

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**“RELACION ENTRE LOS NIVELES DE ACIDOS GRASOS INSATURADOS Y LA  
VIABILIDAD EN SEMILLAS DE *Hechtia podantha* y *Beaucarnea gracilis* DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO ACELERADO”**

**TESIS**

**que para obtener el título de**

**BIOLOGO**

**Presenta**

**ZAVALETA PASTOR MARITZA**

**Director de Tesis: M. en C. CESAR MATEO FLORES ORTIZ**

**Los Reyes Iztacala, Estado de México**

**Agosto de 2003**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

## **DEDICADA A**

Mi uki (mamá), por permitirme estar en este mundo tan increíble. Nunca encontraría la forma de agradecerte, por estar ahí y por que no, también cuando no lo estuviste. Pero sobre todo por creer en mi cuando pasaron esos momentos, en los que ni yo misma creía en mi. Hoy y siempre serás mi ejemplo a seguir.

A mi padre, pues siempre he estado consciente que de todo se aprende. Aún en los momentos más difíciles de nuestra vida.

A Jenny (o Guille) por ser mi hermana, por saber escuchar y al mismo callar en los momentos precisos. A Luis por hacer mi vida tan insoportable, tan enriquecedora y para que te acuerdes, quien te enseñó a ver fútbol. A Edgar, por que no he conocido a una persona mas tierna que tu y sabes que es lo mejor, que eres mi hermano.

A mis abuelitas Juanita y Juanita, por su enorme sabiduría.

A toda mi familia.

## **AGRADEZCO**

Al M. en C. Cesar Mateo Flores Ortiz, por ser como diría él: “una finísima persona”. Pero sobre todo por compartir sus conocimientos y no solo los académicos, durante prácticamente toda mi carrera. Con toda la sinceridad que puedo expresar “gracias maestro”.

A la M. en C. Josefina Vázquez Medrano, pues aunque nunca se lo haya dicho, pienso que el ser más noble y extraordinario, que sabe dar sin esperar nunca algo a cambio. Al Dr. Ignacio Peñalosa Castro por brindar su ayuda y conocimientos en “todo momento”.

Al M. en C. Rafael Quintanar Zúñiga, por ser tal cual es, ojala nunca cambie y comparta siempre su forma de ver la vida. Al Biol. Luis B. Hernández Portilla, por ser simplemente un “ser humano” en toda la extensión de la palabra. A la Biol. Margarita Moreno, pues sin duda sus pláticas siempre serán un deleite, así como su agudo sentido de ver las cosas, o no?

Al profesor Roberto Rico Moreno, pues aunque no lo conocí 25 años atrás, se que es de las personas más importantes, durante mi formación como estudiante de Biología. A Ana Lilia Muñoz Viveros, por sus grandes enseñanzas.

Al M. en C. Alberto Arriaga Cruz, no solo por haber sido mi sinodal, pues desde que lo conozco ha sido un excelente profesor, que comparte e invita a conocer el fascinante mundo de la Fisiología Vegetal.

Al Dr. Ricardo Mejia Zepeda, por la humildad que lo caracteriza y por que sin ser mi sinodal, apporto en gran medida para que yo aprendiera más sobre este trabajo.

A todos los grandes profesores de la carrera de Biología de la honorable FES Iztacala, pues sin sus conocimientos sería difícil llegar a momentos como este.

A ustedes chicas (por orden de estatura) Eda, Edith, Ivonne y Tere. Por todo lo compartido y por lo que viene aún. Por ser las personas mas obsesivas que he conocido y sobre todo por ser tannnnnnnn... “ñoñas”. A todos mis compañeros de la carrera y son tantos que no quiero escribir más, pues tendría que hacer una tesis sobre ellos y chicos ¡ya hice una!. Pero sepan que cada uno de ustedes contribuyo a que yo realizará este trabajo.

A la M. en C. Adelaida Ocampo y al Banco de Semillas de UBIPRO, por todas las facilidades brindadas para llevar a cabo este trabajo.

# ÍNDICE

	Página
<b>ABREVIATURAS</b> _____	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> _____	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> _____	<b>3</b>
Envejecimiento de semillas _____	3
Formación de radicales libres en semillas _____	4
Mecanismo de peroxidación de ácidos grasos insaturados _____	5
Detección de peroxidación lipídica _____	6
Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS) _____	7
<b>ANTECEDENTES</b> _____	<b>9</b>
<i>Hechtia podantha</i> _____	9
<i>Beaucarnea gracilis</i> _____	9
<b>HIPÓTESIS</b> _____	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS</b> _____	<b>13</b>
Objetivo General _____	13
Objetivos Particulares _____	13
<b>METODOLOGÍA</b> _____	<b>14</b>
Condiciones de germinación _____	14
Tratamientos de envejecimiento acelerado _____	14
Extracción y transesterificación de ácidos grasos en semillas _____	15
Análisis de ácidos grasos por GC-MS _____	16
Registro del espectro de Infrarrojo mediante NIRS _____	16
Modelo mediante el Quimiométrico (QUANT) _____	16
Determinación de la viabilidad de semillas, por la prueba de TTC. _____	17
Análisis estadísticos _____	17
<b>RESULTADOS</b> _____	<b>18</b>
<b>GC-MS y NIRS</b> _____	<b>18</b>

<b><i>Hechtia podantha</i></b> _____	<b>19</b>
Viabilidad _____	19
Tratamientos de envejecimiento acelerado _____	20
Tratamiento de envejecimiento acelerado seleccionado _____	22
Viabilidad y niveles de ácidos _____	23
NIRS y Quimiométrico (QUANT) _____	24
Viabilidad real vs estimada mediante NIRS _____	24
Contenido de ácidos grasos insaturados (GC-MS) vs estimados mediante NIRS _____	25
<b><i>Beaucarnea gracilis</i></b> _____	<b>27</b>
Viabilidad _____	27
Tratamientos de envejecimiento acelerado _____	28
Tratamiento de envejecimiento acelerado seleccionado _____	29
Viabilidad y niveles de ácidos grasos _____	30
NIRS y Quimiométrico (QUANT) _____	31
Viabilidad real vs estimada mediante NIRS _____	32
Contenido de ácidos grasos insaturados (GC-MS) vs estimados mediante NIRS _____	33
<b>DISCUSIÓN</b> _____	<b>35</b>
<b>CONCLUSIONES</b> _____	<b>40</b>
<b>APENDICE</b> _____	<b>41</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> _____	<b>45</b>

**ABREVIATURAS**

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
CA	Contenido de agua
GC-MS	Gas Chromatography Mas Espectrometry (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
HR	Humedad relativa
MDA	Malondialdeído
NIRS	Near Infrared Refractance Espectroscopy (Espectroscopia de refractancia en infrarrojo cercano)
PLS	Mínimos cuadrados parciales
QUANT	Quimiométrico
TMG	Tiempo medio de germinación
TTC	Cloruro 2,3,5 trifenil de tetrazolio
% G	Porcentaje de germinación

## RESUMEN

El envejecimiento de las semillas se manifiesta con una reducción en la viabilidad, tiempo medio de germinación (TMG), o con la producción de plántulas débiles. Entre los mecanismos que se han propuesto para explicar este proceso destaca la peroxidación de lípidos, la cual reduce los niveles de ácidos grasos insaturados. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó la concentración ácidos grasos insaturados durante la inducción de envejecimiento acelerado de semillas de *Hechtia podantha* y *Beaucarnea gracilis* mediante GC-MS, para generar un modelo quimiométrico de viabilidad mediante espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS). Semillas de *Hechtia podantha* y *Beaucarnea gracilis* pertenecientes al Banco de Semillas de especies silvestres de la UBIPRO FES-Iztacala, UNAM, fueron estudiadas con dos tratamientos de envejecimiento, 55°C-55% humedad relativa (HR) y 60°C-55% HR respectivamente, durante quince días. En las semillas de *Hechtia podantha* se registró un aumento de TMG de 4.55 a 18.5 días de germinación, disminución de la viabilidad de 96% a 1.33%, disminución de ácido: linoléico (11.50 a 0.26  $\mu\text{g/g}$ ) y oleico (29.68 a 0.52  $\mu\text{g/g}$ ). En las semillas de *Beaucarnea gracilis* se registró aumento de TMG de 5.7 a 28.4 días, reducción de viabilidad 98% a 3.33%, así como disminución de ácido linoléico (44.17 a 20.5  $\mu\text{g/g}$ ) y oleico (116.39 a 62.97  $\mu\text{g/g}$ ). En semillas de *Hechtia podantha* la relación entre GC-MS y NIRS encontrada fue para oleico  $r=0.33$ , linoléico  $r=0.5$  y germinación  $r=0.80$ . Por otro lado, la técnica de NIRS mostró valores altos de predicción de ácidos grasos y viabilidad en semillas de *Beaucarnea gracilis*, en la relación de GC-MS y NIRS para oleico  $r= 0.78$ , linoléico  $r= 0.77$  y germinación  $r=0.89$ . Considerando la variabilidad genética de las semillas y su condición silvestre; la técnica de NIRS se muestra como un método confiable y no destructivo para predecir la viabilidad de semillas en conservación de largo plazo.



## **INTRODUCCION**

Los Bancos de Semillas son la forma más efectiva de conservación *ex situ* de germoplasma, en los cuales se puede depositar un amplio rango de especies para su conservación por largos períodos de tiempo. Particularmente durante la conservación, los acervos de las semillas necesitan ser evaluados periódicamente. Una de las limitantes para llevarlo a cabo radica en la falta de conocimiento que se tiene de los procesos fisiológicos y bioquímicos de las semillas. Aunque han sido estudiados de manera paulatina, los mecanismos aún no son bien comprendidos, entre ellos el envejecimiento de las semillas, que se ha asociado a la peroxidación lipídica. Razón por lo cual debe evaluarse la viabilidad de las semillas, cabe mencionar que las técnicas generalmente empleadas requieren la disección del germoplasma, como la prueba de cloruro 2,3,5 trifenil de tetrazolio, actividades que progresivamente merman los acervos de las semillas. Por lo que una prueba que permita correlacionar algunos de los efectos de envejecimiento; como es la disminución de los ácidos grasos insaturados con la viabilidad de forma no destructiva, sería de mucha utilidad para analizar muestras de colecciones.

### **Envejecimiento de semillas**

El envejecimiento de las semillas, se manifiesta con una reducción en la capacidad de germinación o con la producción de plántulas débiles (Stewart y Bewley, 1980), se ha ligado a cambios en moléculas biológicamente activas del embrión y las principales modificaciones de esas moléculas pueden ser: sólo una variación en sus concentraciones o bien transformaciones químicas. A pesar de que los mecanismos del envejecimiento no son claros, este fenómeno ha sido asociado a: eventos estresantes, la conformación del ADN, del ARN, la estructura de lípidos y la funcionalidad de las membranas, junto con la capacidad de reparar ADN alterado o cambio en lípidos (Hendry, 1997). En este contexto se ha ubicado a los radicales libres como responsables del mecanismo causal de la pérdida de vigor o de la viabilidad principales características del envejecimiento en semillas.

Un radical libre es una especie química que posee electrones desapareados. Lo cual les confiere una gran reactividad por lo que pueden reaccionar con un gran número de moléculas en la célula, dando comúnmente como resultado la pérdida de la actividad biológica de estas últimas (Hendry, 1993).

### **Formación de radicales libres en semillas**

En tejidos que no sean semillas es aceptado que existen varias formas de generar especies de oxígeno activadas a través de la catálisis enzimática de peroxidasas, oxidasas y oxigenasas; mediante la fuga de electrones en el transcurso de la cadena de transferencia electrónica; por la ausencia o disminución de mecanismos de protección; debidos a antioxidantes constitutivos o actividad de enzimas tales como las peroxidasas y por reacciones de autoxidación donde el oxígeno reacciona con moléculas biológicas y se transforma a formas reducidas más reactivas. Hay evidencias que sugieren todas estas rutas como fuente de radicales libres en plántulas, en los últimos estadios de la germinación después de la imbibición y en la mayoría de las semillas recalcitrantes. Sin embargo, no es preciso si estas rutas están presentes y activas en semillas ortodoxas (Hendry, 1997).

