada parte de la semilla sugieren una correlación positiva entre calidad de la semilla y composición de azúcares.

Partiendo del análisis de correlación de todos los datos estudiados, se puede concluir (anexo 1), que los parámetros seleccionadas para este estudio todos muestran una alta correlación, los valores obtenidos apoyan las ideas citadas anteriormente.

VI CONCLUSION

En el transcurso de este trabajo se determinaron diferentes parámetros de envejecimiento y endurecimiento de la semilla de frijol, el análisis estadístico mostró que la velocidad a la que se deterioran los cotiledones fue mayor que la de los ejes. Por lo que se puede pensar que el proceso de endurecimiento de la semilla de frijol se inicia antes que el envejecimiento.

Ambos fenómenos están asociados a la relación rafinosa/sacrosa presente en cada región de la semilla. Esta relación disminuyó a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento sin embargo, en el caso de los cotiledones esta disminución fue proporcional al incremento en el tiempo de cocción, mientras que en el eje la relación refinosa/sacarosa presenta dos comportamientos. Por arriba de 0.5 la relación rafinosa/sacarosa disminuye más rápidamente que la viabilidad mientras que por abajo de 0.5, la viabilidad disminuye más rápidamente que la relación rafinosa/sacarosa.

Esto sugiere que en el eje además de los azúcares otras moléculas podrían estar protegiendo la estabilidad de las semillas.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.-**Bewley Derek J. and Black M.** (1986). Seeds Physiology of development and germination. Cap. 9. Seed and germination some agricultural and industrial aspects. Plenum Press, New York. pp. 329-347.
- 2.-**Roberts E. H.** (1972). Viability of Seeds. Syracuse University Press.
- 3.-**Sathé S.K., Desphande S.S. and Salunkha D.K.** (1984). Dry beans of *Phaseolus* a review. Part I: Chemical composition proteins C.R.C. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 20:1
- 4.-**Díaz de León, F.** (1989). Relación entre el grado de metilación de la pectina y el tiempo de cocción de algunas variedades de frijol. Tesis profesional. Facultad de Ciencias U.N.A.M.
- 5.-**Jones P.M.B. and Boutler D.** (1983). The cause of reduced cooking rate in *Phaseolus vulgaris* following adverse storage conditions. J. Food. Sci. 48: 623-628.
- 6.-**Burr H.K., Kon S. and Morris H.J.** (1968). Cooking rates of dry beans as influenced by moisture content and temperature and time of storage. Food Technol. 22:336-338.
- 7.-**Pristley D.** (1986). Seed aging, implications for seed storage and persistence in the soil. Cap. 3. Comstock Publishing Associates. A division of Cornell University Press. Ithaca and London.
- 8.-**Bernal-Lugo, I. Prado G., Parra C., Moreno E., Ramirez J., y Velazco O.** (1990). Phytic acid hydrolysis and bean susceptibility to storage induced hardening. J. Food Biochem. 14: 253-261.
- 9.-**Bernal-Lugo and Leopold A.** (1992). Changes in soluble carbohydrates during seed storage. Plant Physiol. 98: 1207-1210.
- 10.-**Leopold, A.** (1990). Coping with desiccation. Stress responses in plants: Adaptation and acclimation mechanism. pp. 37-56.
- 11.-**Burke M.** (1986). The glass state survival of the anhydrous biological systems. In Leopold, C. (ed): "Membranes, Metabolism and Dry Organism." Ithaca: Cornell University Press. pp. 358-363.
- 12.-**Koster K.L. and Leopold, A.** (1988). Sugars in relation to desiccation tolerance in seeds. Plants Physiol 88:829-832.
- 13.-**Khan A.A.** (1982). The Physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination. Elsevier Biomedical Press
- 14.-**Esau K.** (1977). Anatomy of seed plants. 2nd ed John Wiley and Sons New York. Printed in the United States of America.
- 15.-**Roos E.E.** (1982). The Physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination. Elsevier Biomedical Press.
- 16.-**Hall T. C., Sun S.M., Ma G., McLeester R.C., Pyne J.W, Bliss F.A.** (1979). The major storage protein of French bean seeds: characterization in vivo and translation in vivo. En "The Plant Seed, development, preservation and germination". I. Rubenstein, R.L. Phillips, C.E., Green and B.G. Gengenbach (Ed) p 3- 30 Academic Press New york.

- 17.-**Nathan S. and Halina I.** (1972). Lectins: Cell-Agglutinating and sugar-specific proteins. Science vol. 177, No. 4053 pp. 949-959.
- 18.-**Jaff, W.G.** (1980). Hemagglutinins (Lectins) Cap. 3. En toxic constituents of plant foodstuffs, I. E. Liener (Ed), pp. 73-79. Academic Press New York. N.Y.
- 19.-**Reddy N.R., Sathe S. K. and Salunkhe D.H.** (1982). Phytase in legumes and cereals. Adv. Food Res. 28:1-91.
- 20.-**Bernal-Lugo, I. Castillo A., Diaz de León F., Moreno E. y Ramirez J.** (1991). Does phytic acid influence cooking rate in common beans. J. Food Biochem 15: 367-374.
- 21.-**Castillo.A.** (1990). Participación del ácido fitico, pectinas y proteínas en la velocidad de cocción del grano de frijol. Tesis Enep Iztacala. UNAM.
- 22.-**Lethan, D.S.** (1962) Separation of cell wall with hexametaphosphate and nature of the intracellular bonding. Cell Research 27: 352-357.
- 23.-**Haslam, E.** (1981) Vegetable tannins, in Biochemistry of plants. A comprehensive treatise (Ed) Stumpf, P. K. y Conn, E. Vol.7 Academic Press.
- 24.-**Ortega, D.M. y Rodriguez C. Consuelo** (1979) Estudio de azúcares solubles en semillas de frijol (Phaseolus vulgaris L.) Agrociencia Chapingo. México No. 37.
- 25.-**Guevara Lara F.** (1987). Estudios sobre la biosíntesis de proteínas de reserva y lectinas en frijol común (Phaseolus vulgaris). Tesis de maestría. Irapuato Gto. México.
- 26.-**Sgarbieri V.C. and Whitaker** (1982). Physical chemical, and nutritional properties of common bean (Phaseolus) proteins: Advances in Food Research. 28:93-155.
- 27.-**Jaffé W.G. y Brucher. D.** (1983). The cause of reduced cooking rate in Phaseolus vulgaris following adverse storage conditions. J. Food Sci. 48:623-628.
- 28.-**Puszati A., Clarke E.M.W., King T. P. y Stewaert J.C.** (1979). Nutritional evaluation of kidney beans (Phaseolus vulgaris) Chemical composition, lectin content and nutritional value of select cultivares. J. Food Sci. 44.
- 29.-**Sgarbieri V.C., Antunes P.L. y Almeida L.D.** (1979). Nutritional evaluation of four variedades of beans (Phaseolus vulgaris). J. Food Sci. 44: 1306
- 30.-**Ramos G.R.** (1985). Alimentación normal en niños y adolescentes. Ed. El manual moderno. México. 307-314.
- 31.-**Gupta Y.P.** (1987). Anti-nutritional and toxic factors in food legumes: a review. Plant Foods for Human Nutrition 37:201-228.
- 32.-**Shomer I., Paster N., Lindner P. and Vasiliver R.** (1990). The role of cell wall structure in the hard-to-cook phenomenon in beans (Phaseolus vulgaris L.). Food Struct. 9:139-149.
- 33.-**Garcia-Vela L.A. y Stanley D.W.** (1989). Protein denaturation and starch gelatinization in hard to cook beans. J. Food Sci. 54:1284-1286-1292.
- 34.-**Shah J.** (1966). Radiation-induced calcium release and its relation to post irradiation textural changes in fruit and vegetables. Nature 211-341-346.

