



UNAM

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Peroxidación de ácidos grasos de semillas de
Neobuxbaumia tetetzo y *Neobuxbaumia mezcalaensis* en
condiciones de almacenamiento a largo plazo”**

TESIS

que para obtener el título de

BIOLOGO

Presenta

Lozada Villegas Yolanda

Director de Tesis: Dr. CESAR MATEO FLORES ORTIZ



Los Reyes Iztacala, Estado de México

Abril del 2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicatoria

A mi madre por su esfuerzo, dedicación, tenacidad y cariño para que yo pudiera llegar hasta este momento.

A mi padre, por darme todo su apoyo y por encaminar mi vida hasta este momento.

A mi hermana Alicia por todas nuestras diferencias y sus regaños, por tenerme paciencia.

A mi hermana Lucía por su patrocinio y apoyo en mi carrera, a pesar de tener un carácter tan temperamental

A todos ustedes por compartir los buenos y también los difíciles momentos de nuestras vidas.

A mi amiga del alma Virginia aunque nos separe la distancia siempre estas presente y gracias por creer en mi.

Finalmente a mis fieles mascotas y compañeros de desvelo, missi, neco, toto y en estos últimos momentos a percy.

Agradecimientos

Al Dr. César Mateo Flores Ortiz por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo, por enseñarme a que nunca hay que dejar de preocuparse y por el compartir el gusto de la fotografía.

A la M en C Josefina Vázquez Medrano por su apoyo incondicional y por estar siempre dispuesta a ayudar, además quiero que sepa que la admiro mucho y a su vocación de enseñar y dar lo mejor de sí, sin esperar nada a cambio. Al Biol. Rafael Quintanar Zúñiga por su particular sentido del humor.

Al Biol. Luis Barbo Hernández Portilla por todo su tiempo dedicado para asesorarme durante la realización de este trabajo, recibe mi más sincero agradecimiento. A la Biol. Maritza Zavaleta Pastor por su apoyo en el comienzo de este proyecto.

A la M en C Martha Urzúa Meza y a la Biol. Margarita Moreno por siempre estar al pendiente de que las cosas salgan bien.

A todos y cada uno de ustedes por permitirme trabajar en su maravilloso equipo de trabajo, y por hacerme sentir como en casa.

Al M en C Ernesto Aguirre León por su amabilidad y sencillez que lo caracteriza y por las facilidades otorgadas por parte del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales para la realización de este trabajo.

A Meztli por ser una amiga incondicional te agradezco la oportunidad de conocerte, por siempre apoyarme en mis decisiones y creer en mí. A Hyrais por ser como eres, toda ternura.

A mis compañeras Beta y Giovanna quiero que sepan que fue un gusto trabajar con ustedes.

A Bere, Azu y Chely por compartir una buena parte de buenos y a veces estresantes momentos durante casi toda la carrera.

Al Programa de Becas PROBETEL por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, con número de proyecto IN201405, por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

Índice.

Resumen	1
Introducción	2
Envejecimiento de semillas	3
Clasificación de las semillas	4
Formación de radicales libres en semillas	4
Mecanismo de peroxidación de ácidos grasos insaturados	5
Detección de la peroxidación de los ácidos grasos	6
Espectroscopia de Refractancia en Infrarrojo Cercano	8
Descripción del material de estudio	10
<i>Neobuxbaumia tetetzo</i>	10
<i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i>	11
Antecedentes	13
Hipótesis	15
Objetivos	15
Objetivo General	15
Objetivos Particulares	15
Metodología	16
Condiciones de germinación	16
Tratamientos de envejecimiento acelerado	16
Extracción y transesterificación de ácidos grasos en semillas	17
Análisis de ácidos grasos por GC-MS	18
Registro del espectro de infrarrojo en semillas mediante el NIRS	18
Modelo Quimiométrico	19
Electroforesis en geles de poliacrilamida para el estudio de proteínas totales	19

Análisis estadístico	19
Resultados	20
Identificación y niveles de ácidos grasos mediante GC-MS	20
<i>Neobuxbaumia tetetzo</i>	21
Germinación	21
Tratamientos de envejecimiento acelerado	21
Germinación y niveles de ácidos grasos	23
NIRS y Quimiométrico	24
Germinación real contra estimada mediante NIRS	25
Contenido real de ácidos grasos insaturados contra estimados mediante el NIRS	26
<i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i>	27
Germinación	27
Tratamiento de envejecimiento acelerado	27
Germinación y niveles de ácidos grasos	30
NIRS y Quimiométrico	31
Germinación real contra estimada mediante NIRS	32
Contenido real de ácidos grasos insaturados contra estimados mediante el NIRS	33
Estudios de proteínas totales	34
Discusión	36
Conclusiones	41
Referencias	42
Apéndice	48

Resumen.

Durante la conservación de los acervos de semillas se requiere que éstas sean evaluadas periódicamente, una alternativa no destructiva para determinar la viabilidad es a través de los métodos quimiométricos, los cuales pueden de generar un modelo para determinar en forma no destructiva la germinación mediante la espectroscopia de refractancia en infrarrojo cercano (NIRS). Por lo que en el presente trabajo se determinó la correlación de los espectros de infrarrojo con los niveles de ácidos grasos insaturados además de la germinación en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* y *Neobuxbaumia mezcalaensis* en condiciones de almacenamiento de largo plazo, evaluando la concentración de ácidos grasos insaturados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la obtención de los espectros de infrarrojo con el accesorio de refractancia difusa de las semillas. Para los experimentos de envejecimiento acelerado, ambas especies fueron tratadas a 45°C y 65%HR durante 18 días. En *N.tetetzo* la germinación se redujo del 100% al 1% , así como el ácido oleico de 0.044 a 0.040 µg/g y ácido linoléico de 0.034 a 0.031 µg/g. Adicionalmente los valores de correlación en el modelo quimiométrico fueron para el oleico $R^2= 0.68$, linoléico $R^2=0.75$ y para germinación $R^2= 0.99$. Por otra parte en *N. mezcalaensis* la germinación disminuyó de 100% a 2% , así como el ácido oleico de 0.030 µg/g a 0.026 µg/g y el ácido linoléico de 0.023 µg/g a 0.020 µg/g. Los valores de correlación en el modelo quimiométrico para los ácidos oleico y linoléico, así como la germinación, fueron de $R^2= 0.99$. Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se establece que la técnica del NIRS es confiable y no destructiva para estudiar la viabilidad de las semillas.

Introducción.

Una de las formas más efectivas de conservar al germoplasma *ex situ* es a través de los bancos de semillas; estos son ecológica y evolutivamente importantes para muchas especies de plantas (Lohengrin, 1999); en los cuales se puede depositar un amplio rango de especies para su conservación por largos periodos de tiempo.

Los bancos de germoplasma se clasifican según el tipo de muestra en: Bancos de semillas, Bancos de Campo y Bancos de cultivo de tejidos (*in vitro*) (Jaramillo y Baena, 2000).

Se considera que existen dos tipos de bancos de semillas: el banco de semillas en el suelo y el banco de semillas manipulado por el hombre. El primero constituye el conjunto de semillas no germinadas capaces de reemplazar a las plantas adultas, por otra parte los bancos de semillas manipulados por el hombre representan la diversidad de muchas especies que han sido manipuladas a través del tiempo (Lohengrin, 1999).

En teoría todas las especies se pueden conservar *ex situ*, siempre y cuando se puedan multiplicar. Tradicionalmente se han conservado *ex situ* recursos importantes para el hombre como las especies útiles en la alimentación y la agricultura (Jaramillo y Baena, 2000).

Durante la conservación de los acervos de 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 dentro de los cuales se encuentra el envejecimiento de las semillas (Zavaleta, 2003).

Cabe mencionar que las técnicas generalmente empleadas requieren la disección del germoplasma o de la germinación, las cuales merman progresivamente 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 evaluar la viabilidad de las muestras de las colecciones sin disminuir su cantidad (Zavaleta, 2003).