El comportamiento de las semillas con respecto a su capacidad para deshidratarse y sus contenidos de radicales libres permite clasificarlas en dos grupos, ortodoxas y recalcitrantes. Las semillas ortodoxas pueden ser secadas a contenidos de humedad bajos (5% del peso fresco base) sin perder su viabilidad (Roberts y Ellis, 1989) y con bajas tasas de respiración, el papel de los radicales libres en la inducción de la mortandad en este tipo de semillas no es claro. Por otro lado, las semillas recalcitrantes, no pueden ser secadas debajo de un contenido de humedad crítico (40-50%) sin perder completamente su viabilidad. Se caracterizan por tener tasas de respiración significativas, en las cuales los radicales libres son generados en los ejes embrionarios posterior a la deshidratación (Hendry, 1997).

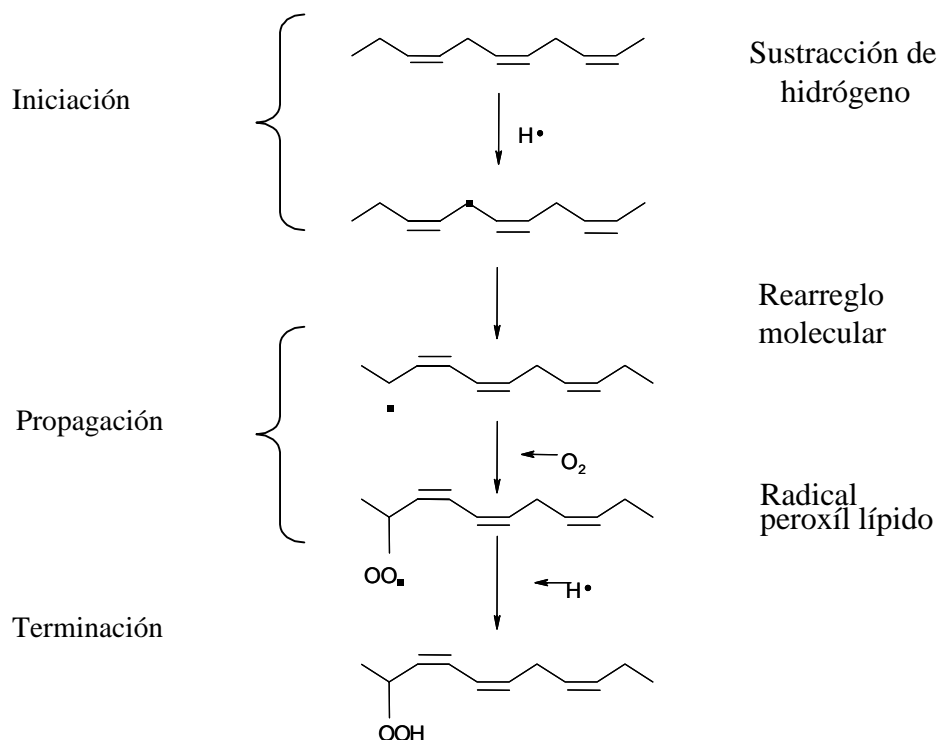
### **Mecanismo de peroxidación de ácidos grasos insaturados**

El oxígeno ha sido señalado como la principal fuente molecular de los radicales libres, causantes del envejecimiento, particularmente el radical superóxido ( $O_2\bullet$ ) y el anión peróxido ( $O_2^{2-}$ ), para lo cual se requiere de una fuente de electrones, un oxidante y un metal como el Hierro, por ejemplo, si el radical superóxido se combina con peróxido de hidrógeno se obtiene el radical hidroxilo ( $HO\bullet$ ) de particular importancia en Biología debido a que reacciona con la mayoría de las moléculas de los seres vivos, como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. El radical hidroxilo puede ser obtenido de manera directa por la reducción de peróxido de hidrógeno por Hierro (Hendry, 1993). En presencia de oxígeno las cadenas alifáticas de los ácidos grasos insaturados se oxidan espontáneamente produciendo radicales libres altamente reactivos llamados hidroperóxidos y una variedad de productos secundarios a partir de la descomposición de este último (Wilson y Mc Donald, 1986).

Las membranas biológicas representan un sitio clave para el daño directo a partir de peroxidación lipídica, ya que poseen una gran superficie y son usualmente más insaturadas que los lípidos de reserva (Ohlogge y Kernan, 1982), lo cual genera cambios en la permeabilidad de la membrana y la pérdida de su fluidez e integridad (Dell' Aquilla, 1994). La peroxidación lipídica es por lo tanto potencialmente dañina para las semillas en tres formas: por la destrucción de los lípidos membranales, por oxidación de radicales libres y por la formación de aldehídos citotóxicos que pueden inactivar proteínas (Wilson y Mc Donald, 1986).

Los ácidos grasos insaturados son más susceptibles al ataque por radicales libres, pues los hidrógenos unidos a los carbonos que forman el enlace doble podrían ser extraídos por un radical libre, generando como producto otro radical libre basado en el ácido graso, al cual se denomina hidroperóxido (Figura 1). El radical libre que sustrae al hidrógeno del ácido graso insaturado en la iniciación podría ser de naturaleza variada (el radical superóxido, el ión peróxido, el radical hidroxilo u otros), el radical libre orgánico formado durante la propagación podría formar otro

compuesto antes de reaccionar con otra molécula, finalmente en el proceso de terminación la naturaleza del radical implicado podría ser diferente, dando como resultado una gran variedad de productos (Wilson y Mc Donald, 1986).



**Figura 1.** Mecanismo de peroxidación de ácidos grasos insaturados (Tomado de Wilson y Mc Donald, 1986).

### Detección de peroxidación lipídica

Dado que la peroxidación de ácidos grasos durante el envejecimiento de semillas es de suma importancia, ya que afecta procesos vitales, se han implementado diversas técnicas para la detección de la peroxidación de ácidos grasos en semillas y tratar de correlacionarlos con el tiempo, ya sea de manera natural o por medio de la inducción del envejecimiento acelerado, principalmente por:

- La detección de ácidos grasos saturados e insaturados durante el envejecimiento utilizando GC-MS, GC- detector de ionización de flama (Harman y Mattic, 1976., Halistones y Smith, 1988., Pucacka, 1998).

- Detección de productos secundarios, como las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) Stewart y Bewley (1980).
- La presencia de radicales libres *in situ* con la prueba de spin por resonancia electrónica paramagnética (EPR). En particular con la prueba no destructiva de spin (Hepburn *et al*, 1986), se han estudiado los cambios de permeabilidad de membranas y en semillas íntegras envejecidas. Así mismo, se ha empleado esta técnica en diferentes estructuras de la semilla como testa y ejes embrionarios (Golovina *et al*, 1997., Khan *et al*, 1996).
- Detección de la permeabilidad de la membrana por el registro de la conductividad eléctrica después de la imbibición de las semillas. Se ha observado que la peroxidación lipídica en la membrana incrementa la filtración de compuestos iónicos de la misma (Halistones y Smith, 1991).
- Detección de la actividad enzimática. Este método es específico de enzimas encargadas de detoxificar a las células de especies de oxígeno activadas, como superóxido-dismutasa, lipoxigenasa y peroxidasas (Sacandé *et al*, 2000).

### **Espectroscopía de Refractancia en Infrarrojo Cercano (NIRS)**

La espectroscopía de infrarrojo emplea un rango de baja energía del espectro electromagnético. En particular, la región espectral del infrarrojo cercano se extiende desde el extremo superior de longitudes de onda visible, alrededor de 750 nm a 2 500 nm (13 000 a 4 000  $\text{cm}^{-1}$ ). Las bandas de absorción en esta zona son sobretonos y combinaciones de las bandas vibracionales de tensión fundamentales que se producen en la región de 3 000 a 1 700  $\text{cm}^{-1}$  (C-H, N-H, y O-H) (Stuart y Ando, 1997).

El uso más amplio de la técnica de NIRS ha sido la determinación de proteínas, humedad, almidón, lípidos y celulosa en productos agrícolas tales como granos y

semillas: Lo anterior ha sido posible gracias al uso de accesorios de reflectancia en el NIRS que permite el estudio de muestras con superficies opacas como las semillas y dado que el nivel de energía del rango de radiaciones del NIRS es muy bajo, es posible realizar estudios espectroscópicos sin afectar las estructuras ni la viabilidad de las semillas.

Por otro lado, la determinación de los niveles de organización biológicos y químicos mediante la técnica de NIRS, ha sido posible por el uso de softwares quimiométricos basados en algoritmos de correlación multivariada de mínimos cuadrados parciales (PLS) generando así una huella digital físicoquímica que permite realizar predicciones (Munck *et al*, 2001).

Es necesario mencionar que las ventajas que ofrecen los quimiométricos mediante la técnica de NIRS consisten en no requerir procesos elaborados en la extracción de analitos. Se emplean pequeñas cantidades de muestra y sobre todo la baja energía del rango electromagnético que se emplea permite realizar ensayos no destructivos de las semillas. La técnica de NIRS se ha empleado para el análisis no destructivo de los ácidos grasos en semillas provenientes de poblaciones domesticadas (Velasco *et al*, 1998), sin embargo, su aplicación en semillas silvestres asociado a la viabilidad es incipiente.

## ANTECEDENTES

Las dos especies que se estudian en este trabajo, *Hechtia podantha* y *Beaucarnea gracilis*, forman parte del acervo del Banco de Semillas de Especies Silvestres de la UBIPRO FES-Iztacala, UNAM. Ambas especies se consideran importantes componentes de la flora en sus zonas de distribución, la cual esta comprendida en la Región de Tehuacán-Cuicatlán.

### ***Hechtia podantha* Mez.**

Bromeliacea localizada en los municipios de Pachuca y Epazoyucan, en laderas con matorral xerófilo de Puebla, Coahuila y Jalisco (Figura 2). Inflorescencia densa, en panículas más o menos ramificadas, de 60 a 80 cm de largo, ramas de 3 a 12 cm de largo, semillas con o sin ala estrecha lateral o apical (Rzedowski, J. *et al.* 1990). Micorriza del Valle del Valle de Tehuacan-Cuicatlán (Camargo, 2003).



**Figura 2.** Planta adulta de *Hechtia podantha* del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.

### ***Beaucarnea gracilis* Lem.**

Semi-suculenta arborescente (Nolinacea), especie endémica del Valle de Tehuacan, Puebla. La especie es dioica, florece anualmente; el sistema

reproductivo y el despliegue floral son típicos de un modo generalista de polinización; se producen mas de 2600 semillas por inflorescencia y un individuo puede producir mas de 35 inflorescencias, las inflorescencias miden de 0.6 a 1 m de largo (Figura 3). La sobrevivencia de las semillas es muy baja (Cartel, Y.1997).

En particular, la germinación de semillas de *Beaucarnea gracilis* ha sido estimada con valores de 95% y un tiempo medio de germinación (TMG) de 6.8 días a 26°C (Flores, 2001), cabe resaltar la propuesta de conservación planteada para esta especie, dado que es considerada como amenazada y el bajo reclutamiento que presenta, en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla (Cartel, 1997). A parte de ser una especie potencialmente rara también es una micorriza con un bajo porcentaje de raíces colonizadas (Camargo *et al*, 20003). Otra de las particularidades de esta especie, es que es el hospedero de algunas epifitas, ya que alberga a un 92% de individuos de *Tillandsia*, principalmente *Tillandsia dasyliriifolia* y en menor proporción *Tillandsia recurvata*, especialmente en las partes bajas de la planta. Favorece la población de epifitas por la gran cantidad de ramas que posee (García *et al*, 2003).



**Figura 3.** Planta adulta de *Beaucarnea gracilis* del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.



Por otro lado, la Espectroscopia de Refractancia en Infrarrojo Cercano (NIRS) se ha utilizada para estimar la composición de ácidos grasos en semillas, mediante el desarrollo de ecuaciones de calibración basadas en información de diferentes regiones del espectro de infrarrojo, en las cuales absorben los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos insaturados (Velasco *et al*, 1997), como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Regiones de absorción del espectro en infrarrojo cercano asociadas a los ácidos grasos. Tomado de Velasco *et al*, 1997

Región del espectro (nm)	Vibración	Estructuras
1650-1800	primer sobretono C-H	CH <sub>2</sub> ,CH <sub>3</sub>
1880-1920	segundo sobretono C=O	-CO <sub>2</sub> H
2140-2200	combinaciones =C-H + C=C	CH=CH
2240-2380	combinaciones C-H	CH <sub>2</sub> ,CH <sub>3</sub>

Los modelos quimiométricos permiten relacionar las intensidades de las regiones del espectro mencionadas con la concentración de los mismos. Adicionalmente, se realizan correcciones a los espectros como normalización de señales y derivadas de curvas. Finalmente, se aplican análisis de validación-cruzada (Cross-validation statistics) para aumentar la capacidad de predicción de las ecuaciones desarrolladas (Velasco *et al*, 1998., Velasco *et al*, 1997).