- 35.-**Loh J. y Breene W.** (1982). Between-species differences in fracturability loss: comparison of the thermal behavior of pectic and cell wall substances in potato and chinese water chesnut. *J. Text. Studies.* 13: 381-397.
- 36.-**Bernal-Lugo I.** (1993) Cuadernos de posgrado. Departamento de Bioquímica vegetal. (En prensa)
- 37.-**Burr H. K., Kon S., y Morris H. J.** (1968). Cooking rates of dry beans as influenced by moisture content and temperature and time of storage. *Food Technol.* 22:336-338.
- 38.-**Esquivel R. M.** (1984). Estudios sobre el endurecimiento del frijol almacenado. Tesis Facultad profesional Facultad de Ciencias UNAM.
- 39.-**Jackson G.M. and Varriano-Marston** (1981). Hard to cook phenomenon in beans, effects of accelerated storage on water absorption and cooking time. *J. Food Sci.* 46:799-803.
- 40.-**Stanley D. W., and Aguilera J.M.** (1985). A review of textural defects in cooked reconstituted legumes the influence of structure and composition. *J. Food Biochem* 9:277-323.
- 41.-**Varriano-Marston F. and Jackson G.M.** (1981). Hard to-cook phenomenon in beans: structural changes during storage and imbibition. *J. Food Sci.* 46:1379-1385.
- 42.-**Hincks M. J. and Stanley D.W.** (1986). Multiple mechanisms of bean hardening. *J. Food Tech.* 21:731-750.
- 43.-**Aguilera J. M., Hav M. I. and Villablanca W.** (1986). The effect of solar drying heating on the hardness of phaseolus beans during storage. *J. Stored Prod. Res.* 22(4):243-247.
- 44.-**Elias I. G., García A. y Bressani R.** (1981). Características tecnológicas y nutricionales de cultivares criollos de frijol común (*Ph. vulgaris*) provenientes de 8 regiones de Guatemala productores de frijol. Informe anual del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. (I.N.C.A.P.) 1. I 31-XII-1980. Guatemala. 5-8.
- 45.-**Molina M.R., Baten M.A., Gomez Brenes R.A., King R.W. y Bressani R.** (1976). Heat treatment: A process to control the development of the hard to cook phenomenon in black beans (*Phaseolus vulgaris*) *J. Food Sci.* 41:661-666.
- 46.-**Gough B.M. and Pybus S.N.** (1973). Effect of metal cations on the swelling and gelatinization behavior of large wheat starch granules. *Die Starke* 25: 123-130.
- 47.-**Kohyama K. and Nishinari K.** (1991). Effect of soluble sugars on gelatinization and retrogradation of sweet potato starch. *J. Agric. Food Chem* 39:1406-1410.
- 48.-**Valle- Vega P., Nieto Villalobos Z., Alvarez-Rios J., Verdejo-Cross V., y Bernal-Lugo I.** (1990). Efectos del envejecimiento acelerado sobre factores antinutricionales en frijol (*Phaseolus vulgaris*) *Ciencia e Tecnología de Alimentos.* 10:1-22.
- 49.-**Harman G.E., and Mattick L.R.** (1976). Association of lipid oxidation with seed ageing and death. *Nature.* (lond.)260:323-324

- 50.-Byrd H. W. and J. C. Delouche (1971). Deterioration of soybean seed in storage. Pro. Assoc. off. Seed Anal. 61:41-87.
- 51.-Woostock L. W. (1973). Physiological and biochemical test for seed vigor. Seed Sci Tecnol. 1:57-127.
- 52.-Douglas J.E. (1975). In cereal seed technology; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome. 87-107.
- 53.-Mc Donald M.B. (1976). Proc Assoc. of seed anal 65: 109-120
- 54.- Wilson, D.O. and M. B. Mc. Donald (1986) The lipid peroxidation model of seed aging. Seed Sci. Technol.
- 55.-Dawidowicz G. y Podstolski F. (1992). Age related changes in the ultrastructure and membrane properties of *Brassica napus* L. seed. Ann. Bot. 69:39-46.
- 56.-Basavarajapp, B.S.,Shety H.S., Prakash H.S. (1991). Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize. Seed Sci y Technol. 19:279-286.
- 57.-Mead J. F. (1976). Free radical mechanisms of lipids damage and consequences for cellular membranes. En free radicals in Biology ed. W.A. P y Or). Vol 1: 51-68.
58. -Beneditti A., Comparti M., y Esterbaver H.(1972). Identification of 4 hidroxinoneal as cytotoxic product originativa from peroxidation of liver microsomal lipids.Biochimica et Biophysica Acta 620:281-296.
- 59.-Funes J y Karel M. (1981). "Lipids" 16: 347
- 60.-Yamaguchi T.y Yamoshita Y. (1979). Mutagenic activity of autoxidated linolenic and linoleic acid. J. Agri. Biol. Chem. 43:2225-2226
- 61.-Cerami A. Vlassara H. (1987). Glucose and aging. Sci. Amer 256: 90-97
- 62.-Wetlaufer S.H. and Leopold A. (1991). Relevance of Amadori and Mailard products to seed deterioration. Plant Physiol. 97:165-169.
63. Díaz de León F., Capella S., Carballo A., Leopold C., and Bernal-Lugo. (1992). Soluble sugar composition influences seed storage behavior. 99:116
- 64.- Moreno E. (1984). Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología UNAM.
- 65.-Lowry O.H., Rosebroug N.J. , Farr A.L. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- 66.- Liener I. E. (1976). Phytohemagglutinins.. Ann. Rev. Plant Physiol. 27: 291-
- 67.-Lis H. and Sharon N. (1981). Lectin in higher plants. Cap. 10 in " The Biochemistry of Plants". Vol. 6 Proteins and nucleic acid. A. Marcus, Pk. Stumpf y E.E. Conn (ed). p 371. Academic Press New York.
- 68.-Jaffe,W.G., Levey A. and González D.I. (1974). Isolation and partial characterization of beans phytohemagglutinins. Phytochemistry 13:2685-2893
- 69.-Pierce M.L., Van Scoyoc S., and Butter L.G. (1978). A critical evaluation of the vainillin as an assay for tannin in sorghum grain. J. Agric. Food Chem. 26:1214-1218.
- 70.-Cuauhtemoc Reyes- Moreno and Octavio Paredes- López. (1993). Hard-to-cook phenomenon in common beans. A Critical Review in Food Science and Nutrition. 33;(3)227-286