Envejecimiento de semillas

El envejecimiento es un proceso progresivo que conlleva alteraciones que se producen en un organismo con el paso del tiempo y, que conducen a la pérdida funcional y a la muerte (Gómez, 2000). En semillas el envejecimiento determina el vigor de las mismas, así como su nivel fisiológico de deterioro (Priestley, 1986). El deterioro empieza después que la semillas alcanzan su maduración fisiológica y continúa hasta perder su capacidad de germinar (Delouche, 2002). Todos los cambios, incluyendo las alteraciones fisiológicas deletéreas que ocurren en las semillas durante el almacenamiento se deben al tiempo, además de otros factores tales como condiciones de maduración, integridad física y otros (Priestley, 1986).

El proceso de envejecimiento de las semillas se ha vinculado con cambios que ocurren en las principales biomoléculas del embrión, 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 el ADN alterado o el cambio en los 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, las cuales, son las principales características del envejecimiento en semillas (Hendry, 1993).

Un radical libre es una especie química que contiene un electrón desapareado, la presencia de un electrón desapareado modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula haciéndola más reactiva con otras moléculas (Zentella, y Saldaña, 1996).

Clasificación de las Semillas

Las semillas se pueden clasificar en dos grupos dependiendo de su capacidad para deshidratarse en recalcitrantes y ortodoxas. Las primeras no soportan la deshidratación o enfriamiento sin que se altere de manera drástica su capacidad de germinación, muriendo en la mayoría de los casos en un lapso de tiempo breve, además de que se caracterizan por tener tasas de respiración altas en las cuales los radicales libres son generados en los ejes embrionarios después de haber sido deshidratadas (Hendry, 1997). Por otro lado, en las semillas ortodoxas se caracterizan por tener tasas de respiración bajas y la viabilidad puede prolongarse por un largo periodo de tiempo al ser introducidas en los bancos de semillas (Cuevas, 2000).

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. Este proceso ocurre cuando en el transcurso de la cadena de transferencia electrónica ocurren fugas de electrones. Adicionalmente, la ausencia o disminución de mecanismos de protección; tales como antioxidantes constitutivos o la actividad de enzimas como las peroxidasas y las 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 se sabe con precisión si estas rutas están presentes y activas en semillas ortodoxas (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. 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).

Los ácidos grasos insaturados son más susceptibles al ataque por radicales libres, pues los hidrógenos unidos a los carbonos que forman el doble enlace 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 (radical superóxido, radical peróxido, radical hidroxilo), 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 diversa, dando como resultado una gran variedad de productos (Wilson y Mc Donald, 1986).

La membrana biológica representa un sitio importante de lesión directa de la peroxidación de los lípidos, ya que posee una superficie muy amplia y los lípidos presentes son más insaturados que los de reserva, además, existe la evidencia de que la peroxidación aumenta la permeabilidad de la membrana perdiendo así su integridad. En consideración de lo anterior, la peroxidación lipídica es dañina para las semillas en tres formas: por la destrucción de los lípidos membranales, por la disminución de la integridad de la membrana y por la formación de aldehídos citotóxicos que pueden inactivar proteínas (Wilson y Mc Donald, 1986).

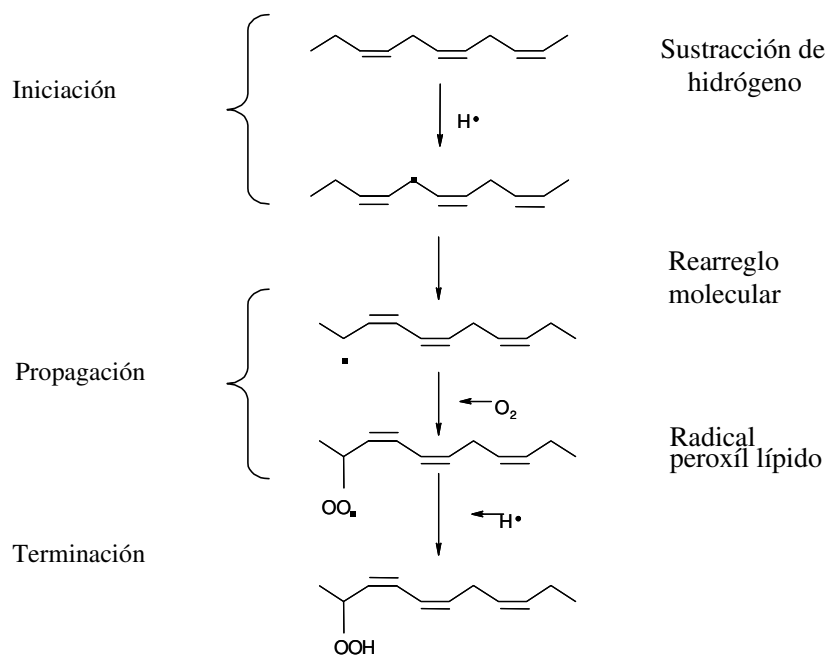


Figura 1. Mecanismo de formación de radicales libres (Tomado de Wilson y Mc Donald, 1986).

Detección de la peroxidación de los ácidos grasos

Los trabajos que analizan la peroxidación de los ácidos grasos en las semillas se pueden clasificar en tres grandes grupos: Monitoreo de la disminución de lípidos; detección directa de radicales libres y detección de productos secundarios. Generalmente, la estimación de los índices de peroxidación y deterioro de la semilla, se establecen mediante la comparación de los valores obtenidos para cada método entre muestras envejecidas y muestras frescas de referencia (Wilson y Mc Donald, 1986).

Para el monitoreo de ácidos grasos en las semillas, existen diversas técnicas de cuantificación, como es el caso de la determinación total de insaturaciones a través de oxidantes como el yodo, o bien, la extracción exhaustiva de los lípidos y la posterior transesterificación de los acilgliceroles y fosfolípidos mediante agentes acoplantes como el BF_3 , u otros nucleófilos como el metóxido de sodio. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos se analizan mediante cromatografía de gases con detectores de ionización de flama o bien detectores de masas (Wilson y Mc Donald, 1986).

En cuanto a la detección directa de radicales libres, generalmente se utilizan metales reducidos como el ion ferroso o el ion cuproso que actúan como donadores de electrones; estos metales son oxidados por la reacción espontánea que ocurre con los radicales libres, debido a la tendencia que presentan para completar su capa electrónica externa, finalmente, la cuantificación de los radicales libres presentes se realiza a través del registro colorimétrico de la disminución del estado reducido del metal (Wilson y Mc Donald, 1986).

En la determinación de productos de la peroxidación de ácidos grasos, se ha establecido una clara correlación entre la presencia del malondialdehído y la peroxidación. La técnica para la cuantificación de este compuesto consiste en la precipitación de interferencias y la utilización de ácido tiobarbitúrico que reacciona con el malondialdehído formando un aducto colorido, el cual se cuantifica utilizando los valores espectroscópicos de extinción molar mediante un espectrofotómetro (Wilson y Mc Donald, 1986, Vergara, 2002).

Además de éstas técnicas existen otras que tratan de detectar la peroxidación de ácidos grasos en semillas y de correlacionarla con el tiempo, ya sea en semillas envejecidas naturalmente o artificialmente, principalmente por:

- La detección de ácidos grasos saturados e insaturados durante el envejecimiento utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS,

por sus siglas en inglés), cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID, por sus siglas en inglés) (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).
- 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 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).

Estos métodos muestran una gama diversa de ventajas y desventajas, sin embargo, es necesaria la extracción de los componentes de la semilla para su análisis, o bien la germinación, con lo cual el germoplasma se pierde.