Los análisis quimiométricos han sido utilizados en diversos estudios, como el realizado con semillas de *Brassica carinata* Braun, en las cuales se ha determinado el contenido de los ácidos: palmítico, esteárico, oleico, linoléico, linolénico, eicosanóico y erúcico con un alto grado de confiabilidad (Velasco *et al*, 1997). También en semillas intactas de *Brassica napus* L se ha determinado en forma simultánea el contenido de grasas y la composición de ácidos grasos como oleico y erúcico (Velasco *et al*, 1999). La técnica de NIRS también se ha empleado para cuantificar de forma no destructiva algunos derivados de lípidos, como los ésteres del ácido sinápico en semillas de *Brassica. spp* (Velasco *et al* 1998 a.,

Velasco *et al* 1998). Por otro lado, en semillas intactas de *Helianthus annuus* se han determinado los ácidos oleico y linoléico en semillas completas, en la testa y en la harina (Pérez-Vich *et al*, 1998).

Por otra parte, es necesario mencionar que la peroxidación lipídica asociada al envejecimiento, ha sido estudiada en diversas especies (Wilson y Mc Donald, 1986., Buchvarov y Gantcheff, 1984., Gidrol *et al* 1989), en las cuales se observa desde el aumento de malondialdeído (MDA) en diversas estructuras de las semillas, disminución de ácidos grasos insaturados vinculados con una reducción en la germinación. Así mismo, en semillas de frijol de soya, se ha observado en ejes embrionarios un decremento del ácido linoléico de la fracción polar, además de una notable reducción en la germinación de 26% y un aumento en la conductividad, (Stewart y Bewley, 1980).

Adicionalmente a los estudios mencionados acerca del uso del NIRS en la predicción de ácidos grasos; la técnica ofrece un amplio panorama para el desarrollo de modelos, no solo de contenido de lípidos, sino de otros aspectos particulares de las semillas, como se ha demostrado en cebada, donde el NIRS es capaz de diferenciar entre efectos genéticos y ambientales en diferentes fenotipos (Munck *et al*, 2001).

Finalmente, destaca el trabajo realizado por Vergara (2002), que obtiene una correlación significativa en la predicción de la concentración de ácidos grasos, por medio de la técnica de NIRS en semillas de *Brassica napus* y *Stenocereus stellatus*, en el cual los tratamientos de envejecimiento (7% de Humedad Relativa (HR)-25°C; 58% HR- 25°C: 7% HR-40°C y 58% HR-40°C) generaron una disminución en los ácidos grasos siendo mas clara para los insaturados en ambas especies; no obstante esos tratamientos no logró inducir una disminución significativa de la germinación.

## HIPÓTESIS

La peroxidación de ácidos grasos daría como resultado una disminución en la concentración de ácidos grasos insaturados, por lo tanto el seguimiento de los cambios de su concentración por medio de la técnica de NIRS, puede ofrecer una alternativa para correlacionar la peroxidación en las semillas y capacidad de germinación, ofreciendo un método no destructivo de estimación de la viabilidad en una población de semillas. Para corroborar la hipótesis anterior se definieron los siguientes objetivos.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

- Evaluar el uso de la técnica de NIRS como una alternativa no destructiva que permita correlacionar los niveles de ácidos grasos insaturados y la viabilidad en semillas de *Hechtia podantha* y *Beaucarnea gracilis* durante el envejecimiento acelerado.

### Objetivos Particulares

- Establecer condiciones de germinación para las semillas en estudio.
- Inducir el envejecimiento acelerado en semillas bajo diferentes condiciones de humedad relativa y temperatura.
- Determinar la concentración de ácidos grasos saturados e insaturados por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)
- Registrar los espectros de infrarrojo, mediante la técnica de NIRS.
- Correlacionar los espectros de NIRS con los resultados de ácidos grasos para construir un modelo mediante un Quimiométrico, que permita predecir el nivel de los mismos.
- Correlacionar los espectros de NIRS con los resultados obtenidos de germinación para construir un modelo mediante un Quimiométrico, que permita predecir la viabilidad o nivel de envejecimiento de las semillas.

## METODOLOGIA

### Condiciones de germinación

Las semillas de *Hechtia podantha* corresponden a una colecta de septiembre del 2000 y las de *Beaucarnea gracilis* a una colecta de 2001. Las semillas se limpiaron con una solución de tween al 1% durante 5 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada para someterlas a los tratamientos de escarificación: ácido sulfúrico al 10% y concentrado ( $H_2SO_4$ ) durante 20, 40 y 60 segundos respectivamente, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril; después de los tratamientos antes mencionados se colocaron 25 semillas en una caja de Petri con agar bacteriológico al 1% (esterilizado 15 minutos a  $120^{\circ}C$ ,  $15\text{ lb/p}^2$ ), se mantuvieron en una cámara de germinación a una temperatura de  $25^{\circ}C$  y un fotoperíodo de 12 horas de luz (Flores, 2001., Cartel, 1997).

### Tratamientos de envejecimiento acelerado

Se utilizaron recipientes de plástico con tapa hermética (cámaras de envejecimiento Figura 4), cuyo interior contenía una caja de Petri, en los cuales se depositaron: 1.5 g de semillas de *Beaucarnea gracilis* y 0.2 g de *Hechtia podantha*. En los primeros tratamientos de envejecimiento se utilizaron las siguientes condiciones: 75% HR- $40^{\circ}C$  y 84% HR  $40^{\circ}C$ . Posterior a estos tratamientos se emplearon: 55% HR- $50^{\circ}C$  y 55% HR- $60^{\circ}C$ .



**Figura 4.** Cámara de envejecimiento acelerado.

Para generar las condiciones de humedad en las cámaras de envejecimiento se colocaron 15 ml de disoluciones saturadas de las siguientes sales: NaCl, KCl, NaBr que generaron 75%, 84% y 55% HR, respectivamente (Walters y Ross, 1993). La duración del tratamiento fue de diez días, los recipientes se mantuvieron en estufas a las temperaturas mencionadas, en condiciones de obscuridad. La muestra blanco se mantuvo en un frasco con tapa hermética a temperatura y humedad relativa ambiental, en condiciones de obscuridad. Las semillas sometidas a estos tratamientos se colocaron a germinar previa limpieza, además de 5 minutos en alcohol al 30% y 15 minutos en una solución de NaClO al 20%, para evitar la contaminación.

### **Extracción y transesterificación de ácidos grasos de semillas**

Para la extracción de ácidos grasos se llevó a cabo el siguiente procedimiento: 20 mg de semillas de *Hechtia podantha* y 50 mg de semillas de *Beaucarnea gracilis* se pulverizaron con Nitrógeno líquido con ayuda de mortero y pistilo, descongelando en atmósfera de nitrógeno gaseoso, se adicionó 1 ml de CHCl<sub>3</sub>:Metanol (2:1) y se maceró durante diez minutos. Transcurrido este tiempo se recuperó la muestra en un tubo de eppendorf y posteriormente se agitó en un vortex durante diez minutos. Con el propósito de separar las fases y poder recuperar la fracción orgánica del extracto, la muestra se lavó con 0.2 ml de una solución de NaCl al 0.9% y se centrifugó por cinco minutos a 14,000 rpm. Todo el procedimiento anterior se llevó a cabo en condiciones de obscuridad y a 4°C, para evitar la oxidación (Priestly y Leopold,1985). De la fase orgánica se tomó una alícuota de 100 µl, que se evaporó con nitrógeno, para llevar a cabo la reacción de transesterificación se adicionó 0.5 ml de BF<sub>3</sub> al 12% en metanol y se colocó en ebullición, durante veinte minutos. Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se recuperó con 1 ml de hexano, finalmente se adicionó 0.5 ml de agua destilada para lavar la muestra (Priestly,1985 y modificado de Morrison, 1964). Para este procedimiento de derivatización de ácidos grasos se empleó como patrón interno Ácido Araquídico.

### **Análisis de ácidos grasos por GC-MS**

El análisis de la composición de ácidos grasos, se llevó a cabo en un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas Finnigan MAT GCQ. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: inyección del modo split, temperatura del inyector de 200°C, se utilizó una rampa de temperatura del horno programada desde 100°C (al inicio tres minutos) hasta 250°C (manteniendo 4 minutos) con un intervalo de 5°C/minuto. La columna del Cromatógrafo de Gases fue del tipo DB-1 (Dimetilpolisiloxano). Se utilizó Helio como gas acarreador a una velocidad de 35 cm s<sup>-1</sup>. Las condiciones del detector de masas fueron: temperatura de la línea de transferencia de 250°C, intervalo de 20 a 400 m/z, polaridad positiva, temperatura de la fuente de iones de 200°C, el tipo de ionización fue de impacto electrónico a 70 electro-Volts (eV). Se inyectó 1 µl de la fase orgánica del extracto. La identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención de estándares y patrones de fragmentación obtenidos de bibliotecas de referencia (NIST).

### **Registro del espectro de infrarrojo de semillas mediante NIRS**

El registro se obtuvo en el Espectrofotómetro de Infrarrojo (Perkin Elmer Spectrum 2000), con el accesorio de reflectancia difusa (Spectra Tech), colocando 250 mg de semillas en la portamuestra. Con un intervalo de lectura de 7,800 a 600 cm<sup>-1</sup>, 14 barridos y una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>. Se registró el logaritmo del recíproco de la Reflectancia (log 1/R).

### **Modelo mediante el Quimiométrico (QUANT.)**

Con todos los espectros obtenidos mediante el análisis de infrarrojo se alimentó el Programa QUANT, asignándoles el valor de la concentración de ácidos grasos y los de viabilidad de acuerdo al tratamiento utilizado, empleando algoritmos PLS1 y previo a la calibración, se hizo la corrección de la línea base sacando la derivada de segundo orden con una amplitud de 49 puntos.

**Determinación de la viabilidad de semillas, por la prueba de TTC.**

Las semillas se colocaron a hidratar (24 h) en cajas de Petri con papel filtro humedecido a 30°C, transcurrido este periodo se transferirieron a una solución de cloruro 2,3,5 trifenil de tetrazolio al 0.2% en amortiguador de fosfatos 150 mM pH 7 durante 24 h en oscuridad a 30°C. Posteriormente las semillas se enjuagaron y fueron disectadas para realizar la observación del embrión con ayuda de microscopio estereoscópico. La tinción topológica del embrión permitió separarlos en cuatro categorías: I, el embrión reacciona de forma uniforme, por lo tanto se observa todo en tono rosa; II, reacciona gran parte del embrión aunque hay zonas centrales en donde no se observa coloración claramente; III, reacciona la mitad del embrión y IV reacciona muy ligeramente la zona de la radícula.

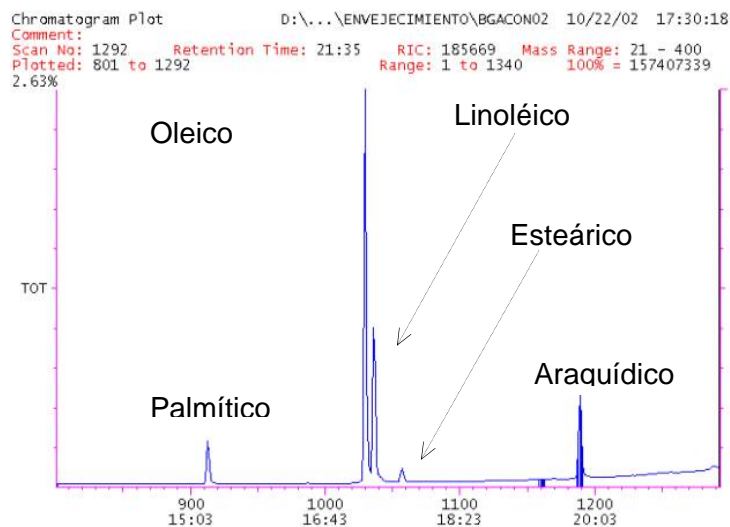
**Análisis Estadísticos**

Se utilizó ANOVA simple y ANOVA en bloques, las diferencias se corroboraron con la prueba de Tuckey, con una probabilidad de ( $<0.05$ ).