- 71.-**Herter V., Burris J:S.** (1989).Evaluation drying injury on corn seed with a conductivity test. *Seed Sci. y Technol.* 17:625-638.
- 72.-**Bourne M:C:** (1972) Texture measurement of individual cooke dry beans by the puncture text. *J. Food Sci.* 37:751-753.
- 73.-**Leopold A.C; Brun F. and Williams R.J.** (1992). Water in dry organisms. pp. 161-169 in Somero, G.N., Osmond C.B. and Bolis C.L. (eds) *Water and life.* Berlin Springer Verlag.
- 74.-**Hoekstra, F.A.; and Roekel T.V.** (1988) Desiccation tolerance of *Papaver dubium* L. pollen during its development in the anther. Possible role of phospholipid composition and sucrose content. *Plant Physiol.* 88:626-632.
- 75.-**Clegg J:S:** (1986). The physical properties and metabolic status of *Artemia* cysts at low water contents. pp. 169.187. In A.C. Leopold (ed.) *Membrane, metabolism, and dry organism.* Comstock Press. Ithaca, NY:
- 76.-**Koster K.L. and Leopold.** (1988). Sugar and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 88:829-832.
- 77.-**Carpenter J.F., Crowe J.H.** (1988).Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation cryobiology. 25:459-470.
- 78.-**Brunni, F.L., Leopold, A.C.** (1991) Glass transitions in soybean seed relevance to anhydrous biology. *Plant Physiol.* 96:660-663.
- 79.-**Wnnq San, T.C. Irving and A.C.Leopold.** (1994). The role of seed, vitrification and membrane, phase transition in seed desiccation tolerance. 90:621-628.
- 79.-**Labuza T.P.**(1980). The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Food Technol.* 34:36-59.
- 80.-**Drapon R.**(1985). Enzyme activity as a function of water activity . In D Simator, J.L.Mutton, eds, *Properties of water in Foods.* Martinus Nijhoff, The Hague, the Netherlands, pp. 171-190.
- 81.-**Slade Louise and Levine Harry.** (1991). Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assesment of food quality and safety. *Food Science and Nutrition. Critical Reviews* 30 (2-3):115-360.

ANEXO

Variable independiente:
tiempo

Variables dependientes:

V_1 = peso seco tallo

V_2 = peso seco radícula

V_3 = viabilidad

V_4 = sacarosa en cotiledones

V_5 = monosacáridos en cotiledones

V_6 = rafinosa en cotiledones

V_7 = globulinas en cotiledones

V_8 = proteínas totales en cotiledones

V_9 = títulos de lectinas en cotiledones

V_{10} = proteínas totales en ejes

V_{11} = globulinas en ejes

V_{12} = talla radícula

V_{13} = talla talluelo

V_{14} = contenido de humedad

V_{15} = rafinosa en ejes

V_{16} = sacarosa en ejes

V_{17} = monosacáridos en ejes

V_{18} = fenoles en cotiledones (MeOH)

V_{19} = fenoles en testa (MeOH:H₂O)

V_{20} = fenol en testa (MeOH)

V_{21} = T_{100}

V_{22} = T_{50}

V_{23} = títulos de lectinas en ejes

General Linear Models Procedure
 Class Level Information

Class	Levels	Values
T	5	0 1 2 3 4

Number of observations in data set = 15

Group	Obs	Dependent Variables
1	15	V1 V2 V3 V4 V5 V6 V7 V8 V9 V10 V11 V12 V13 V14 V15 V16 V17 V19 V20 V22 V23
2	9	V18
3	12	V21

General Linear Models Procedure
 Dependent Variable Information

NOTE: Variables in each group are consistent with respect to the presence or absence of missing values.

Dependent Variable: V1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.01858440	0.00464610	36.49	0.0001
Error	10	0.00127333	0.00012733		
Corrected Total	14	0.01985773			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V1 Mean	
	0.935877	15.27645	0.011284	0.07386667	

Dependent Variable: V1

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	0.01858440	0.00464610	36.49	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	0.01858440	0.00464610	36.49	0.0001

Dependent Variable: V2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.00078401	0.00019600	22.55	0.0001
Error	10	0.00008692	0.00000869		
Corrected Total	14	0.00087093			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V2 Mean	
	0.900199	26.10584	0.002948	0.01129333	

Dependent Variable: V2

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	0.00078401	0.00019600	22.55	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	0.00078401	0.00019600	22.55	0.0001

Dependent Variable: V3

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	14258.00933	3564.50233	65.67	0.0001
Error	10	542.82000	54.28200		
Corrected Total	14	14800.82933			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V3 Mean	
	0.963325	11.63433	7.367632	63.3266667	

Dependent Variable: V3

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	14258.00933	3564.50233	65.67	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	14258.00933	3564.50233	65.67	0.0001

Dependent Variable: V4

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	4.31729333	1.07932333	27.75	0.0001
Error	10	0.38900000	0.03890000		
Corrected Total	14	4.70629333			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V4 Mean	
	0.917345	7.366689	0.197231	2.67733333	

Dependent Variable: V4

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	4.31729333	1.07932333	27.75	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	4.31729333	1.07932333	27.75	0.0001

Dependent Variable: V5

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	2.01761707	0.50440427	5.81	0.0111
Error	10	0.86863267	0.08686327		
Corrected Total	14	2.88624973			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V5 Mean	
	0.699045	30.71766	0.294726	0.95946667	