Espectroscopia de Refractancia en Infrarrojo Cercano

La espectroscopía de infrarrojo emplea un rango de baja energía del espectro electromagnético, y en particular, la región espectral del infrarrojo cercano (NIRS, por sus siglas en inglés), que se extiende desde el extremo superior de longitudes de onda visible, alrededor de 750 nm a 2500 nm (Frecuencias de 13000 a 4 000 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 cm^{-1} (C-H, N-H, y O-H) (Stuart y Ando, 1997).

La determinación de los niveles de organización biológicos y químicos mediante la técnica de NIRS, ha sido posible por el uso de programas quimiométricos, los cuales están basados en algoritmos de correlación multivariada de mínimos cuadrados parciales (PLS, por sus siglas en inglés), generando así una huella digital fisicoquímica que permite realizar predicciones (Munck *et al*, 2001).

Las ventajas que ofrecen los programas 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 (Velasco *et al*, 1998).

Descripción del material de estudio

Las semillas que se estudiaron son de las especies *Neobuxbaumia tetetzo* y *Neobuxbaumia mezcalaensis* correspondientes a una colecta de Junio del 2001.

Neobuxbaumia tetetzo

Esta especie es endémica de México (Figura 2) se distribuye en los Estados de Puebla y Oaxaca. En Puebla se encuentra formando grandes tetecheras en Zapotitlán de las Salinas, Calipan y San Sebastián Zinacantepec. En Oaxaca se distribuye ampliamente en el Cañon de Tomellín y entre Totolapan y Tehuantepec (Arias, 2000).

Plantas columnares de 1.5 a 15 m de alto, tallos simples o poco ramificados, con las ramas erectas y poco divergentes, tronco principal de 9 a 60 cm de diámetro. Ramas de color verde grisáceo claro, costillas de 13 a 17 a veces más. Areolas casi redondas de 10 a 15 mm distantes entre sí de 7 a 35 mm, provistas de abundante fieltro amarillo claro, cuando son jóvenes, y gris en las partes adultas (Flores, 2004). Espinas radiales 7 a 12 o a veces 2 o ninguna de 5 a 20 mm de largo, espinas centrales 1 a 3 la mayor hasta de 3 a 4 cm. Flores nocturnas que nacen en el ápice de las ramas tubular-infundibuliformes, de 5.5 cm de longitud, de color blanco verdoso, estambres numerosos, filamentos blancos, anteras de color crema. Fruto ovoide de 4 cm de diámetro, color verde rojizo, provisto de podarios con escamas dehiscencia irregular con forma de estrella. Semillas pequeñas, oblicuo-reniformes de 2 mm de largo, color moreno oscuro brillante (Bravo-Hollis, 1978).

Su periodo de floración es entre los meses de Mayo y Julio, su uso tradicional va desde el consumo de las flores, frutos en forma deshidratada y las semillas en forma de salsa, hasta el aprovechamiento como madera proveniente del tronco de esta planta (Arias, 2000).



Figura 2. Planta adulta de *Neobuxbaumia tetetzo*.

Neobuxbaumia mezcalaensis

Esta especie también es endémica de México (Figura 3) se localiza desde los Estados de Puebla, Oaxaca, Morelos, Jalisco, Colima, Michoacán y Guerrero (Arias, 2000). Plantas columnares, presentan un tronco color verde-amarillento, éste alcanza desde 5 hasta 30 m de altura y un diámetro entre 13 a 40 cm. Los tallos generalmente no presentan ramificaciones o si las presentan éstas se producen por traumatismos tanto en tallos, como en los ápices. Costillas 13 a 25 angostas, angulada. Areolas obovado-deltaideas distantes entre sí de 18 a 26 mm, con fieltro blanco que con el tiempo se vuelve grisáceo (Flores, 2004). Espinas radiales 5 a 9, extendidas, radiantes, aciculares, de 8 a 20 mm de longitud. Espinas centrales 1 a 4 poco más largas que las radiales, rectas a ligeramente encorvadas. Flores que nacen a lo largo del tallo, nocturno matutinas, por fuera de color blanco amarillento verdoso hasta rojo purpurino verdoso, tubular-infundibuliformes de 5.5 cm de largo, estambres numerosos. Fruto globoso u obpiriforme-

ovoide, de 3 a 4 cm de largo, pulpa blanca no jugosa. Semillas oblicuo-reniformes, de 2.5 a 3 mm de largo, testa lisa, negra, brillante, con ornamentación celular hexagonal (Bravo-Hollis, 1978).

Su periodo de floración va de los meses Marzo a Mayo, algunas personas comen sus frutos (Arias, 2000).



Figura 3. Planta adulta de *Neobuxbaumia mezcalaensis*.

Antecedentes

La germinación de las semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* es del 95% entre 2 y 5 días a una temperatura que oscila entre 20-25°C con un fotoperiodo de 12 horas luz 12 horas oscuridad (Godínez-Álvarez, y Valiente-Baunet, 1998).

La técnica de NIRS 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).

Con respecto a los análisis quimiométricos, éstos han sido utilizados en diversos estudios Flores *et al* (2003) utilizó un método instrumental basado en un modelo quimiométrico de la región del infrarrojo medio para analizar el azúcar total y las proporciones de glucosa, fructosa y sacarosa del néctar floral de *Pachycereus pecten-arboriginum* y *Ceiba parviflora*. El coeficiente de la correlación para la concentración de azúcar total fue de 0.956, para la glucosa, fructosa y sacarosa fueron respectivamente de 0.982, 0.972, y 0.922. El método muestra la utilidad potencial para la predicción de componentes de azúcar de néctar.

Se han realizado estudios con semillas de *Brassicaa 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). 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).

En semillas de *Brassica napus* y *Stenocereus stellatus*, se obtiene una correlación significativa en la predicción de la concentración de ácidos grasos, por medio de la técnica

de NIRS en la 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) generan una disminución en los ácidos grasos siendo mas clara para los insaturados en ambas especies; no obstante esos tratamientos no lograron producir una disminución significativa de la germinación (Vergara, 2002).

En semillas de *Beaucarnea gracilis* se mostraron valores altos de predicción de ácidos grasos y viabilidad, en tanto que en semillas de *Hechtia podantha*, la relación entre cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GG-MS) y espectroscopia de reflectancia en infrarrojo cercano (NIRS) fue baja, en cuanto a la viabilidad de las semillas se encontró que después de aplicar tratamientos de envejecimiento acelerado, el tiempo medio de germinación en semillas de *Hechtia podantha* aumentó de 4.55 a 18.5 días, reducción de la germinación del 96 al 1.33 %, en semillas de *Beaucarnea gracilis* aumento de 5.7 a 28.4 días, reducción de la germinación del 98 al 3.3 % . (Zavaleta, 2003).

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 objetivos siguientes:

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 *Neobuxbaumia tetetzo* y *Neobuxbaumia mezcalaensis* 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 obtener un modelo mediante un programa Quimiométrico, que permita predecir el nivel de los mismos.
- Correlacionar los espectros de NIRS con los resultados obtenidos de germinación para obtener un modelo mediante un programa Quimiométrico, que permita predecir la germinación o nivel de envejecimiento de las semillas.
- Determinar si se afecta la expresión de proteínas totales en las semillas posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado empleado.

Metodología.

Condiciones de germinación

Las semillas que se utilizaron pertenecen a una colecta de Junio de 2001, las cuales se limpiaron con una solución de Tween al 1% durante 5 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada. 25 semillas limpias se colocaron en una caja de Petri con agar bacteriológico al 1% (esterilizado 15 minutos a 120°C, 15 lb/ρ²) y se mantuvieron en una cámara de germinación a una temperatura de 25°C y un fotoperíodo de 12 horas de luz (n=3) (Flores, 2001; Godínez-Álvarez, Valiente-Baunet, 1998).