## RESULTADOS

### GC-MS y NIRS

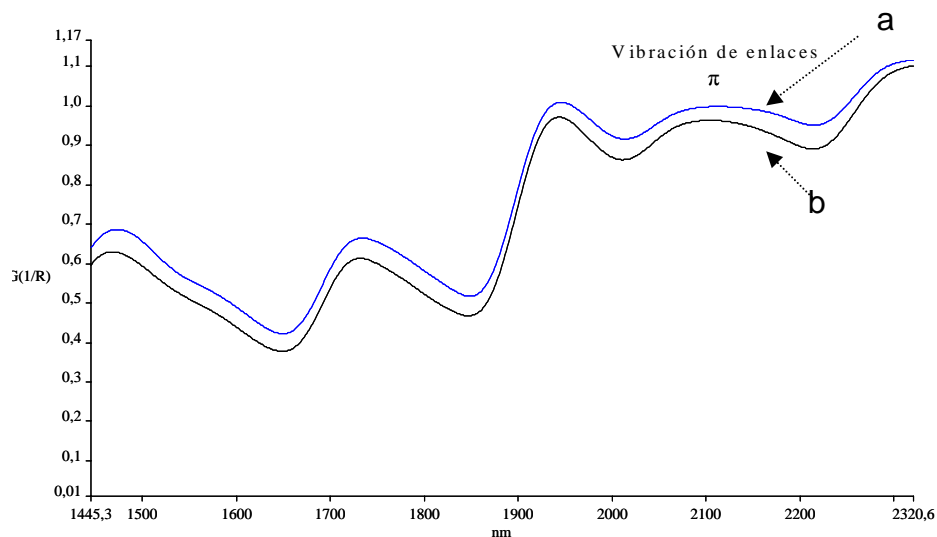
La transesterificación realizada para el análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, permitió definir principalmente los siguientes ácidos: palmítico, oleico, linoléico y esteárico. Por esta técnica no se detectó la presencia del ácido araquídico en las semillas. Es necesario señalar que el orden de elución de los ácidos grasos obedece a la polaridad de la columna. En la Figura 5 se muestra un ejemplo de los cromatogramas obtenidos en el análisis de ácidos grasos de las semillas, en éste se observan los picos correspondientes a los ácidos grasos, así mismo, sirve para ejemplificar la forma de estimar las concentración de los ácidos grasos, es decir, mediante el registro del área bajo la curva de los mismos y del patrón interno.



**Figura 5.** Cromatograma de los ácidos grasos presentes en semillas.

Por otro lado, en la Figura 6 se muestra un ejemplo del intervalo del espectro de infrarrojo cercano de semillas empleado para el desarrollo de modelo quimiométrico de predicción. La región de 2000 a 2200  $\text{cm}^{-1}$  que se muestra corresponde a la zona de mayor de vibración de los electrones  $\pi$  presentes en los ácidos grasos de las semillas (Velasco *et al*, 1997).





**Figura 6.** Intervalo del espectro de infrarrojo cercano, de la región de vibración de los enlaces  $\pi$ , de semillas, muestra de semillas envejecidas (a y no envejecidas (b).

## ***Hechtia podantha***

### **Viabilidad**

En la Tabla 2, se puede apreciar que las semillas de *Hechtia podantha* no requieren condiciones específicas, que permitan lograr niveles altos de germinación, ya que en general supera el 96 %; el tratamiento en el que se utilizó  $H_2SO_4$  al 10% con el menor tiempo de exposición tuvo un porcentaje de germinación de 97.6, sin embargo es necesario mencionar que no se encuentra una diferencia significativa entre los tratamientos así como en las dos temperaturas (Ver Apéndice-A). El intervalo de germinación para las semillas de esta especie es de 92 a 100%, siendo el promedio de 96 %.

Los resultados anteriores se complementan con los obtenidos mediante la prueba de TTC, en los cuales se registró un 98% de viabilidad de los grupos I, II, III, de tal manera que se presenta una buena relación entre ambas pruebas de viabilidad, por lo tanto en las siguientes pruebas de germinación sólo se utilizaron las condiciones de limpieza de las semillas y una temperatura de 25°C.

**Tabla 2.** Respuesta del porcentaje de germinación bajo dos tratamientos, para generar niveles elevados de germinación en semillas de *Hechtia podantha*.

Temperatura	Germinación (%)
25°C	96
30°C	96.8
Escarificación	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 10% 20 segundos	97.6
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 10% 40 segundos	94.4
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 10% 60 segundos	92
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20 segundos	0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 40 segundos	0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 60 segundos	0

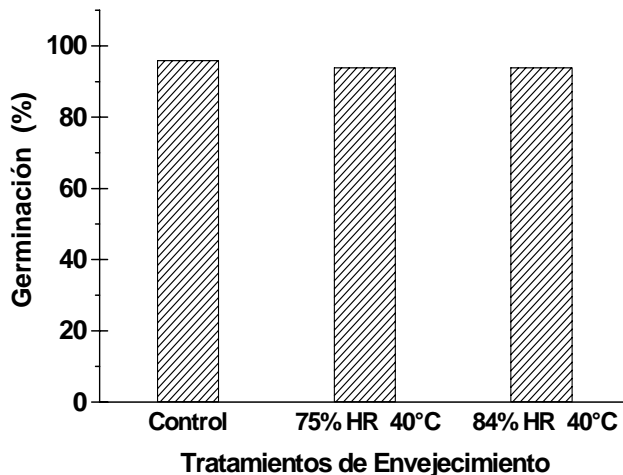
### Tratamientos de envejecimiento acelerado

Los efectos de los tratamientos de envejecimiento acelerado con una humedad relativa alta, no muestran efecto alguno sobre la capacidad de germinación de las semillas de *Hechtia podantha*, como se muestra en la Figura 7, es probable que mediante el tiempo de exposición no se haya registrado un efecto mayor, no obstante es necesario mencionar que en humedades elevadas las semillas se contaminan.

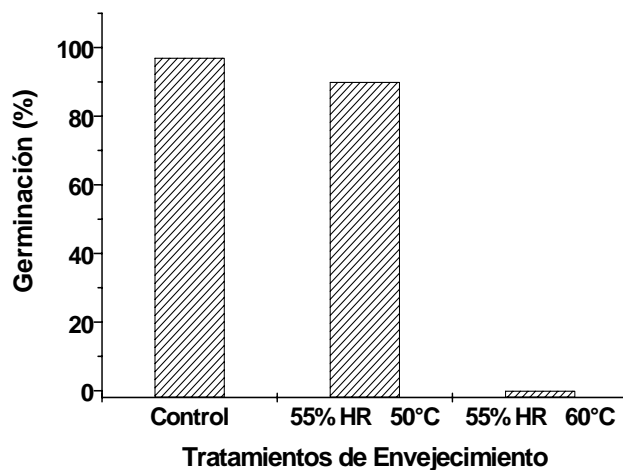
Con el propósito de generar un gradiente en la longevidad y teniendo en cuenta que la humedad no fue un factor determinante para inducir una disminución en el porcentaje de germinación de las semillas, se optó por aumentar la temperatura y no tanto la humedad relativa en las condiciones de envejecimiento acelerado en ambas especies. Se hizo lo anterior por que los tratamientos reportados son para semillas domesticadas y las del presente trabajo son de tipo silvestre, cuyo hábitat se caracteriza por condiciones extremas.

Para valorar la especulación anterior se probaron condiciones de temperatura elevada y una humedad relativa de 55%. Se observó que con el tratamiento de envejecimiento acelerado de 55% de HR y 50°C, se lograba una ligera

disminución en el porcentaje de germinación a 90% (Figura 8) y al aumentar a 60°C se pierde por completo la capacidad de germinación.



**Figura 7.** Se muestra el porcentaje de germinación después de dos tratamientos de envejecimiento acelerado (después de 10 días), en semillas de *Hechtia podantha* (n=1).

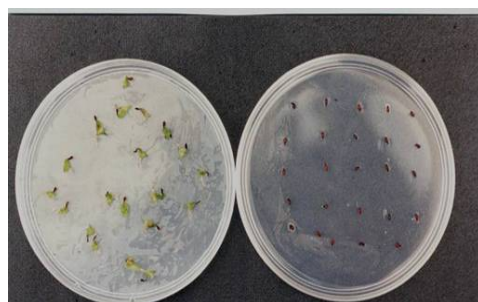
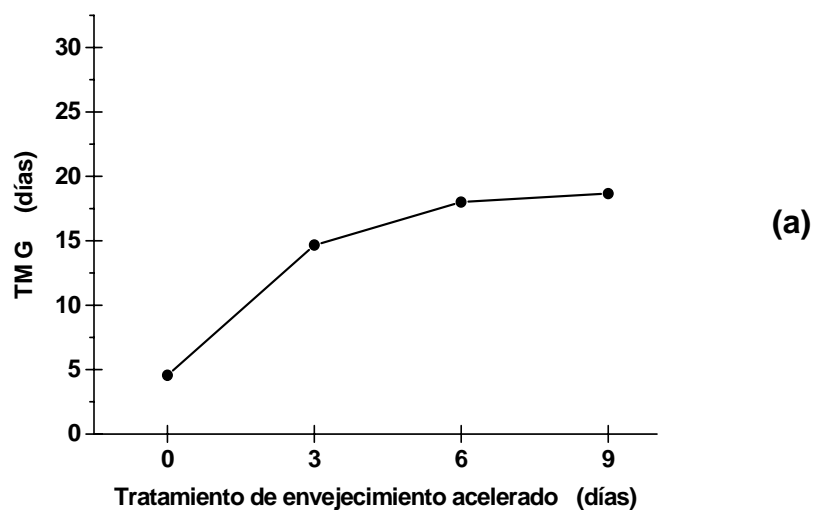


**Figura 8.** Se muestra el porcentaje de germinación después de dos tratamientos de envejecimiento acelerado (después de 10 días), en semillas de *Hechtia podantha* (n=1).

Como no se demostró cual de las dos temperaturas generaría un gradiente en la longevidad de las semillas de *Hechtia podantha* se seleccionó una temperatura intermedia de las anteriores, es decir 55°C.

### Tratamiento de envejecimiento acelerado seleccionado

Del tratamiento de envejecimiento acelerado de 55% de HR y 55°C en semillas de *Hechtia podantha*, se obtuvo una pérdida del vigor manifestada como TMG (Figura 9). El TMG de las semillas no envejecidas fue de 4.5 días y conforme transcurre el tiempo en el tratamiento de envejecimiento este aumenta a 14.6 después de 3 días y hasta 18.6 tras 9 días de tratamiento.

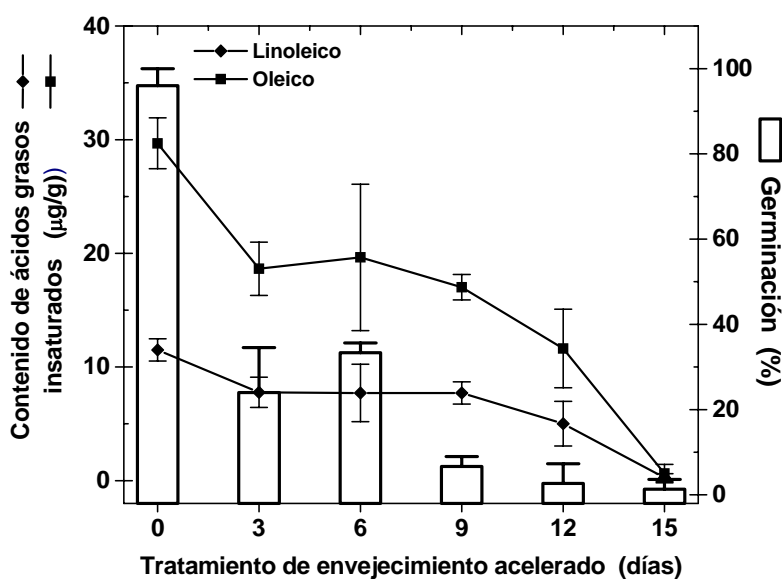


Control Envejecidas

**Figura 9.** Se muestra el tiempo medio de germinación de semillas de *Hechtia podantha* (a), durante el tratamiento de envejecimiento acelerado (55% de HR y 55°C durante 15 días, con registro cada 3 días) y una fotografía de la germinación de semillas (b) no envejecidas y envejecidas 15 días (n=3).