Dependent Variable: V5

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	2.01761707	0.50440427	5.81	0.0111
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	2.01761707	0.50440427	5.81	0.0111

Dependent Variable: V6

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	109.8384267	27.4596067	28.03	0.0001
Error	10	9.7979333	0.9797933		
Corrected Total	14	119.6363600			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V6 Mean	

	0.918102	9.459529	0.989845	10.4640000	
Dependent Variable: V6					
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	109.8334267	27.4596067	28.03	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	109.8334267	27.4596067	28.03	0.0001

Dependent Variable: V7

		Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Source	DF				
Model	4	31647.77333	7911.94333	201.96	0.0001
Error	10	391.76667	39.17667		
Corrected Total	14	32039.54000			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V7 Mean	
	0.987772	3.199963	6.259127	195.600000	

Dependent Variable: V7

		Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Source	DF				
T	4	31647.77333	7911.94333	201.96	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	31647.77333	7911.94333	201.96	0.0001

Dependent Variable: V8

		Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Source	DF				
Model	4	50192.55067	12548.13767	263.16	0.0001
Error	10	476.82667	47.68267		
Corrected Total	14	50669.37733			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V8 Mean	
	0.990589	2.776395	6.905264	248.713333	

Dependent Variable: V8

		Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Source	DF				
T	4	50192.55067	12548.13767	263.16	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	50192.55067	12548.13767	263.16	0.0001

Dependent Variable: V9

		Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Source	DF				
Model	4	10.16666667	2.541666667	21.79	0.0001
Error	10	1.166666667	0.116666667		
Corrected Total	14	11.33333333			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V9 Mean	
	0.897059	4.998513	0.341565	6.83333333	

Dependent Variable: V9

		Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Source	DF				
T	4	10.16666667	2.541666667	21.79	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	10.16666667	2.541666667	21.79	0.0001

Dependent Variable: V10

		Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Source	DF				
Model	4	221267.8493	55316.9623	28.22	0.0001

Error	10	19599.5200	1959.9520		
Corrected Total	14	240867.3693			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V10 Mean	
	0.918629	8.979867	44.27135	493.006667	

Dependent Variable: V10

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	221267.8493	55316.9623	28.22	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	221267.8493	55316.9623	28.22	0.0001

Dependent Variable: V11

		Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Source	DF				
Model	4	21692.00933	5423.00233	84.54	0.0001
Error	10	641.50000	64.15000		
Corrected Total	14	22333.50933			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V11 Mean	
	0.971276	3.730378	8.009370	214.706667	

Dependent Variable: V11

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	21692.00933	5423.00233	84.54	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	21692.00933	5423.00233	84.54	0.0001

Dependent Variable: V12

		Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Source	DF				
Model	4	220.9133333	55.2283333	19.32	0.0001
Error	10	28.5800000	2.8580000		
Corrected Total	14	249.4933333			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V12 Mean	
	0.865448	15.18469	1.690562	11.1333333	

Dependent Variable: V12

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	220.9133333	55.2283333	19.32	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	220.9133333	55.2283333	19.32	0.0001

Dependent Variable: V13

		Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Source	DF				
Model	4	618.5046000	154.6261500	74.25	0.0001
Error	10	20.8245333	2.0824533		
Corrected Total	14	639.3291333			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V13 Mean	
	0.967428	8.721218	1.443071	16.5466667	

Dependent Variable: V13

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	618.5046000	154.6261500	74.25	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	618.5046000	154.6261500	74.25	0.0001

Dependent Variable: V14

Sum of Mean

Source	DF	Squares	Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.04917507	0.01229377	587.28	0.0001
Error	10	0.00020933	0.00002093		
Corrected Total	14	0.04938440			

R-Square 0.995761 C.V. 3.116687 Root MSE 0.004575 V14 Mean 0.14680000

Dependent Variable: V14

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	0.04917507	0.01229377	587.28	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	0.04917507	0.01229377	587.28	0.0001

Dependent Variable: V15

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	53.35622667	13.33905667	20.85	0.0001
Error	10	6.39826667	0.63982667		
Corrected Total	14	59.75449333			
R-Square		C.V.	Root MSE	V15 Mean	
0.892924		15.99570	0.799892	5.00066667	

Dependent Variable: V15

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	53.35622667	13.33905667	20.85	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	53.35622667	13.33905667	20.85	0.0001

Dependent Variable: V16

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	1.88516000	0.47129000	25.76	0.0001
Error	10	0.18293333	0.01829333		
Corrected Total	14	2.06809333			
R-Square		C.V.	Root MSE	V16 Mean	
0.911545		5.572076	0.135253	2.42733333	

Dependent Variable: V16

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	1.88516000	0.47129000	25.76	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	1.88516000	0.47129000	25.76	0.0001

Dependent Variable: V17

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.56031627	0.14007907	25.36	0.0001
Error	10	0.05523533	0.00552353		
Corrected Total	14	0.61555160			
R-Square		C.V.	Root MSE	V17 Mean	
0.910267		12.97948	0.074320	0.57260000	

Dependent Variable: V17

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	0.56031627	0.14007907	25.36	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	0.56031627	0.14007907	25.36	0.0001

Dependent Variable: V19

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	8534.266667	2133.566667	25.26	0.0001
Error	10	844.666667	84.466667		
Corrected Total	14	9378.933333			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V19 Mean	
	0.909940	13.30682	9.190575	69.0666667	

Dependent Variable: V19

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	8534.266667	2133.566667	25.26	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	8534.266667	2133.566667	25.26	0.0001

Dependent Variable: V20

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	67100.93333	16775.23333	58.53	0.0001
Error	10	2866.00000	286.60000		
Corrected Total	14	69966.93333			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V20 Mean	
	0.959038	4.477852	16.92926	378.066667	

Dependent Variable: V20

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	67100.93333	16775.23333	58.53	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	67100.93333	16775.23333	58.53	0.0001

Dependent Variable: V22

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	35880.61733	8970.15433	101.34	0.0001
Error	10	885.16000	88.51600		
Corrected Total	14	36765.77733			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V22 Mean	
	0.975924	9.640963	9.408294	97.5866667	

Dependent Variable: V22

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	35880.61733	8970.15433	101.34	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	35880.61733	8970.15433	101.34	0.0001

Dependent Variable: V23

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	38.73066667	9.68266667	9.08	0.0023
Error	10	10.66666667	1.06666667		
Corrected Total	14	49.39733333			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V23 Mean	
	0.784064	18.93879	1.032796	5.45333333	