Tratamientos de envejecimiento acelerado

Se utilizaron recipientes de plástico con tapa hermética (cámaras de envejecimiento), cuyo interior contuvo una caja de petri, en la cual se depositó 0.2 g semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* y en otro recipiente 1 g de Semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis* el tratamiento de envejecimiento acelerado utilizado fue: 65 % de humedad relativa y una temperatura de 45°C (n=3).

Para generar la condición de humedad en las cámaras de envejecimiento (Figura 4) se colocaron 15 ml de una solución de LiCl al 25.39% (Hay, Tietmeyer, en prensa), para mantener una humedad relativa del 65 %; los recipientes se mantuvieron en estufas a 45°C para generar el envejecimiento acelerado, en condiciones de oscuridad (n=3). La muestra blanco se mantuvo en una cámara de envejecimiento a temperatura y humedad relativa ambiental, en condiciones de oscuridad. Las semillas sometidas a estos tratamientos se colocaron a germinar previa limpieza, durante 5 minutos en alcohol al 30% y 15 minutos en una solución de NaClO al 1%, para evitar la contaminación (n=3).



Figura 4. Cámara de envejecimiento acelerado.

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 *Neobuxbaumia tetetzo* y *Neobuxbaumia mezcalaensis* se pulverizaron con Nitrógeno líquido con ayuda de mortero y pistilo, descongelando en atmósfera de nitrógeno gaseoso, se adicionó 1 ml de CHCl_3 :Metanol (2:1) y se maceró durante tres minutos. Transcurrido este tiempo se recuperó la muestra en un tubo de eppendorf y posteriormente se agitó en un vortex durante cinco 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 a 4°C, para evitar la oxidación (Priestley, *et al* 1985). Para llevar a cabo la transesterificación, se tomó una alícuota de 100 μl de la fase orgánica y se evaporó con nitrógeno, posteriormente se adicionaron 0.5 ml de BF_3 al 12% en metanol y se colocó en ebullición durante 20 minutos. Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se recuperó con 1 ml de hexano; finalmente, se adicionaron 0.5 ml de agua destilada para lavar la muestra (Priestley, 1985 y modificado de Morrison, 1964). Para la cuantificación de los ácidos grasos se empleó como estándar interno el ácido heptadecanoico.

Análisis de ácidos grasos por GC-MS

El análisis de la composición de ácidos grasos, se llevo a cabo en un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas Finnigan MAT GCQ. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: inyección en modo splitless, 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 aumento 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⁻¹. 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 electron-Volts (eV). Se inyectaron 2 µl de los ácidos grasos derivatizados. 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, National Institute of Standards and Technology).

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 refractancia difusa (Spectra Tech), colocando 100 mg de semillas en la portamuestra. Con un intervalo de lectura de 7,800 a 600 cm⁻¹, 16 barridos y una resolución de 4 cm⁻¹, registrándose el logaritmo del recíproco de la refractancia (log 1/R).

Modelo Quimiométrico

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 Mínimos Cuadrados Parciales, y previo a la calibración se realizó la corrección de la línea base, a través de la derivada de segundo orden con una amplitud de 49 puntos.

Electroforesis en geles de poliacrilamida para el estudio de proteínas totales

Para el estudio de proteínas totales se llevó el siguiente procedimiento: 50 mg de semillas de *N. tetetzo* y *N. mezcalaensis* se maceraron en un buffer de homogenización Tris-HCl 50 mM pH 7.3, el homogenizado se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos, todo este procedimiento se llevó a cabo a 4°C para evitar la desnaturalización de las proteínas. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12.5 %, utilizando dodecilsulfato de sodio (SDS). Los extractos de cada especie se sembraron a una concentración de 15 µg de proteína en cada poza, usando un sistema MINIPROTEAN III (Bio-Rad). Los geles se corrieron a 250 V, 50 mA por una hora en un buffer de corrida Tris 24.8 mM, glicina 192 mM pH 8.3, SDS al 0.1%. La electroforesis fue detenida cuando el frente indicador de azul de bromofenol llegó a la parte más inferior del gel. Para el fijado de las proteínas se utilizó una solución de Metanol: ácido acético durante 20 minutos. En el revelado de las proteínas se utilizó una solución de sulfato de amonio en Bradford (Laemli, 1970).

Análisis Estadísticos

Se utilizó Análisis de Varianza (ANOVA) simple (Daniel, 2002), las diferencias se corroboraron con la prueba de Tukey, con • una probabilidad de (<0.05).

Resultados

Identificación y niveles de ácidos grasos

La transesterificación realizada para el análisis mediante el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas permitió identificar principalmente los siguientes ácidos grasos: Oleico, Linoléico y Estearico. 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 la concentración de los ácidos grasos, es decir, mediante el registro del área bajo la curva de los mismos y del patrón interno.

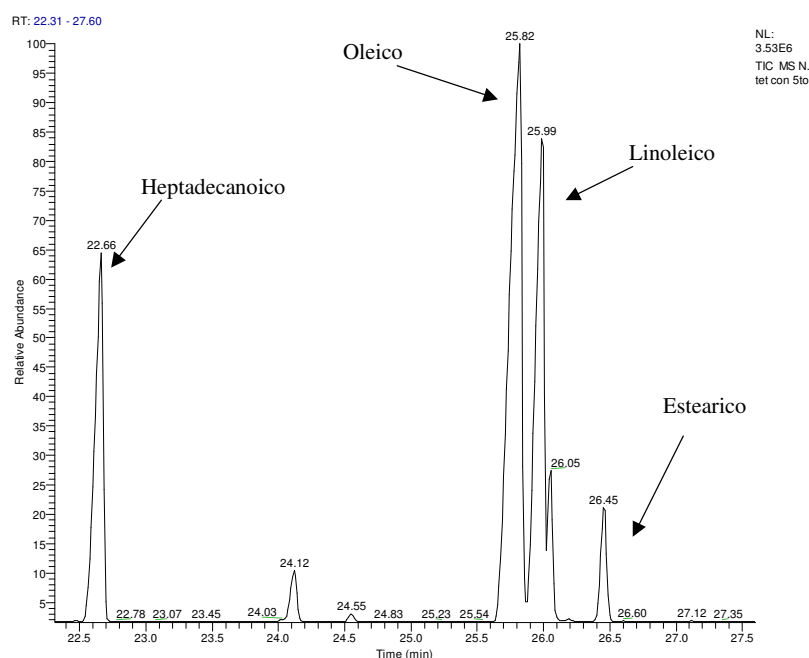


Figura 5. Cromatograma de los ácidos grasos presentes en las semillas.

Neobuxbaumia tetetzo

Germinación.

Las semillas de *N. tetetzo* no requieren de ningún tratamiento de escarificación química o mecánica para inducir a la germinación, siendo ésta del 100 % para el grupo control.

Tratamientos de envejecimiento acelerado.

Con el propósito de generar un gradiente de envejecimiento acelerado, se decidió utilizar distintas humedades relativas las cuales fueron: 15%, 20%, 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% y 95% a 45°C. En dichas humedades relativas la germinación no se vio afectada después de someterlas a los tratamientos de envejecimiento acelerado correspondientes a 15%, 25% 30% y 35% de HR a 45°C, aunque a partir del 65% de humedad relativa se ve reducido el porcentaje de germinación, en las subsecuentes humedades relativas la germinación se pierde totalmente (Figura 6).

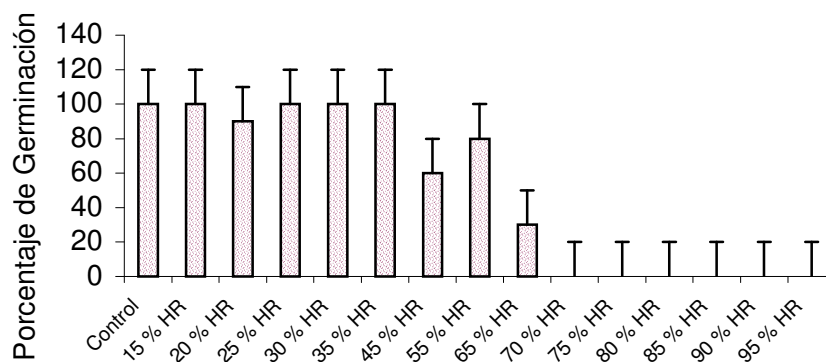


Figura 6. Se muestra el porcentaje de germinación en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* posterior a los tratamientos de envejecimiento acelerado a 45°C y diferentes humedades relativas durante 20 días.