### Viabilidad y niveles de ácidos grasos

Los resultados del tratamiento de envejecimiento acelerado, no solo se reflejan en el vigor, sino también en la capacidad de germinación de forma pronunciada, como se observa en la Figura 10. Después de 3 días, el porcentaje de germinación decae a 24%, menos del 50% de la estimada para el control (98% G) y disminuye hasta 1.33 % después de 12 días de tratamiento. En la misma Figura (10) se muestra el decremento en la concentración de ácidos grasos insaturados: el ácido oleico disminuye de 29.68 (control) a 0.62  $\mu\text{g/g}$  y el ácido linoléico de 11.50 (control) a 0.26  $\mu\text{g/g}$ , después de quince días de tratamiento. Los cambios registrados en la concentración de los ácidos grasos fueron estadísticamente significativos (Apéndice-B).



**Figura 10.** Se muestra la viabilidad (% G) y los niveles de ácidos grasos insaturados, durante el tratamiento de envejecimiento acelerado (55% de HR y 55°C por 15 días, con registro cada 3 días), en semillas de *Hechtia podantha* (n=3).

La disminución en los ácidos grasos insaturados puede ser explicada por la peroxidación lipídica inducida por el tratamiento de envejecimiento y el mismo efecto se presenta en los ácidos grasos saturados de esta especie; de la siguiente

forma: el ácido palmítico disminuye de 4.10 (control) a 1.98  $\mu\text{g/g}$  y el ácido esteárico de 2.49 (control) a 0.49  $\mu\text{g/g}$ , después de 15 días de envejecimiento. No obstante lo anterior, es necesario recalcar que se presenta una disminución en capacidad de germinación de las semillas de esta especie.

### **NIRS y Quimiométrico (QUANT)**

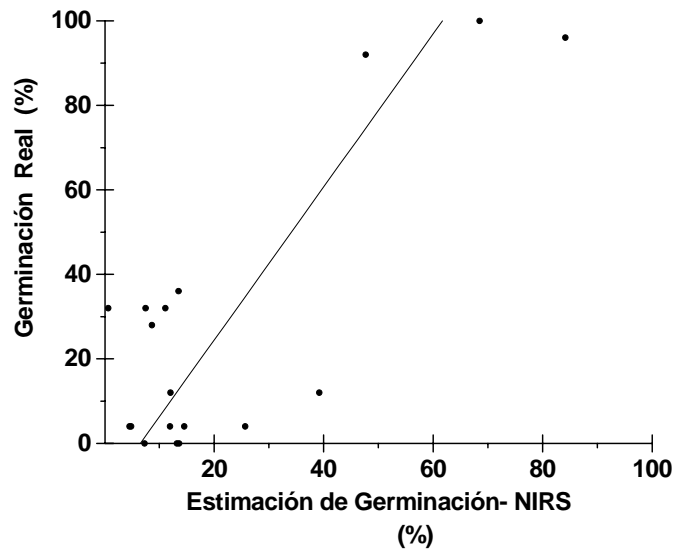
El valor del % de varianza es equivalente al coeficiente de correlación y los valores generalmente aceptados para la calibración de modelos quimiométricos son de 80%. El análisis quimiométrico realizado por el programa QUANT, con los espectros de infrarrojo, generó valores de calibración del método superiores al 60% (varianza). Siendo mayor para el ácido palmítico de 80.4 % y el menor para el linoléico de 61.73% (Tabla 3). En lo referente a la germinación es del 72.1%, aunque es en este parámetro donde se presenta el valor más elevado en el error estándar de la predicción, esto se puede deber a los últimos datos, pues la variabilidad entre ellos es muy grande.

**Tabla 3.** Resultados generados mediante la calibración del quimiométrico (QUANT), expresado en % de varianza, en semillas de *Hechtia podantha*.

	<b>% Varianza</b>	<b>Error estándar estimado</b>	<b>Error estándar en la predicción</b>
<b>Palmítico</b>	80.4	0.52	1.43
<b>Esteárico</b>	80.18	0.26	0.52
<b>Linoleico</b>	71.98	1.53	2.78
<b>Oleico</b>	61.73	6.12	12.51
<b>Germinación</b>	72.1	19	32.01

### **Viabilidad real vs estimada mediante NIRS**

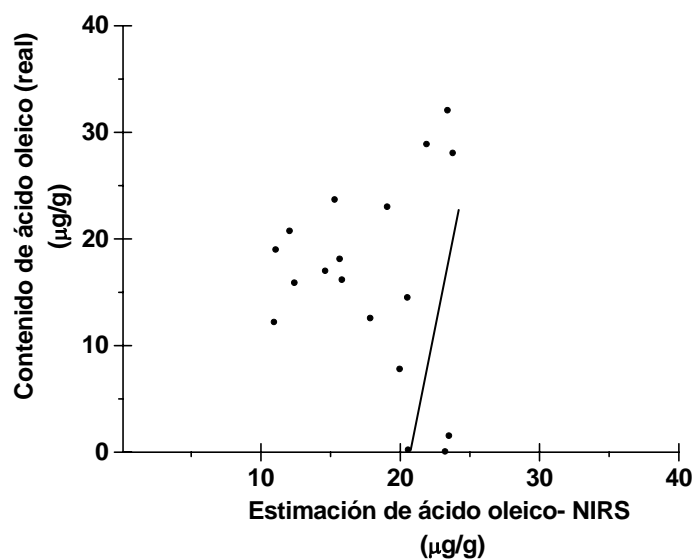
La estimación de la germinación mediante la técnica de NIRS resulta adecuada de acuerdo a la correlación que tiene con los datos experimentales, con un valor de  $r = 0.80$  durante el tratamiento de envejecimiento acelerado (Figura 11).



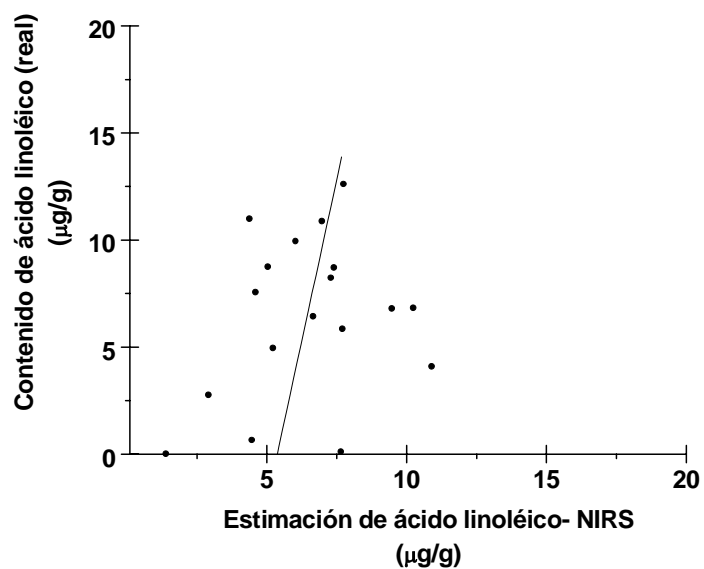
**Figura 11.** Se muestra la germinación expresada como % de germinación real vs la germinación estimada por el modelo quimiométrico y NIRS en semillas de *Hechtia podantha*, que estuvieron sometidas al tratamiento de envejecimiento acelerado (55% de HR y 55°C por 15 días).

### **Contenido de ácidos grasos insaturados (GC-MS) vs estimados mediante NIRS**

La estimación para los ácidos grasos insaturados no presentó la misma tendencia que para la germinación, pues los valores de correlación son muy bajos para ácido oleico una  $r=0.33$  y ácido linoléico  $r= 0.5$  (Figura 12).



(a)



(b)

**Figura 12.** Se muestra el contenido de ácidos grasos insaturados obtenidos mediante GC-MS expresados en  $\mu\text{g/g}$  vs los estimados para ácido oleico (a) y ácido linoléico (b), por el modelo quimiométrico y NIRS, en semillas de *Hechtia podantha*, que estuvieron sometidas al tratamiento de envejecimiento acelerado (55% de HR y  $55^\circ\text{C}$  por 15 días).



## ***Beaucarnea gracilis***

### **Viabilidad**

Las semillas de *Beaucarnea gracilis* presentan un comportamiento similar al de *Hechtia podantha*, es decir no requieren alguna condición específica para lograr niveles elevados de germinación, como se observa en la Tabla 4, no hay diferencia tanto de los tratamientos de escarificación como de los de temperatura empleados. Aunque el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, con mayor tiempo de exposición (60 segundos) presenta un ligero incremento en cuanto al porcentaje de germinación, no hay diferencia significativa (Ver Apéndice-C). El intervalo de germinación para las semillas de esta especie es de 96 a 100%, siendo el promedio de 98 %, por lo cual en las siguientes pruebas se maneja sólo la limpieza de las semillas y su germinación a una temperatura de 25°C.

**Tabla 4.** Respuesta del porcentaje de germinación bajo dos tratamientos, para generar niveles elevados de germinación en semillas de *Beaucarnea gracilis*.

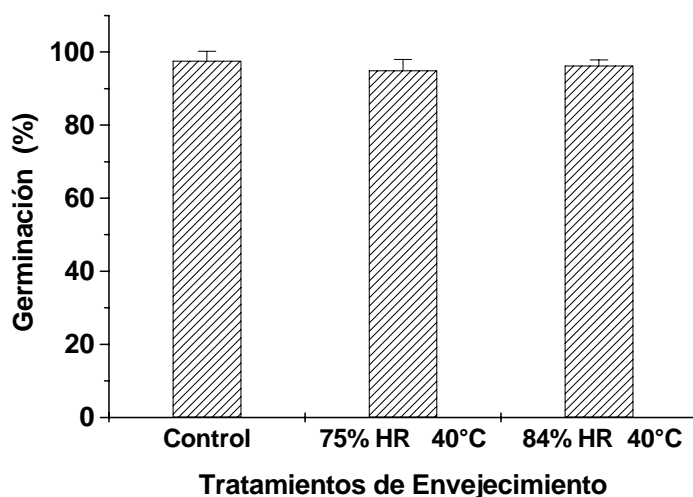
Temperatura	Germinación (%)
25°C	98
30°C	98
Escarificación	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 10% 20 segundos	97.6
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 10% 40 segundos	98.2
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 10% 60 segundos	99.2
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20 segundos	97.6
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 40 segundos	98.4
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 60 segundos	98.8

Adicionalmente a los resultados de germinación (98%), la prueba de viabilidad de las semillas mediante cloruro 2,3,5 trifenil de tetrazolio registró un 100%. Considerando los resultados generados de viabilidad en las semillas de ambas especies y el tiempo de almacenamiento transcurrido hasta su estudio, asociado al

contenido de humedad que (calculados mediante diferencia de peso) presentan 9 a 10 % en *Hechtia podantha*, y 6.5 a 7% en *Beaucarnea gracilis*; se trata de semillas ortodoxas.

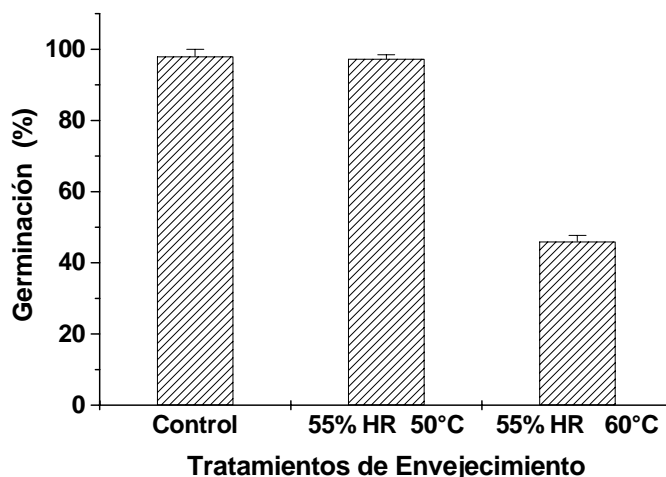
### Inducción de envejecimiento

Los tratamientos de envejecimiento con una humedad relativa alta se presentan en la Figura 13, donde se puede observar que no tuvieron un efecto sobre la viabilidad de las semillas, ya que después de 10 días, el porcentaje de germinación no disminuye de manera significativa (Ver Apéndice-D).