Dependent Variable: V23

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	38.73066667	9.68266667	9.08	0.0023
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	4	38.73066667	9.68266667	9.08	0.0023

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V1

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 0.000127
 Critical Value of Studentized Range= 4.654
 Minimum Significant Difference= 0.0303

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	0.11700	3	0
A			
B	0.09867	3	1
B			
B	0.07700	3	2
C			
C	0.06267	3	3
D			
D	0.01400	3	4

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V2

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 8.692E-6
 Critical Value of Studentized Range= 4.654
 Minimum Significant Difference= 0.0079

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	0.02400	3	0
B			
B	0.01167	3	1
B			
B	0.01167	3	2
B			
B	0.00670	3	3
C			
C	0.00243	3	4

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V3

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 54.282
 Critical Value of Studentized Range= 4.654
 Minimum Significant Difference= 19.799

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	96.667	3	0
A			
A	83.433	3	1
B			
B			
B	70.400	3	2 1.5
C			
C	59.100	3	3 2
D	7.033	3	4 2.5

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V4

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 0.0389
 Critical Value of Studentized Range= 4.654
 Minimum Significant Difference= 0.53

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	3.617	3	0
B			
B	2.767	3	1
B			
B	2.663	3	2
B			
B	2.300	3	3
C			
C			
C	2.040	3	4

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V5

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 0.086863

Critical Value of Studentized Range= 4.654
Minimum Significant Difference= 0.792

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	1.397	3	4
A			
A	1.341	3	3
A			
B	0.863	3	2
B			
B	0.780	3	1
B			
B	0.417	3	0

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V6

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWO.

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 0.979793
Critical Value of Studentized Range= 4.654
Minimum Significant Difference= 2.66

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	13.350	3	0
A			
A	12.930	3	1
A			
A	11.333	3	2
B			
B	8.377	3	3
B			
B	6.330	3	4

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V7

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWO.

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 39.17667
Critical Value of Studentized Range= 4.654
Minimum Significant Difference= 16.82

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
----------------	------	---	---

C	6.333	3 2
C		
C	5.833	3 4

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V10

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 1959.952
 Critical Value of Studentized Range= 4.654
 Minimum Significant Difference= 118.97

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N T
A	697.53	3 0
B	521.83	3 1
B		
C	505.10	3 2
C		
C	D	390.60 3 3
	D	
	D	349.97 3 4

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V11

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 64.15
 Critical Value of Studentized Range= 4.654
 Minimum Significant Difference= 21.523

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N T
A	267.567	3 0
A		
A	246.333	3 1
B	212.000	3 2
C	180.333	3 3
C		
C	167.300	3 4

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V12

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 2.858
 Critical Value of Studentized Range= 4.654
 Minimum Significant Difference= 4.5429

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	15.267	3	0
A			
B	13.400	3	1
B			
B	11.033	3	2
B			
B	10.267	3	3
C	4.700	3	4

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V13

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 2.082453

Critical Value of Studentized Range= 4.654.

Minimum Significant Difference= 3.8779

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	27.443	3	0
B	17.423	3	1
B			
B	16.367	3	2
B			
B	13.867	3	3
C	7.633	3	4

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V14

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 0.000021

Critical Value of Studentized Range= 4.654

Minimum Significant Difference= 0.0123

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	0.24000	3	4
B	0.17900	3	3
C	0.13533	3	2
D	0.09467	3	1
D			
D	0.08500	3	0

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V15
 Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 0.639827
 Critical Value of Studentized Range= 4.654
 Minimum Significant Difference= 2.1495

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	8.420	3	0
B	5.390	3	1
C	4.400	3	2
C	3.863	3	3
C	2.930	3	4

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V16
 Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 0.018293
 Critical Value of Studentized Range= 4.654
 Minimum Significant Difference= 0.3635

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	3.013	3	0
A	2.650	3	1
B	2.213	3	2
B	2.210	3	3
B	2.050	3	4

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V17
 Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 0.005524
 Critical Value of Studentized Range= 4.654
 Minimum Significant Difference= 0.1997

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	0.8900	3	4
A	0.6983	3	3
B	0.4807	3	0

B		
B	0.4040	3 2
B		
B	0.3900	3 1

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V19
 Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 84.46667
 Critical Value of Studentized Range= 4.654
 Minimum Significant Difference= 24.697

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	102.000	3	0
A			
B A	81.000	3	2
B			
B	67.333	3	1
B			
B	66.000	3	3
B			
C	29.000	3	4

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V20
 Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 286.6
 Critical Value of Studentized Range= 4.654
 Minimum Significant Difference= 45.493

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	468.33	3	1
A			
A	443.33	3	0
B			
B	351.67	3	2
B			
C B	335.00	3	3
C			
C	292.00	3	4

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V22
 Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 88.516
 Critical Value of Studentized Range= 4.654
 Minimum Significant Difference= 25.282

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	180.500	3	4
B	116.500	3	3
C	88.333	3	2
C	64.667	3	1
D	37.933	3	0

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V23
 Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 1.066667
 Critical Value of Studentized Range= 4.654
 Minimum Significant Difference= 2.7754

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	8.000	3	0
A			
B A	6.667	3	1
B			
B	4.600	3	2
B			
B	4.000	3	3
B			
B	4.000	3	4

Dependent Variable: V18

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	31.05555556	15.52777778	11.65	0.0086
Error	6	8.00000000	1.33333333		
Corrected Total	8	39.05555556			
	R-Square	C.V.	Root MSE	V18 Mean	
	0.795164	30.56560	1.154701	3.77777778	

Dependent Variable: V18

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	2	31.05555556	15.52777778	11.65	0.0086
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	2	31.05555556	15.52777778	11.65	0.0086

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V18
 Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 1.333333
 Critical Value of Studentized Range= 4.339
 Minimum Significant Difference= 2.8929

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	5.833	3	0
B	4.167	3	1
B	1.333	3	2

Dependent Variable: V21

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	41112.91667	13704.30556	115.00	0.0001
Error	8	953.33333	119.16667		
Corrected Total	11	42066.25000			
	R-Square	C.V.	Root MSE		V21 Mean
	0.977337	7.515558	10.91635		145.250000

Dependent Variable: V21

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	3	41112.91667	13704.30556	115.00	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	3	41112.91667	13704.30556	115.00	0.0001

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: V21

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGW.