Con base en los resultados anteriores se decidió utilizar el tratamiento de 65% de humedad relativa y 45°C, ya que fue notorio que la humedad relativa fue determinante para generar un gradiente de longevidad en las semillas de ambas especies y no así la temperatura, ya que, a 50°C la germinación de las semillas estudiadas no se ve afectada, probablemente porque son semillas de tipo silvestres y su hábitat se caracteriza por condiciones extremas de temperatura y baja humedad relativa.

El tratamiento de envejecimiento acelerado empleado (65% HR/45°C) tiene efecto sobre la germinación de las semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* formado un gradiente de envejecimiento en el cual se reduce su porcentaje de germinación del 100% hasta el 1 % después de 18 días de tratamiento como se puede apreciar en la figura 7. La disminución del porcentaje de germinación es significativa estadísticamente. (Apéndice sección I).

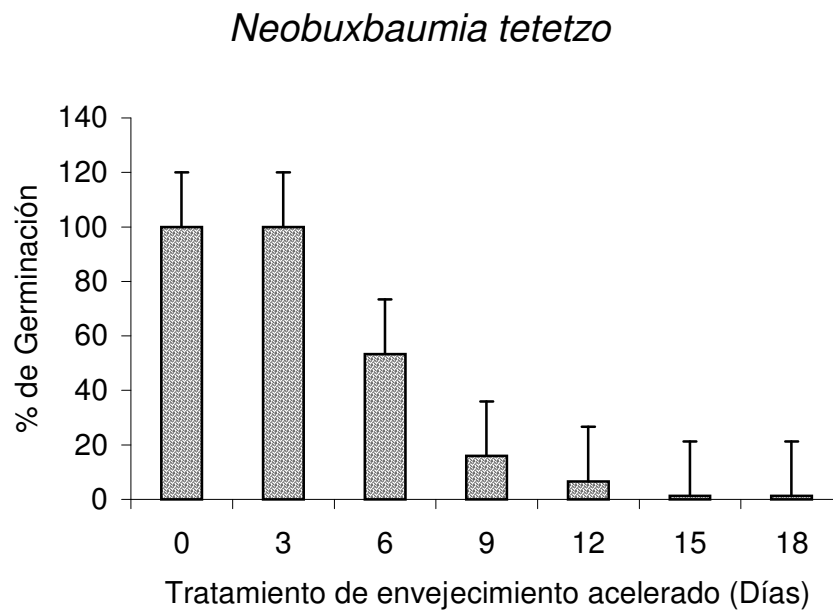


Figura 7. Porcentaje de germinación de las semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* después del tratamiento de envejecimiento acelerado (65% Humedad Relativa a 45°C durante 18 días con registro cada 3 días, n=3).

Si bien el tiempo medio de germinación de esta especie es de 3 días, después de emplear el tratamiento de envejecimiento acelerado (65% HR/ 45°C) éste no aumenta, sin embargo si se logra formar un gradiente de envejecimiento el cual se refleja en el porcentaje de germinación (Figura 8).

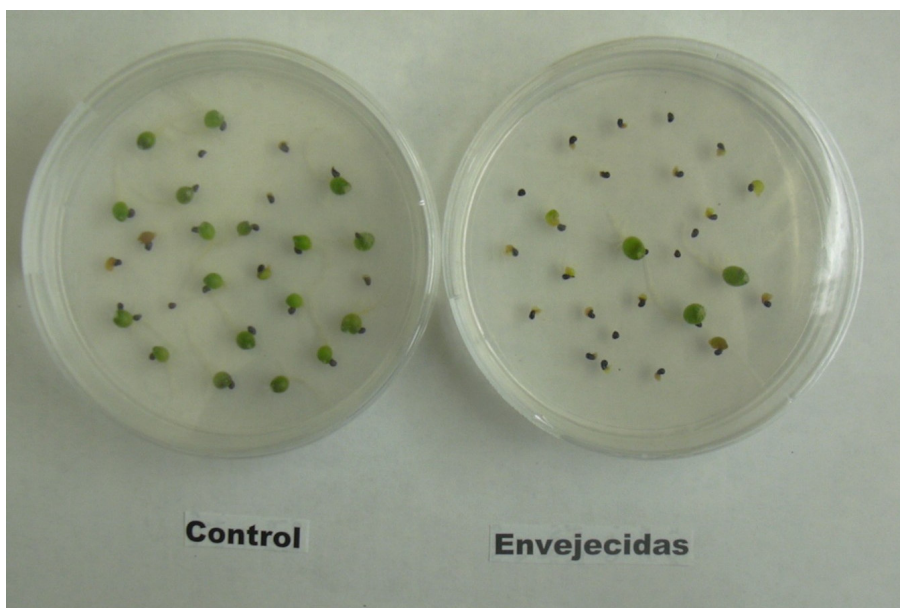


Figura 8. Efecto del tratamiento de envejecimiento acelerado (65% HR/ 45°C durante 9 días de tratamiento, n=3) sobre la germinación de semillas de *N. tetetzo* nótese la disminución del porcentaje de germinación de la muestra sometida a envejecimiento.

Germinación y Niveles de Ácidos grasos

Se puede apreciar de manera clara el decremento del porcentaje de germinación así como en la concentración de los niveles de ácidos grasos en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo*. En la figura 9 se observa la tendencia a disminuir hasta llegar al día 18, ya que la germinación disminuye del 100% (control) a 1 %; en cuanto a los niveles de ácidos grasos insaturados el ácido oleico disminuye de 0.044 µg/g (Control) a 0.040 µg/g y para ácido Linoléico de 0.03419 µg/g a 0.0315 µg/g. En lo que respecta al ácido esteárico muestra un comportamiento constante durante el tratamiento de envejecimiento.

Por lo que el tratamiento empleado resultó ser lo suficientemente drástico para afectar la viabilidad de las semillas estudiadas. La disminución del contenido de los ácidos insaturados no fue significativa estadísticamente. (Apéndice sección II y III).

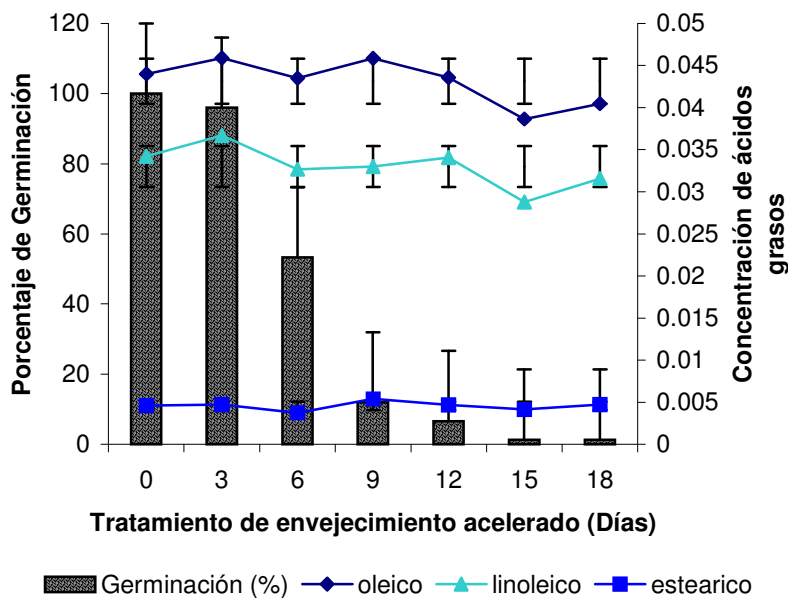


Figura 9. Se muestra el gradiente de envejecimiento generado después del tratamiento de envejecimiento acelerado (65% Humedad Relativa a 45°C durante 18 días con registro cada 3 días, n=3) en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo*.