**Figura 13.** Porcentaje de germinación después de dos tratamientos de envejecimiento (después de 10 días) en semillas de *Beaucarnea gracilis* (n=3).

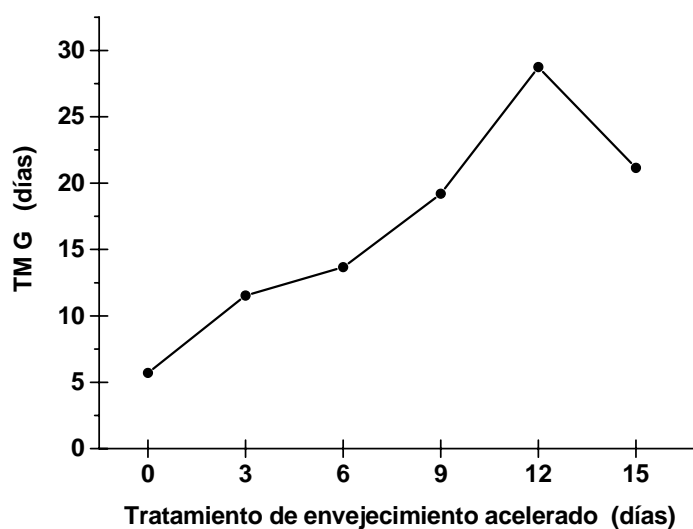
Con los tratamientos de 55% HR y 50°C y 55% HR-60°C se registró un efecto sobre la capacidad de germinación, como se muestra en la Figura 14. Es notable que la temperatura elevada y una humedad relativa ligeramente baja afecta la viabilidad de semillas de *Beaucarnea gracilis*, ya que al aumentar a 60°C se presenta una disminución en la capacidad de germinación, la cual se reduce significativamente (Apéndice-E) hasta menos del 50%, después de diez días de tratamiento. De los resultados anteriores el tratamiento de envejecimiento utilizado fue una temperatura de 55% HR- 60°C.



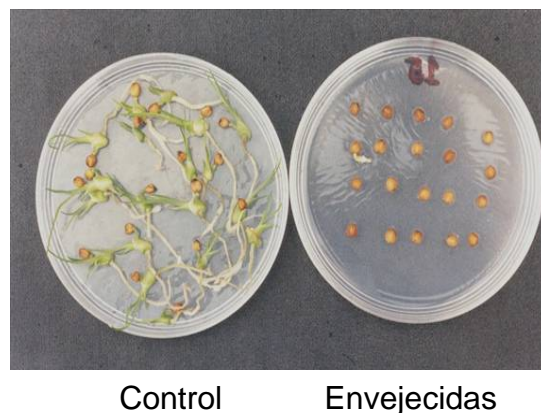
**Figura 14.** Porcentaje de germinación después de dos tratamientos de envejecimiento (10 días) en semillas de *Beaucarnea gracilis* (n=3).

#### Tratamiento de envejecimiento seleccionado

La pérdida del vigor en semillas de *Beaucarnea gracilis* se manifestó con un aumento en el TMG, es decir en las semillas sin algún tratamiento de envejecimiento el TMG fue 5.7 días y conforme transcurre el tiempo de exposición a los tratamientos, el TMG se alcanza hasta el día 28.15 después de doce días de envejecimiento, Figura 15.



(a)



(b)

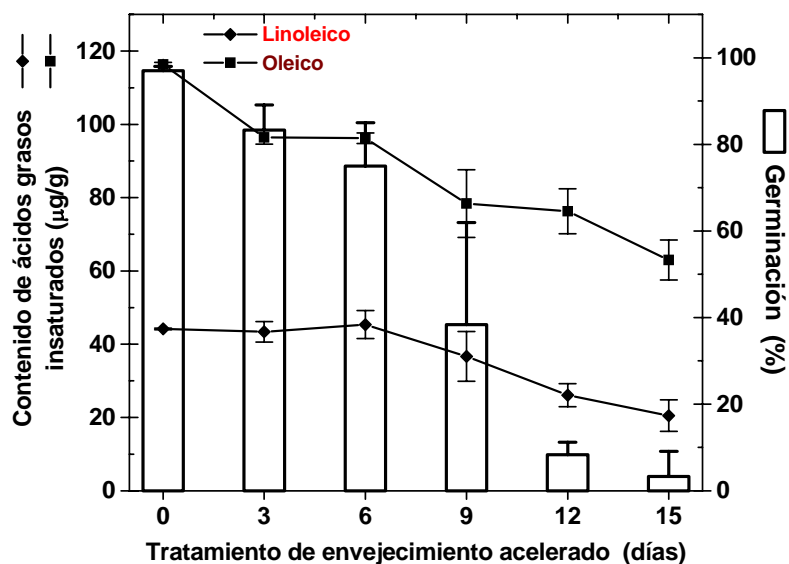
**Figura 15.** Se muestra el tiempo medio de germinación (TMG) de semillas de *Beaucarnea gracilis* (a), durante el tratamiento de envejecimiento acelerado (55% de HR y 55° C durante 15 días, con registro cada 3 días) y una fotografía de la germinación de semillas (b) no envejecidas y envejecidas 15 días (n=3).

Es necesario mencionar que el parámetro de germinación se registró hasta el día 40; durante los primeros días las semillas imbibieron incluso las envejecidas, no obstante estas últimas, una semana después no presentaron cambio alguno en sus características de morfológicas.

### Viabilidad y niveles de ácidos grasos

Respecto a la viabilidad se observa claramente su disminución de 98% a 38.3% tras 9 días (tratamiento) y hasta un 3.33 después de 15 días de tratamiento de envejecimiento acelerado. Es notable el efecto tanto en la viabilidad como en la concentración de ácidos grasos principalmente los de tipo insaturado. Así mismo los niveles de ácidos grasos insaturados registraron una disminución significativa como se puede observar en la Figura 16, aunado a la pérdida gradual de la viabilidad en semillas de *Beaucarnea gracilis*. El ácido oleico (C:18<sup>Δ9</sup>) registró una disminución de 116.39 (control) a 78.39 μg/g después de 9 días de tratamiento de envejecimiento acelerado, para el día 15 este ácido disminuye drásticamente. El ácido linoléico (C:18<sup>Δ9,12</sup>) presentó el mismo comportamiento, disminuyendo significativamente desde 44.17 a 36.38 μg/g después de 9 días de envejecimiento (Apéndice-F). El comportamiento de los ácidos grasos saturados durante el

envejecimiento es constante, el ácido palmítico (C: 16) fluctuó en niveles de 8.35 a 7.34  $\mu\text{g/g}$  y el ácido esteárico (C:18) de 4.54 a 3.2  $\mu\text{g/g}$ , de tal manera que no muestran un afectación significativa a lo largo del envejecimiento.



**Figura 16.** Se muestra la viabilidad (% G) y los niveles de ácidos grasos insaturados, durante el tratamiento de envejecimiento acelerado (55% de HR y 55°C por 15 días, con registro cada 3 días), en semillas de *Beaucarnea gracilis* (n=3).

El tratamiento de envejecimiento en esta especie genera las principales manifestaciones de este fenómeno, como la pérdida de vigor, la capacidad de germinación, así como el decremento de los ácidos grasos debido a la peroxidación lipídica, además de mantener en niveles estables a los ácidos de tipo saturado.

### NIRS y Quimiométrico (QUANT)

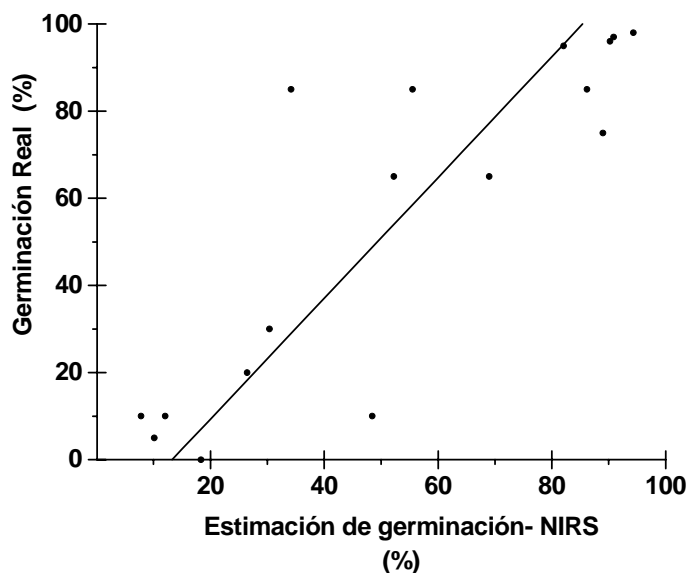
En la Tabla 5 se observan los resultados de calibración de los espectros y los resultados obtenidos de viabilidad y ácidos grasos mediante el quimiométrico, los cuales, en general, son superiores al 80% (%Varianza).

**Tabla 5.** Resultados generados mediante la calibración del quimiométrico (QUANT), expresado en % de varianza, en semillas de *Beaucarnea gracilis*.

	% Varianza	Error estándar Estimado	Error estándar en la predicción
<b>Palmítico</b>	86.82	0.59	1.43
<b>Esteárico</b>	92.27	0.28	0.70
<b>Linoléico</b>	82.11	4.34	9.40
<b>Oleico</b>	82.6	10.98	37.23
<b>Germinación</b>	93.61	4.34	9.40

### Viabilidad real vs estimada mediante NIRS

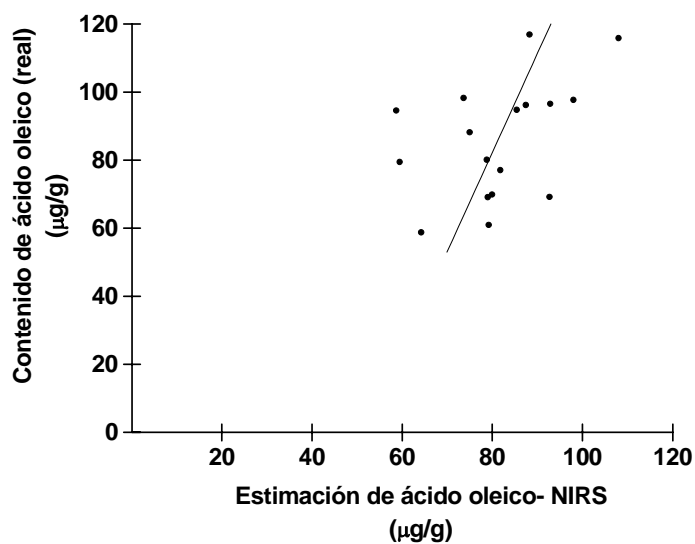
En la Figura 17, se muestra la capacidad de estimación de la germinación mediante el modelo quimiométrico, la cual presenta una correlación con los datos experimentales de  $r=0.89$ .



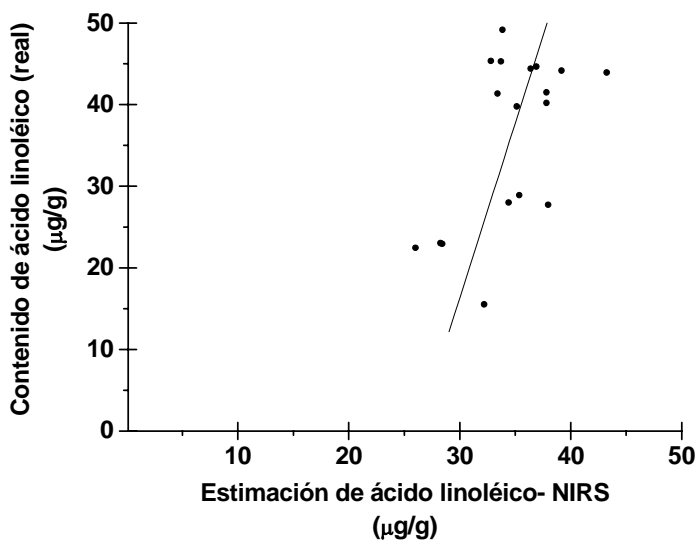
**Figura 17.** Se muestra la germinación expresada como % de germinación real vs la germinación estimada por el modelo quimiométrico y NIRS en semillas de *Beaucarnea gracilis*, que estuvieron sometidas al tratamiento de envejecimiento acelerado (55% de HR y 55°C por 15 días).