Alpha= 0.05 df= 8 MSE= 119.1667
 Critical Value of Studentized Range= 4.529
 Minimum Significant Difference= 28.545

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	233.000	3	3
B	154.333	3	2
C	121.667	3	1
D	72.000	3	0

CORRELATION ANALYSIS

23 'VAR' Variables:	V1	V2	V3	V4	V5	V6
	V7	V8	V9	V10	V11	V12
	V13	V14	V15	V16	V17	V18

V19 V20 V21 V22 V23

CORRELATION ANALYSIS

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum
V1	15	0.07367	0.03766	1.10800
V2	15	0.01129	0.00789	0.16940
V3	15	63.32667	32.51464	949.90000
V4	15	2.67733	0.57980	40.16000
V5	15	0.95947	0.45405	14.39200
V6	15	10.46400	2.92326	156.96000
V7	15	195.60000	47.83867	2934
V8	15	248.71333	60.16013	3731
V9	15	6.83333	0.89974	102.50000
V10	15	493.00667	131.16712	7395
V11	15	214.70667	39.94059	3221
V12	15	11.13333	4.22149	167.00000
V13	15	16.54667	6.75769	248.20000
V14	15	0.14680	0.05939	2.20200
V15	15	5.00067	2.06596	75.01000
V16	15	2.42733	0.38434	36.41000
V17	15	0.57260	0.20969	8.58900
V18	9	3.77778	2.20951	34.00000
V19	15	69.06667	25.88289	1036
V20	15	378.06667	70.69397	5671
V21	12	145.25000	61.84015	1743
V22	15	97.58667	51.24575	1464
V23	15	5.45333	1.87840	81.80000

Simple Statistics

Variable	Minimum	Maximum
V1	0.01000	0.12700
V2	0.00220	0.02400
V3	6.30000	100.00000
V4	1.87000	4.00000
V5	0.35500	1.80000
V6	5.65000	13.86000
V7	116.40000	261.40000
V8	165.00000	326.50000
V9	5.50000	8.50000
V10	322.80000	787.70000
V11	155.40000	270.50000
V12	4.30000	19.00000
V13	6.90000	28.17000
V14	0.08400	0.24800
V15	2.77000	9.34000
V16	1.95000	3.17000
V17	0.36000	0.93000
V18	1.00000	7.00000

V19	27.00000	117.00000
V20	277.00000	475.00000
V21	70.00000	249.00000
V22	30.50000	189.00000
V23	4.00000	8.00000

CORRELATION ANALYSIS

Pearson Correlation Coefficients / Prob > |R| under Ho: Rho=0
/ Number of Observations

	V1	V2	V3	V4	V5	V6
V1	1.00000 0.0 15	0.87780 0.0001 15	0.91597 0.0001 15	0.82129 0.0002 15	-0.78048 0.0006 15	0.90219 0.0001 15
V2	0.87780 0.0001 15	1.00000 0.0 15	0.76047 0.0010 15	0.92866 0.0001 15	-0.82033 0.0002 15	0.81474 0.0002 15
V3	0.91597 0.0001 15	0.76047 0.0010 15	1.00000 0.0 15	0.80251 0.0003 15	-0.63111 0.0116 15	0.89553 0.0001 15
V4	0.82129 0.0002 15	0.92866 0.0001 15	0.80251 0.0003 15	1.00000 0.0 15	-0.79475 0.0004 15	0.82551 0.0002 15
V5	-0.78048 0.0006 15	-0.82033 0.0002 15	-0.63111 0.0116 15	-0.79475 0.0004 15	1.00000 0.0 15	-0.72321 0.0023 15
V6	0.90219 0.0001 15	0.81474 0.0002 15	0.89553 0.0001 15	0.82551 0.0002 15	-0.72321 0.0023 15	1.00000 0.0 15
V7	0.95155 0.0001 15	0.84894 0.0001 15	0.97689 0.0001 15	0.87262 0.0001 15	-0.72425 0.0023 15	0.93804 0.0001 15
V8	0.90826 0.0001 15	0.84754 0.0001 15	0.88573 0.0001 15	0.87632 0.0001 15	-0.79180 0.0004 15	0.96707 0.0001 15
V9	0.85723 0.0001 15	0.84180 0.0001 15	0.75621 0.0011 15	0.81447 0.0002 15	-0.78835 0.0005 15	0.71899 0.0025 15
V10	0.85005 0.0001 15	0.89990 0.0001 15	0.78925 0.0005 15	0.89930 0.0001 15	-0.84589 0.0001 15	0.80290 0.0003 15

V11	0.86153 0.0001 15	0.86055 0.0001 15	0.86719 0.0001 15	0.88499 0.0001 15	-0.78824 0.0005 15	0.92367 0.0001 15
V12	0.93945 0.0001 15	0.82063 0.0002 15	0.87916 0.0001 15	0.79423 0.0004 15	-0.71349 0.0028 15	0.83952 0.0001 15
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
V13	0.88292 0.0001 15	0.92654 0.0001 15	0.84940 0.0001 15	0.93134 0.0001 15	-0.82647 0.0001 15	0.78852 0.0005 15
V14	-0.95060 0.0001 15	-0.81670 0.0002 15	-0.95647 0.0001 15	-0.83622 0.0001 15	0.77146 0.0008 15	-0.95845 0.0001 15
V15	0.78823 0.0005 15	0.89992 0.0001 15	0.77520 0.0007 15	0.95616 0.0001 15	-0.65343 0.0082 15	0.81078 0.0002 15
V16	0.84236 0.0001 15	0.84634 0.0001 15	0.76167 0.0010 15	0.87833 0.0001 15	-0.77236 0.0007 15	0.76986 0.0008 15
V17	-0.81557 0.0002 15	-0.62054 0.0136 15	-0.77994 0.0006 15	-0.59134 0.0202 15	0.74835 0.0013 15	-0.80985 0.0003 15
V18	0.82239 0.0065 9	0.75412 0.0189 9	0.82762 0.0059 9	0.78892 0.0115 9	-0.51142 0.1594 9	0.80523 0.0088 9
V19	0.82091 0.0002 15	0.83876 0.0001 15	0.89951 0.0001 15	0.86315 0.0001 15	-0.59470 0.0194 15	0.83099 0.0001 15
V20	0.84670 0.0001 15	0.70567 0.0033 15	0.83636 0.0001 15	0.74372 0.0015 15	-0.65544 0.0080 15	0.91070 0.0001 15
V21	-0.86687 0.0003 12	-0.81243 0.0013 12	-0.83205 0.0008 12	-0.85674 0.0004 12	0.87134 0.0002 12	-0.84316 0.0006 12
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
V22	-0.97196 0.0001 15	-0.85578 0.0001 15	-0.94045 0.0001 15	-0.85478 0.0001 15	0.83492 0.0001 15	-0.90075 0.0001 15