NIRS y Quimiométrico (QUANT+)

El análisis quimiométrico realizado por el programa QUANT+, con los espectros de infrarrojo, generó valores de calibración del método superior al 80 % de Varianza, la cual es equivalente al coeficiente de correlación. (Tabla1).

Los valores aceptados de calibración de los modelos quimiométricos son del 80%; por lo que los resultados obtenidos fueron satisfactorios.

Tabla1. Resultados obtenidos mediante la calibración del quimiométrico (QUANT+) en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo*.

	% de Varianza	Error estándar estimado	Error estándar de la predicción
Oleico	84.80	0.001573	0.004246
Linoléico	81.49	0.001481	0.003922
Esteárico	95.11	0.0003793	0.001505
Germinación	99.54	2.873	3.202

Germinación real contra estimada mediante NIRS

La estimación de la germinación generada por el quimiométrico resultó satisfactoria de acuerdo con los datos experimentales con un valor de $R^2=.99$ durante el tratamiento de envejecimiento acelerado (Figura 10).

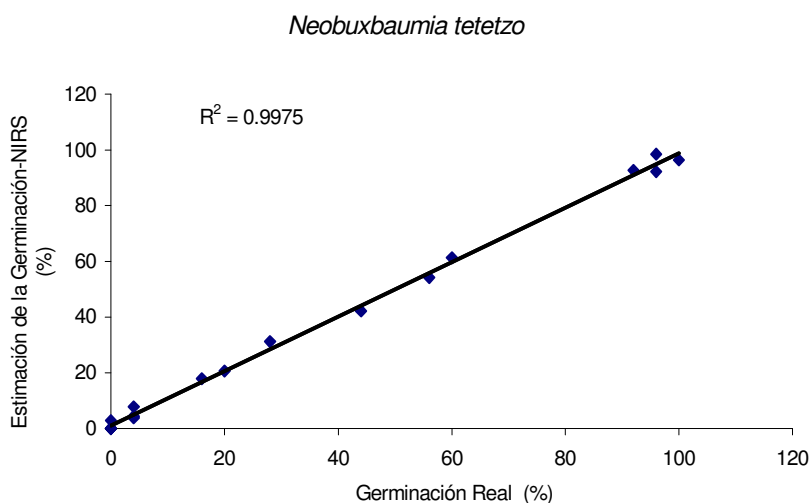


Figura 10. Se muestra el porcentaje de germinación real contra el estimado mediante el modelo quimiométrico en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo*, posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado (65% Humedad Relativa a 45°C durante 18 días con registro cada 3 días, n=3).

Contenido real de ácidos grasos insaturados contra estimados mediante el NIRS

La estimación del contenido del ácido Oleico generada mediante el modelo quimiométrico no muestra la misma tendencia que en la germinación, ya que el valor de la correlación, es de $R^2 = 0.6833$; sin embargo se nota la tendencia a linearizarse (Figura 11).

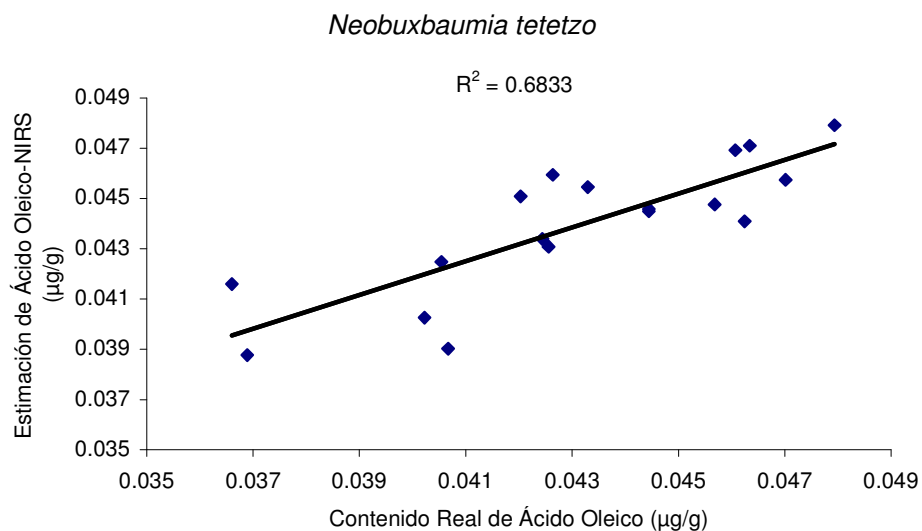


Figura 11. Se muestra el contenido de ácido Oleico real contra el estimado mediante el quimiométrico en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* después de haber sido sometidas al tratamiento de envejecimiento acelerado (65% Humedad Relativa a 45°C durante 18 días con registro cada 3 días, n=3).

De igual manera se muestra la estimación del contenido de ácido Linoléico generada mediante el modelo quimiométrico con un valor de correlación, de $R^2 = 0.7527$ (Figura 12).

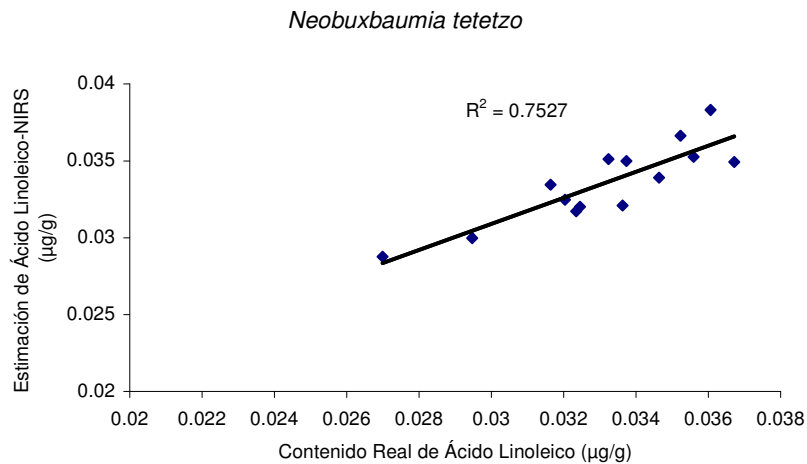


Figura 12. Se muestra el contenido de ácido Oleico real contra el estimado mediante el quimiométrico en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* después de haber sido sometidas al tratamiento de envejecimiento acelerado (65% Humedad Relativa a 45°C durante 18 días con registro cada 3 días, n=3).

Neobuxbaumia mezcalaensis

Germinación

Las semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis* no requieren de ningún tratamiento de escarificación química o mecánica para inducir a la germinación, siendo ésta del 100 % para el grupo control.

Tratamientos de envejecimiento acelerado.

En las semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis* se utilizaron las mismas condiciones de humedad relativa y temperatura que en las de *Neobuxbaumia tetetzo* para generar un gradiente de envejecimiento acelerado, presentado un comportamiento similar a las de *N. tetetzo*, por lo también se utilizó el tratamiento de 65% HR/45°C (Figura 13).