### Contenido de ácidos grasos insaturados (GC-MS) vs estimados mediante NIRS

La estimación para los ácidos grasos insaturados presentó valores de correlación para ácido oleico una  $r=0.33$  y ácido linoléico  $r= 0.5$  (Figura 18)



(a)



(b)

**Figura 18.** Se muestra el contenido de ácidos grasos insaturados obtenidos mediante GC-MS expresados en  $\mu\text{g/g}$  vs los estimados para ácido oleico (a) y ácido linoléico (b), por el modelo quimiométrico y NIRS, en semillas de *Beaucarnea gracilis*.

## DISCUSIÓN

Las temperaturas experimentales generalmente empleadas para germinación de germoplasma del Valle de Tehuacan varía de 12 a 26°C, no obstante semillas de *Beaucarnea gracilis* tienen una reducida capacidad de germinación a temperaturas inferiores a 20°C (Flores, 2001). Dado que en este estudio, las semillas de *Beaucarnea gracilis* y *Hechtia podantha* aumentan su velocidad de germinación de una temperatura de 25° a 30°C, se puede sugerir que están adaptadas a germinar a altas temperaturas. Aunque no se evaluó una temperatura más elevada, es probable que respondan positivamente hasta 35°C, lo cual se ha visto en especies de zonas áridas (Serrano *et al*, 2000). Otro punto importante a señalar es el porcentaje de germinación de 95% reportado previamente para semillas de *Beaucarnea gracilis* (Flores, 2001), en comparación con el obtenido en este trabajo de 98 % y el 100% con la prueba de TTC, lo que representa variaciones en el %G de semillas de la misma zona, lo anterior se puede atribuir al tipo de colecta, grado de madurez, así como el manejo y almacenamiento de las semillas de ambos trabajos.

Por otra parte las condiciones de envejecimiento experimental generalmente emplean intervalos de temperaturas de entre 5 y 45°C y humedades relativas de 1 a 100%. Por lo tanto es necesario señalar que las condiciones utilizadas en el presente trabajo específicamente la elevada temperatura (55% HR-55°C y 55% HR-60°C), obedece al origen de estas semillas en comparación con las especies ampliamente estudiadas como cacahuate, frijol de soya y girasol (Sung y Jeng, 1994., Khan *et al*; 1996., Gidrol *et al*, 1981). Es decir, el hecho de ser silvestres implica que la variabilidad genética puede ser mayor. Además de las condiciones de su hábitat, que le confieren características específicas, entre ellos una tolerancia a temperaturas altas (45°C) y humedades bajas (8% HR) datos de Mayo del Laboratorio de Fisiología Vegetal, por ello es posible que los tratamientos utilizados al principio no generaran un gradiente en la longevidad de las semillas y las condiciones más drásticas sí tuvieran un efecto significativo.



Cabe mencionar que además de los resultados que se muestran, también se utilizaron tratamientos a 7%-HR 25°C y 58% HR-25°C durante un mes, período en el cual no se presentó cambio alguno en la viabilidad de las semillas de *Hechtia podantha* y *Beaucarnea gracilis*.

A pesar de que no se puede confirmar la formación de radicales libres en las semillas durante los tratamientos de envejecimiento, por no tener evidencias directas de Resonancia de Spin Electrónico o alguno de los productos secundarios, como el aumento de malodialdeído, los resultados obtenidos en este trabajo, en particular la disminución significativa de los ácidos grasos insaturados, permite suponer la participación de los radicales libres como factor primario de envejecimiento celular, como se ha observado en semillas de .

En cuanto a la disminución de ácidos grasos insaturados en semillas de *Beaucarnea gracilis* hay un comportamiento similar al mostrado por semillas de *Helianthus annuus* almacenadas a 100% HR-42°C durante 8 días, que tienen un decremento considerable en los ácidos insaturados de la fracción polar, aunque en la germinación es diferente, dado que en semillas de girasol sólo decae un 25% y en las de *Beaucarnea gracilis* y *Hechtia podantha* hasta un 96 y 98 % respectivamente. Sin embargo en girasol la disminución de ácidos grasos es principalmente de los triacilgliceridos, por lo cual se sugiere que los lípidos de reserva actúan como detoxificadores protegiendo a las membranas del daño excesivo (Gidrol *et al*, 1989). También esta especie muestra un aumento del TMG de 13 a 55 h. después de 8 días de envejecimiento, como las semillas de *Beaucarnea gracilis* y *Hechtia podantha*.

Los resultados obtenidos en este trabajo correlacionan las disminuciones de los ácidos grasos con la pérdida de la viabilidad. En contraste, en experimentos realizados en semillas de chícharo a 94% HR-25°C por 4 semanas, los fosfolípidos totales disminuyen en un 30% sin un cambio en la germinación; a 94% HR- 30°C 8 semanas, no registraron cambios en la concentración de fosfolípidos ni en la

germinación pero si se observó un aumento en la conductividad y a 20% CA 45°C durante 18 h. hubo un aumento en la concentración de fosfolípidos seguido de su disminución sin cambios en la capacidad de germinación (Powell y Harman, 1985). Incluso se ha manifestado que no hay una relación directa entre la peroxidación de ácidos grasos y el proceso de envejecimiento de las semillas. Como lo demuestra el hecho de que al envejecer semillas de frijol de soya a 100% HR y 40°C 5 días sin que se presente una reducción tanto de la germinación como en la concentración de ácidos grasos (Priestley y Leopold, 1979).

A pesar de los trabajos mencionados en los cuales hay un decremento de los ácidos grasos insaturados ya sea de ejes embrionarios o de cotiledones, así como un aparente cambio en la concentración de lípidos polares o de productos de peroxidación sin efecto paralelo sobre la capacidad de germinación, en el presente trabajo, la inocuidad del envejecimiento sobre los ácidos grasos saturados, permite suponer una estrecha correlación entre la peroxidación lipídica y el envejecimiento, por lo menos para las semillas de *Beaucarnea gracilis*, lo anterior por la notable reducción tanto de la viabilidad y de los ácidos grasos insaturados, además de la estabilidad en los de tipo insaturado aunado a la pérdida del TMG, con las reservas de que esto es resultado del envejecimiento acelerado, lo cual debe ser interpretado con cautela en comparación con el proceso de envejecimiento natural.

Por otra parte, las semillas de *Hechtia podantha* responden de forma similar, pero resulta evidente la rápida pérdida en la viabilidad, así como en los de ácidos grasos, inclusive el decline en los ácidos grasos saturados que no debieran presentar tal efecto, dadas las diferencias en las semillas de ambas especies al menos en la relación endospermo/embrión, es probable que las semillas *Hechtia podantha* hubieran sufrido un cambio a otro nivel de manera más drástico que el generado por la peroxidación lipídica.

Alternativamente, existe una posibilidad, para explicar la disminución en la concentración de ácidos grasos, como la actividad de enzimas del tipo desaturasa, que se activaran a niveles bajos de humedad y provocarían una disminución en la concentración de los ácidos grasos (Shanklin, 1998), podrían incluso ser en los de tipo saturado; en respuesta y como mecanismo de protección, las semillas entrarían en estado de dormancia, mediante el cual la germinación de las mismas se vería reducida, aunque resulta difícil de explicar dado que el cambio de humedad en las semillas es muy ligero para ambas especies, por ende es menos probable la actividad enzimática. Por otro lado también las condiciones de temperatura elevada podrían desencadenar la dormancia, no obstante esas condiciones generalmente se presentan en las semillas más sensibles como las recalcitrantes que no son tolerantes a la desecación.

En cuanto a la estimación de los ácidos grasos insaturados, la correlación entre los valores obtenidos mediante la técnica de GC-MS con los generados mediante el modelo quimiométrico, las semillas de *Hechtia podantha* presentan niveles muy bajos de  $r = 0.33$  y  $r = 0.55$ . Lo anterior probablemente se deba a la pérdida tan drástica que sufrieron los mismos, durante el envejecimiento acelerado, a diferencia de los presentados por las semillas de *Beaucarnea gracilis* que son superiores a  $r = 0.75$ . Es probable que la diferencia en los valores de correlación no fueron tan altos como los reportados por el uso de cultivares puros o el manejo de los datos obtenidos de los espectros que se ve reflejado al emplear la técnica de NIRS. No así para la predicción de la germinación, cuyos valores estimados y experimentales muestran niveles significativos de correlación, lo cual resulta interesante para realizar protocolos de viabilidad de semillas utilizando la técnica de NIRS en ambas especies, dado que tiene valores de correlación mayores a  $r = 0.80$ . Lo anterior pone de manifiesto que la técnica de NIRS, se puede utilizar en la predicción de viabilidad de semillas de *Beaucarnea gracilis* y *Hechtia podantha*, aún con las condiciones de envejecimiento empleadas.

Es decir, tomando en cuenta el tiempo de almacenamiento que tenían las semillas hasta su estudio, en las cuales sólo las de *Beaucarnea gracilis* eran recientes y generaron porcentajes de viabilidad elevados. Además de que su contenido de humedad es proporcional al de las semillas ortodoxas. Y que los tratamientos de envejecimiento acelerado de 75% HR-40°C y 84% HR-40°C, no causaron cambio en la capacidad de germinación, pero si incrementaron el contenido de humedad en las semillas de *Hechtia podantha*. Es probable que haya habido un daño a nivel metabólico que desencadenará con mayor rapidez la pérdida de viabilidad y esto se ve reflejado en la pérdida tanto de ácidos saturados como insaturados: De la misma forma el tener una menor disposición de material de reserva en comparación con las semillas de *Beaucarnea gracilis*. A diferencia de las semillas de *Beaucarnea gracilis*, que no cambiaron drásticamente su contenido de humedad durante el envejecimiento acelerado y toleraron las condiciones extremas. Que se ve reflejado durante el envejecimiento, pues los ácidos grasos saturados se mantienen constantes y tienen una mayor cantidad de material de reserva. Lo anterior, por que, a pesar que los niveles de ácidos grasos insaturados disminuyen en general y la estimación de estos fue mala con el empleo del modelo generado mediante NIRS; al generar el modelo quimiométrico de viabilidad la respuesta es elevada. Por lo tanto es probable que la reducción de la viabilidad no se asocie a la peroxidación, sin embargo, la capacidad de discriminación del equipo entre las semillas fue mayor y con la sensibilidad de distinguir entre las que presentaban cambios.

Alternativamente la técnica de NIRS podría utilizarse para explorar la variabilidad genética entre una población de semillas durante el envejecimiento y correlacionar dichos cambios con la viabilidad y las variaciones genéticas que sufra la población durante el envejecimiento, generando modelos con mayor capacidad de predicción de la condición de las semillas en un momento determinado (El-Kassaby, 1998). Lo anterior es de gran importancia en los Bancos de Semillas, ya que el germoplasma requiere ser evaluado periódicamente y conociendo los cambios que tienen y en el nivel preciso, el manejo del material será mas adecuado.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a lo anterior expuesto se puede concluir de la siguiente forma:

- El tratamiento de 55 % HR-60°C genera un gradiente de longevidad en semillas de *Beaucarnea gracilis*
- Con las condiciones de 55% HR-55°C no se obtuvo un gradiente en la longevidad de las semillas de *Hechtia podantha*, aunque si una disminución drástica de la viabilidad.
- Semillas de *Hechtia podantha* y *Beaucarnea gracilis* muestran una disminución en la concentración de ácidos insaturados, durante el envejecimiento
- La técnica de NIRS no es tan confiable en la estimación de ácidos grasos insaturados en semillas de *Hechtia podantha* y *Beaucarnea gracilis*.
- El modelo de viabilidad generado mediante la técnica de NIRS y el quimiométrico (QUANT), ofrece un método confiable de estimación de la viabilidad de semillas de *Beaucarnea gracilis*.