V23	0.69093 0.0043 15	0.70778 0.0032 15	0.69212 0.0042 15	0.74952 0.0013 15	-0.73384 0.0018 15	0.67909 0.0054 15
	V7	V8	V9	V10	V11	V12
V1	0.95155 0.0001 15	0.90826 0.0001 15	0.85723 0.0001 15	0.85005 0.0001 15	0.88153 0.0001 15	0.93945 0.0001 15
V2	0.84894 0.0001 15	0.84754 0.0001 15	0.84180 0.0001 15	0.89990 0.0001 15	0.86055 0.0001 15	0.82063 0.0002 15
V3	0.97689 0.0001 15	0.88573 0.0001 15	0.75621 0.0011 15	0.78925 0.0005 15	0.86719 0.0001 15	0.87916 0.0001 15
V4	0.87262 0.0001 15	0.87632 0.0001 15	0.81447 0.0002 15	0.89930 0.0001 15	0.88499 0.0001 15	0.79423 0.0004 15
V5	-0.72425 0.0023 15	-0.79180 0.0004 15	-0.78835 0.0005 15	-0.84589 0.0001 15	-0.78824 0.0005 15	-0.71349 0.0028 15
V6	0.93804 0.0001 15	0.96707 0.0001 15	0.71899 0.0025 15	0.80290 0.0003 15	0.92367 0.0001 15	0.83952 0.0001 15
V7	1.00000 0.0 15	0.93814 0.0001 15	0.83531 0.0001 15	0.84697 0.0001 15	0.92776 0.0001 15	0.91414 0.0001 15
V8	0.93814 0.0001 15	1.00000 0.0 15	0.80495 0.0003 15	0.88031 0.0001 15	0.96781 0.0001 15	0.85881 0.0001 15
V9	0.83531 0.0001 15	0.80495 0.0003 15	1.00000 0.0 15	0.84751 0.0001 15	0.84877 0.0001 15	0.85347 0.0001 15
V10	0.84697 0.0001 15	0.88031 0.0001 15	0.84751 0.0001 15	1.00000 0.0 15	0.88682 0.0001 15	0.80052 0.0003 15
V11	0.92776 0.0001 15	0.96781 0.0001 15	0.84877 0.0001 15	0.88682 0.0001 15	1.00000 0.0 15	0.85506 0.0001 15
V12	0.91414 0.0001 15	0.85881 0.0001 15	0.85347 0.0001 15	0.80052 0.0003 15	0.85506 0.0001 15	1.00000 0.0 15

V13	0.90571 0.0001 15	0.85784 0.0001 15	0.91506 0.0001 15	0.93279 0.0001 15	0.88012 0.0001 15	0.88263 0.0001 15
V14	-0.97936 0.0001 15	-0.96965 0.0001 15	-0.82072 0.0002 15	-0.84935 0.0001 15	-0.94760 0.0001 15	-0.89991 0.0001 15
V15	0.85330 0.0001 15	0.84061 0.0001 15	0.78705 0.0005 15	0.85042 0.0001 15	0.87636 0.0001 15	0.80536 0.0003 15
	V7	V8	V9	V10	V11	V12
V16	0.82834 0.0001 15	0.83734 0.0001 15	0.88165 0.0001 15	0.88615 0.0001 15	0.90113 0.0001 15	0.82748 0.0001 15
V17	-0.79425 0.0004 15	-0.82701 0.0001 15	-0.63701 0.0107 15	-0.68585 0.0048 15	-0.73055 0.0020 15	-0.76350 0.0009 15
V18	0.92838 0.0003 9	0.95507 0.0001 9	0.75054 0.0198 9	0.54936 0.1255 9	0.87605 0.0020 9	0.77489 0.0142 9
V19	0.90023 0.0001 15	0.80235 0.0003 15	0.65076 0.0086 15	0.77630 0.0007 15	0.77176 0.0008 15	0.78490 0.0005 15
V20	0.89743 0.0001 15	0.90779 0.0001 15	0.78179 0.0006 15	0.73595 0.0018 15	0.92263 0.0001 15	0.79735 0.0004 15
V21	-0.91221 0.0001 12	-0.95615 0.0001 12	-0.81325 0.0013 12	-0.91232 0.0001 12	-0.94601 0.0001 12	-0.77770 0.0029 12
V22	-0.96842 0.0001 15	-0.92760 0.0001 15	-0.87371 0.0001 15	-0.87265 0.0001 15	-0.90447 0.0001 15	-0.93366 0.0001 15
V23	0.74788 0.0013 15	0.77533 0.0007 15	0.86359 0.0001 15	0.81790 0.0002 15	0.83572 0.0001 15	0.61211 0.0153 15
	V13	V14	V15	V16	V17	V18
V1	0.88292 0.0001 15	-0.95060 0.0001 15	0.78823 0.0005 15	0.84236 0.0001 15	-0.81557 0.0002 15	0.82239 0.0065 9

V2	0.92654 0.0001 15	-0.81670 0.0002 15	0.89992 0.0001 15	0.84634 0.0001 15	-0.62054 0.0136 15	0.75412 0.0189 9
V3	0.84940 0.0001 15	-0.95647 0.0001 15	0.77520 0.0007 15	0.76167 0.0010 15	-0.77994 0.0006 15	0.82762 0.0059 9
V4	0.93134 0.0001 15	-0.83622 0.0001 15	0.95616 0.0001 15	0.87833 0.0001 15	-0.59134 0.0202 15	0.78892 0.0115 9
V5	-0.82647 0.0001 15	0.77146 0.0008 15	-0.65343 0.0082 15	-0.77236 0.0007 15	0.74835 0.0013 15	-0.51142 0.1594 9
V6	0.78852 0.0005 15	-0.95845 0.0001 15	0.81078 0.0002 15	0.76986 0.0008 15	-0.80985 0.0003 15	0.80523 0.0088 9
V7	0.90571 0.0001 15	-0.97936 0.0001 15	0.85330 0.0001 15	0.82834 0.0001 15	-0.79425 0.0004 15	0.92838 0.0003 9
V8	0.85784 0.0001 15	-0.96965 0.0001 15	0.84061 0.0001 15	0.83734 0.0001 15	-0.82701 0.0001 15	0.95507 0.0001 9
V9	0.91506 0.0001 15	-0.82072 0.0002 15	0.78705 0.0005 15	0.88165 0.0001 15	-0.63701 0.0107 15	0.75054 0.0198 9
V10	0.93279 0.0001 15	-0.84935 0.0001 15	0.85042 0.0001 15	0.88615 0.0001 15	-0.68585 0.0048 15	0.54936 0.1255 9
V11	0.88012 0.0001 15	-0.94760 0.0001 15	0.87636 0.0001 15	0.90113 0.0001 15	-0.73055 0.0020 15	0.87605 0.0020 9
V12	0.88263 0.0001 15	-0.89991 0.0001 15	0.80536 0.0003 15	0.82748 0.0001 15	-0.76350 0.0009 15	0.77489 0.0142 9
	V13	V14	V15	V16	V17	V18
V13	1.00000 0.0 15	-0.86666 0.0001 15	0.88411 0.0001 15	0.86213 0.0001 15	-0.69198 0.0043 15	0.70044 0.0356 9
V14	-0.86666 0.0001	1.00000 0.0	-0.79430 0.0004	-0.82886 0.0001	0.86206 0.0001	-0.86139 0.0028