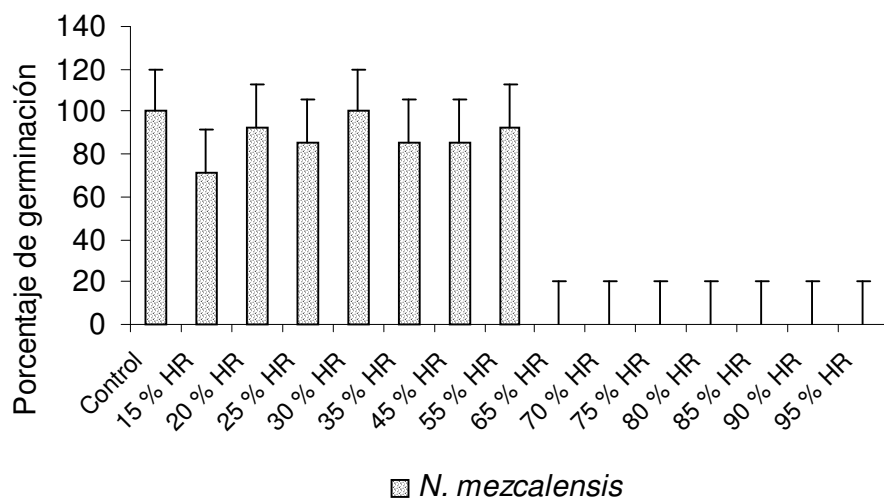


Figura 13. Se muestra el porcentaje de germinación en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* posterior a los tratamientos de envejecimiento acelerado a 45°C y diferentes humedades relativas durante 20 días.

El tratamiento de envejecimiento acelerado empleado fue lo suficientemente drástico para afectar a la germinación de las semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis* formando un gradiente de envejecimiento en el cual se reduce su porcentaje de germinación del 100% hasta el 2% después de 18 días de tratamiento como se puede apreciar en la figura 14. El registro de la disminución de la viabilidad fue significativa estadísticamente. (Apéndice sección IV).

Neobuxbaumia mezcalaensis

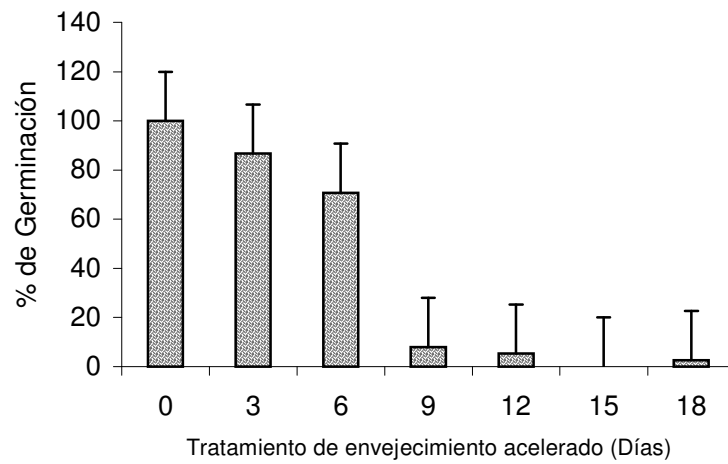


Figura 14. Se muestra el porcentaje de germinación de semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis* después del tratamiento de envejecimiento acelerado (65% Humedad Relativa a 45°C durante 18 días con registro cada 3 días, n=3).

En las semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis* se presentó el mismo comportamiento que en las de *N. tetetzo*, ya que el tiempo medio de germinación de esta especie es de 3 días, después de emplear el tratamiento de envejecimiento acelerado (65% HR/ 45°C) éste no aumenta, aunque si se nota de manera evidente la disminución del porcentaje de germinación (Figura 15).

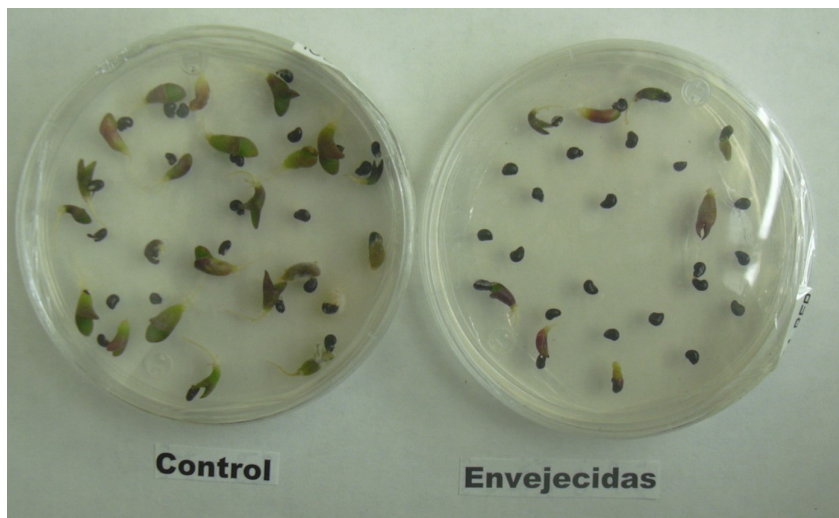


Figura 15. Efecto del tratamiento de envejecimiento acelerado (65% HR/ 45°C durante 9 días de tratamiento, n=3) sobre la germinación de semillas de *N. mezcalaensis* nótese la escasa germinación de la muestra sometida a envejecimiento.

Germinación y Niveles de Ácidos grasos

En la figura 16 se puede apreciar claramente el decremento del porcentaje de germinación, de 100% a 2% después de 18 días de tratamiento, así como la concentración de los niveles de ácidos grasos con tendencia a disminuir conforme al tiempo del tratamiento de envejecimiento acelerado empleado. La concentración del ácido oleico disminuyó de 0.0304 $\mu\text{g/g}$ (control) a 0.0263 $\mu\text{g/g}$ después de 18 días de tratamiento de envejecimiento. El ácido linoléico disminuye de 0.0232 $\mu\text{g/g}$ (control) a 0.020 $\mu\text{g/g}$ después de 18 días de tratamiento de envejecimiento. Por lo que toca al ácido graso saturado, esteárico, su comportamiento fue constante durante el tratamiento de envejecimiento. La disminución de los ácidos grasos insaturados no es significativa estadísticamente. (Apéndice sección V y VI).

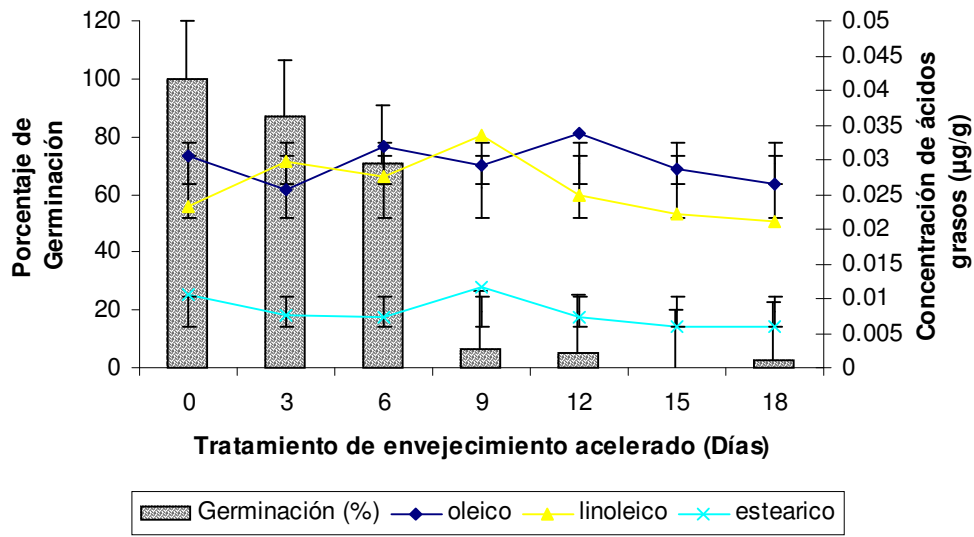


Figura 16. Se muestra el gradiente de envejecimiento generado después del tratamiento de envejecimiento acelerado (65% Humedad Relativa a 45°C durante 18 días con registro cada 3 días, n=3) en semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis*.