## APENDICE

### Análisis Estadísticos

#### Sección A

Análisis de Varianza (ANOVA Simple) de los Datos referentes a condiciones óptimas de Germinación en semillas de *Hechtia podantha*.

$$H_0: X_1 = X_2 = X_3 \dots \quad H_a: X_1 \neq X_2 \neq X_3 \dots$$

Germinación	G L	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Significancia	F calculada	F tablas
Entre	4	98.56	24.64	0.057	2.75	2.86
Dentro	20	179.2	8.96			

Dado que F calculada es menor que F de tablas no se rechaza la Hipótesis nula, por lo tanto no hay diferencias significativas entre los tratamientos para las condiciones óptimas de germinación

#### Sección B

Análisis de Varianza en bloques (ANOVA Bloques) de los Datos referentes a los bloques (tiempo de envejecimiento) del envejecimiento en semillas de *Hechtia podantha*.

$$H_0: X_1 = X_2 = X_3 \dots \quad H_a: X_1 \neq X_2 \neq X_3 \dots$$

Germinación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Significancia	F calculada	F tablas
Bloques	5	279.86	55.97	0.05	14.27	4.62
Tratamiento	3	751.57	250.52			
Error	15	261.83	17.55			
Total	23	1293.26				

Dado que F calculada es mayor que F de tablas se rechaza la Hipótesis nula, por lo tanto hay diferencias significativas entre los bloques del envejecimiento en semillas de *Hechtia podantha*.

### Prueba de Tuckey

W= 6.97

De acuerdo al valor de w y las diferencias entre las posibles combinaciones e las medias son significativamente los siguientes:

Ácido Oleico en los bloques 12 (7) y 15 (11.29).

Ácido Linoléico en los bloques 3 (11.04), 6 (10.04), 9 (12.66), 12 (18.05) y 15 (29.05).

### Sección C

Análisis de Varianza (ANOVA Simple) de los Datos referentes a condiciones óptimas de Germinación en semillas de *Beaucarnea gracilis*.

Ho:  $X_1 = X_2 = X_3 \dots$

Ha:  $X_1 \neq X_2 \neq X_3 \dots$

Germinación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Significancia	F calculada	F tablas
Entre	7	11.2	1.6	0.8763	0.4253	2.31
Dentro	32	119.2	3.72			

Dado que F calculada es menor que F de tablas no se rechaza la Hipótesis nula, por lo tanto no hay diferencias significativas entre los tratamientos para las condiciones óptimas de germinación

### Sección D

Análisis de Varianza (ANOVA Simple) de los Datos referentes al Ensayo de Envejecimiento Temperatura Baja y Humedad Relativa Alta en semillas de *Beaucarnea gracilis*.

Ho:  $X_1 = X_2 = X_3 \dots$

Ha:  $X_1 \neq X_2 \neq X_3 \dots$

Envejecimiento	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Significancia	F calculada	F tablas
Entre	2	10.67	5.33	0.45	0.91	5.14
Dentro	6	35.33	5.89			

Dado que F calculada es menor que F de tablas no se rechaza la Hipótesis nula, por lo tanto no hay diferencias significativas entre los tratamientos de envejecimiento de temperatura baja y humedad relativa alta en semillas de *Beaucarnea gracilis*.

### Sección E

Análisis de Varianza (ANOVA Simple) de los Datos referentes al Ensayo de Envejecimiento Temperatura Alta y Humedad Relativa Baja en semillas de *Beaucarnea gracilis*.

$$H_0: X_1 = X_2 = X_3 \dots$$

$$H_a: X_1 \neq X_2 \neq X_3 \dots$$

Envejecimiento	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Significancia	F calculada	F tablas
Entre	2	5339.56	2669.78	3.01 <sup>8</sup>	961.12	5.14
Dentro	6	16.67	2.78			

Dado que F calculada es mayor que F de tablas se rechaza la Hipótesis nula, por lo tanto hay diferencias significativas entre los tratamientos de envejecimiento temperatura alta y humedad relativa baja en semillas de *Beaucarnea gracilis*.

### Prueba de Tuckey.

$$W = 4.17$$

Solo una de las diferencias de las medias de los porcentajes de germinación es superior al valor de w y es el correspondiente al tratamiento de 60° C y 58 % de humedad relativa.

### Sección F

Análisis de Varianza en bloques (ANOVA Bloques) de los Datos referentes a los bloques (tiempo de envejecimiento) del envejecimiento en semillas de *Beaucarnea gracilis*.

$$H_0: X_1 = X_2 = X_3 \dots$$

$$H_a: X_1 \neq X_2 \neq X_3 \dots$$



Germinación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Significancia	F calculada	F tablas
Bloques	5	1063.05	212.61	0.05	105.18	4.62
Tratamiento	3	27165.29	9055.09			
Error	15	1291.74	86.09			
Total	23	29519.74				

Dado que F calculada es mayor que F de tablas se rechaza la Hipótesis nula, por lo tanto hay diferencias significativas entre los bloques del envejecimiento en semillas de *Beaucarnea gracilis*.

### Prueba de Tuckey

W= 6.26

De acuerdo al valor de w y las diferencias entre las posibles combinaciones e las medias son significativamente los siguientes:

Ácido Oleico en los bloques 9 (8.97), 12 (12.29) y 15 (24.05).

Ácido Linoléico en los bloques 3 (19.9), 6 (20.15), 9 (38), 12 (40.12) y 15 (53.42)

## BIBLIOGRAFÍA

- Buchvarov, P. and Gantcheff, T. 1984. Influence of accelerated and natural aging on free radicals levels in soybean seeds. *Physiologia Plantarum*. 60: 53-56.
- Camargo-Ricalde., Dhillion, S.S and Jiménez, G. C. 2003. Mycorrhizal perennials of the “matorral xerófilo” and the “selva baja caducifolia” communities in the semiarid Tehuacán Valley, México. *Mycorrhiza*. 13: 77-83
- Cartel, Y. 1997. Ecological status of *Beaucarnea gracilis*, an Endemic Species of the Semiarid Tehuacán Valley, México. *Conservation Biology*. 11(2): 367-374.
- Dell'Aquila, A. 1994. Wheat seed ageing and embryo protein degradation. *Seed Science Research*. 4: 293-298.
- El-Kassaby, Y and Edwards, D. 1998. Genetic control of germination and the effects of accelerated aging in mountain hemlock seeds and its relevance conservation. *Forest Ecology and Management* 112: 203-211.
- Flores, J. 2001. Plant life-form and germination in a Mexican inter-tropical desert: effects of soil water potential and temperature. *Journal of Arid Environments*. 47: 485-497.
- García-Suárez, M. Rico-Gray, V and Serrano, H. 2003. Distribution and the abundance of *Tillandsia* spp. (Bromeliaceae) in the Zapotitlán Valley, Puebla, México. *Plant Ecology*. 166: 207-215.
- Gidrol, X., Serghini, H., Noubhani, A., Mocouot, B and Mazliak. 1989. Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. I. Lipid peroxidation and membrane damage. *Physiologia Plantarum*. 76: 591-597
- Golovina, E. , Tikhonov, A. and Hoekstra, F. 1997. An electron paramagnetic resonance spin-probe study of membrane-permeability changes with seed aging. *Plant Physiology*. 114: 383-389.
- Halistones, M. and Smith, M. 1988. Lipid peroxidation in relation to decline vigour in seeds of soya (*Glycine max* L.) and cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Plant Physiology*. 133: 452-456.
- Harman, G. and Mattick, L. 1976. Association of lipid oxidation with seed ageing and death. *Science*. 206: 323-324

- Hendry, G. 1993. Oxygen, free radical process and seed longevity. *Seed Science Research*. 3: 141-153.
- Hendry G. 1997. Free radical in seeds-moving the debate forward. En: Ellis R., Black M., Murdoch A., Hong T. (Eds.). *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*. Kluwer Academic Publishers. GB. 657-663 pp.
- Hepburn H., Goodman, B., McPhail, D., Matthews, S. and Powell, A. 1986. An evaluation of EPR measurements of the organic free radical content of individual seeds in the non-destructive testing of seed viability. *Journal of Experimental Botany*, 37: 1675-1684.
- Khan, M., Hendry, G., Atherton, N. and Vertucci-Walters, C. 1996. Free radical and lipid accumulation and lipid peroxidation in testas of rapidly aged soybean seeds: a light-promoted process. *Seed Science Research*. 6: 101-107.
- Morrison, W. R. and Smith, L.M. 1964. Preparation of fatty acid methyl ester and dimethylacetals from lipids with Boron Fluoride-methanol. *Journal of Lipids Research*. 5: 600-608
- Munck, L., Pram, N., Moller, B., Jacobsen, S., Sondergaard, I., Engelsen, S., Norgaard, L. and Bro, R. 2001. Exploring the phenotypic expression of a regulatory proteome-altering gene by spectroscopy and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*. 446: 171-186.
- Ohlrogge, J. and Kernan, T. 1982. Oxygen-dependent aging of seeds. *Plant Physiology*. 70: 791-794.
- Pérez-Vich, B., Velasco, L. and Fernández-Martínez, J. 1998. Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 5: 547-555.
- Powell, A. and Harman, G. 1985. Absence of a consistent association of changes in membranal lipids with the ageing of pea seeds. *Seed Science and Technology*. 13: 659-667.
- Priestley, D. and Leopold, C. 1979. Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. *Plant Physiology*. 63: 726-729.

- Priestly, D. Werner, B. Leopold, C. and McBride, M. 1985. Organical free radical levels in seeds and pollen: The effects of hydration and aging. *Physiology Plantarum*. 64: 88-94
- Priestley, D. 1986. Seed ageing. Cornell University Press. USA. 39-75.
- Pucacka, S. 1998. Changes in membrane fatty acid composition during desiccation of seeds of silver maple. *Seed Science and Technology*. 26: 535-540.
- Roberts, E. and Ellis R. 1989. Water and seed survival. *Annals of Botany*. 63: 39-52.
- Rzedowski, J. y Rzedowski, G. 1990. Flora Fanerogámica del Valle de México. III. Monocotyledoneae. Instituto de Ecología. pp. 250-251.
- Sacandé, M. Buitink, J. and Hoestra, F. 2000. A study of water relations in neem (*Azadirachta indica*) seed that is characterized by complex behavior. *Journal of Experimental Botany* 51(341): 635-643.
- Serrano, H., Solano, E. y Ocampo, A. 2000. Morfología de las semillas, germinación y desarrollo postemergente de tres especies del género *Polygonum* L. (AGAVACEA). Bol. Soc. Bot. México. 66: 55-65
- Shanklin, J and Edgar, B. 1998. Desaturation and related modifications of fatty acid. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.* 49:611-641
- Stewart, R. and Bewley. P. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology*. 65: 245-248.
- Stuart, B. and Ando, D. 1997. Biological Applications of Infrared Espectroscopy. ACOL (University of Greenwich).
- Velasco, L., Fernández-Martínez, J. and De Haro, A. 1997. Determination of the fatty acid composition of the oil in intact-seed mustard by near-infrared reflectance spectroscopy. *American Oil Chemists' Society*. 74: 1595-1602.
- Velasco, L., Matthäus, B. and Möllers, C. 1998 a. Nondestructive assessment of sinapic acid esters in *Brassica* species: I. Analysis by near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science*. 38: 1645-1650.
- Velasco, L. and Möllers, C. 1998 b. Nondestructive assessment of sinapic acid esters in *Brassica* species: II. Evaluation of germoplasm and identification of phenotypes with reduced levels. *Crop Science*. 38: 1650-1654.

- Velasco, L., Möllers, C. and Becker, H. 1999. Estimation of seed weight, oil content and fatty acid composition in intact single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. *Euphytica*. 106: 79-85.
- Vergara, F. 2002. Inducción de envejecimiento artificial en semillas de *Stenocereus stellatus* y *Brassica napus* L. y su posible relación con la peroxidación de ácidos grasos. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Walters, C and Ross, E. 1993. Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Science Research*. 3: 201-213
- Wilson, D. and McDonald, M. 1986. The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Science and Technology*. 14: 269-300.