	15	15	15	15	15	9
V15	0.88411 0.0001 15	-0.79430 0.0004 15	1.00000 0.0 15	0.87901 0.0001 15	-0.48073 0.0697 15	0.89370 0.0012 9
V16	0.86213 0.0001 15	-0.82886 0.0001 15	0.87901 0.0001 15	1.00000 0.0 15	-0.53128 0.0415 15	0.82110 0.0067 9
V17	-0.69198 0.0043 15	0.86206 0.0001 15	-0.48073 0.0697 15	-0.53128 0.0415 15	1.00000 0.0 15	0.69534 0.0376 9
V18	0.70044 0.0356 9	-0.86139 0.0028 9	0.89370 0.0012 9	0.82110 0.0067 9	0.69534 0.0376 9	1.00000 0.0 9
V19	0.85873 0.0001 15	-0.82940 0.0001 15	0.83906 0.0001 15	0.65866 0.0076 15	-0.64115 0.0100 15	0.51735 0.1537 9
V20	0.73486 0.0018 15	-0.91649 0.0001 15	0.76992 0.0008 15	0.81895 0.0002 15	-0.70096 0.0036 15	0.78387 0.0124 9
V21	-0.86873 0.0002 12	0.95441 0.0001 12	-0.77239 0.0032 12	-0.83713 0.0007 12	0.67912 0.0152 12	-0.78180 0.0128 9
	V13	V14	V15	V16	V17	V18
V22	-0.92444 0.0001 15	0.97259 0.0001 15	-0.78604 0.0005 15	-0.83371 0.0001 15	0.86562 0.0001 15	-0.77617 0.0139 9
V23	0.79873 0.0004 15	-0.76103 0.0010 15	0.68665 0.0047 15	0.79429 0.0004 15	-0.54540 0.0355 15	0.48281 0.1880 9

	V19	V20	V21	V22	V23
V1	0.82091 0.0002 15	0.84670 0.0001 15	-0.86687 0.0003 12	-0.97196 0.0001 15	0.69093 0.0043 15
V2	0.83876 0.0001 15	0.70567 0.0033 15	-0.81243 0.0013 12	-0.85578 0.0001 15	0.70778 0.0032 15
V3	0.89951 0.0001 15	0.83636 0.0001 15	-0.83205 0.0008 12	-0.94045 0.0001 15	0.69212 0.0042 15
V4	0.86315 0.0001 15	0.74372 0.0015 15	-0.85674 0.0004 12	-0.85478 0.0001 15	0.74952 0.0013 15
V5	-0.59470 0.0194 15	-0.65544 0.0080 15	0.87134 0.0002 12	0.83492 0.0001 15	-0.73384 0.0018 15
V6	0.83099 0.0001 15	0.91070 0.0001 15	-0.84316 0.0006 12	-0.90075 0.0001 15	0.67909 0.0054 15
V7	0.90023 0.0001 15	0.89743 0.0001 15	-0.91221 0.0001 12	-0.96842 0.0001 15	0.74788 0.0013 15
V8	0.80235 0.0003 15	0.90779 0.0001 15	-0.95615 0.0001 12	-0.92760 0.0001 15	0.77533 0.0007 15
V9	0.65076 0.0086 15	0.78179 0.0006 15	-0.81325 0.0013 12	-0.87371 0.0001 15	0.86359 0.0001 15
V10	0.77630 0.0007 15	0.73595 0.0018 15	-0.91232 0.0001 12	-0.87265 0.0001 15	0.81790 0.0002 15
V11	0.77176 0.0008 15	0.92263 0.0001 15	-0.94601 0.0001 12	-0.90447 0.0001 15	0.83572 0.0001 15
V12	0.78490 0.0005 15	0.79735 0.0004 15	-0.77770 0.0029 12	-0.93366 0.0001 15	0.61211 0.0153 15

V13	0.85873 0.0001 15	0.73486 0.0018 15	-0.85873 0.0002 12	-0.92444 0.0001 15	0.79873 0.0004 15
V14	-0.82940 0.0001 15	-0.91649 0.0001 15	0.95441 0.0001 12	0.97259 0.0001 15	-0.76103 0.0010 15
V15	0.83906 0.0001 15	0.76992 0.0008 15	-0.77239 0.0032 12	-0.78604 0.0005 15	0.68665 0.0047 15
V16	0.65866 0.0076 15	0.81895 0.0002 15	-0.83713 0.0007 12	-0.83371 0.0001 15	0.79429 0.0004 15
V17	-0.64115 0.0100 15	-0.70096 0.0036 15	0.67912 0.0152 12	0.86562 0.0001 15	-0.54540 0.0355 15
V18	0.51735 0.1537 9	0.78387 0.0124 9	-0.78180 0.0128 9	-0.77617 0.0139 9	0.48281 0.1880 9
V19	1.00000 0.0 15	0.66191 0.0072 15	-0.58228 0.0470 12	-0.84013 0.0001 15	0.57025 0.0264 15
V20	0.66191 0.0072 15	1.00000 0.0 15	-0.75623 0.0044 12	-0.84472 0.0001 15	0.76981 0.0008 15
V21	-0.58228 0.0470 12	-0.75623 0.0044 12	1.00000 0.0 12	0.97822 0.0001 12	-0.81812 0.0011 12
V22	-0.84013 0.0001 15	-0.84472 0.0001 15	0.97822 0.0001 12	1.00000 0.0 15	-0.75479 0.0011 15
V23	0.57025 0.0264 15	0.76981 0.0008 15	-0.81812 0.0011 12	-0.75479 0.0011 15	1.00000 0.0 15