NIRS y Quimiométrico (QUANT+)

El análisis quimiométrico realizado por el programa QUANT+, con los espectros de infrarrojo, generó valores de calibración del método cercano al 100% de varianza la cual es igual al coeficiente de correlación. (Tabla 2).

Los valores aceptados de calibración de los modelos quimiométricos son del 80%; por lo que los resultados obtenidos del análisis del modelo Quimiométrico fueron satisfactorios.

Tabla .2. Resultados obtenidos mediante la calibración del quimiométrico (QUANT+) en semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis*.

	% de Varianza	Error estándar estimado	Error estándar de la predicción
Oleico	99.96	0.0002036	0.0003649
Linoléico	99.92	0.0001899	0.0002079
Esteárico	99.97	0.0002036	0.0003649
Germinación	99.31	3.717	4.324

Germinación real contra estimada mediante NIRS

En la figura 17 se muestra el valor de estimación de la germinación generada mediante el modelo quimiométrico resultó satisfactoria de acuerdo a la correlación que tienen los valores experimentales con una $R^2 = 0.9949$

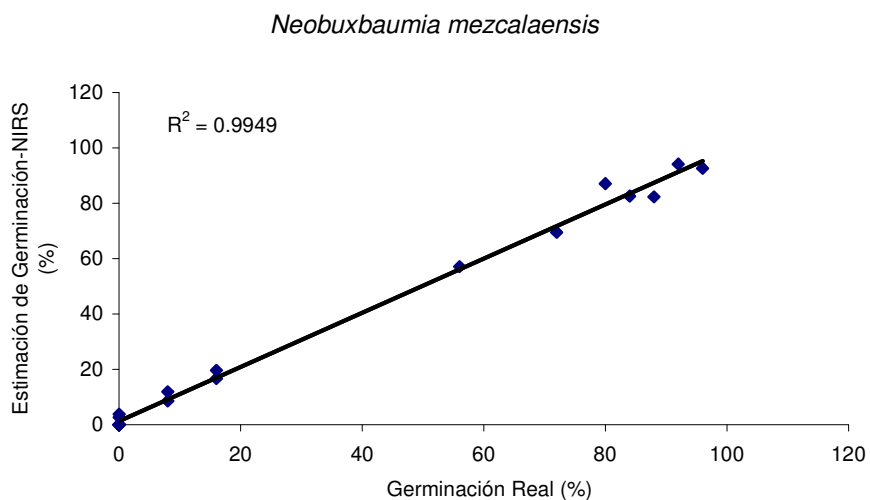


Figura 17. Se muestra el porcentaje de germinación real contra el estimado mediante el quimiométrico en semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis*, posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado (65% Humedad Relativa a 45°C durante 18 días con registro cada 3 días, n=3).

Contenido real de ácidos grasos insaturados contra estimados mediante NIRS

La estimación para el ácido oléico generado mediante la técnica del NIRS dio un valor de correlación de $R^2 = 0.9976$ por lo que resulto satisfactoria. (Figura18).

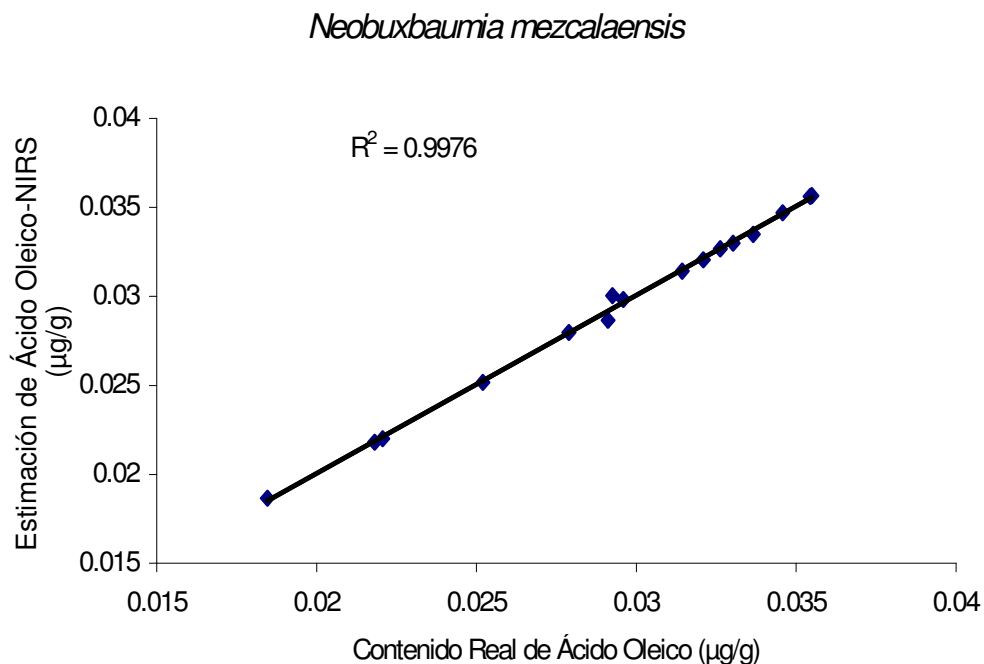


Figura 18. Se muestra el contenido de ácido Oleico real contra el estimado mediante el quimiométrico en semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis* después de haber sido sometidas al tratamiento de envejecimiento acelerado (65% Humedad Relativa a 45°C durante 18 días con registro cada 3 días, n=3).

De igual forma se muestra la estimación del contenido de ácido Linoleico generada mediante el modelo quimiométrico con un valor de correlación, de $R^2 = 0.9989$ (Figura 19).

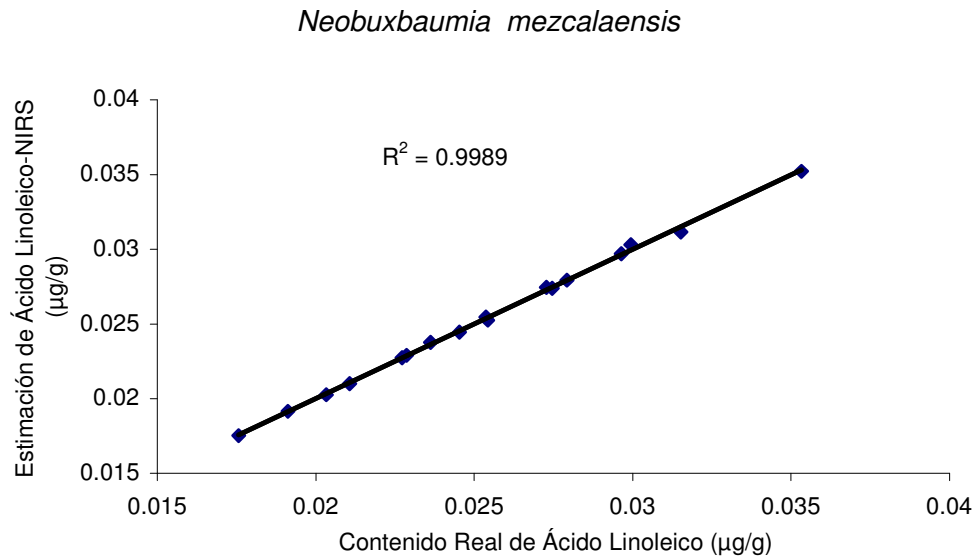


Figura 19. Se muestra el contenido de ácido Linoleico real contra el estimado mediante el quimiométrico en semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis* después de haber sido sometidas al tratamiento de envejecimiento acelerado (65% Humedad Relativa a 45°C durante 18 días con registro cada 3 días, n=3).

Estudios de proteínas totales

Finalmente se evaluó si existía una diferencia en la expresión de proteínas totales en ambas especies (Figura 20) en donde se aprecia que la expresión de proteínas no se vio afectada después de haberse sometido a las semillas en el tratamiento de envejecimiento acelerado, ya que las bandas se aprecian bien definidas entre el control y el tratamiento de envejecimiento acelerado.

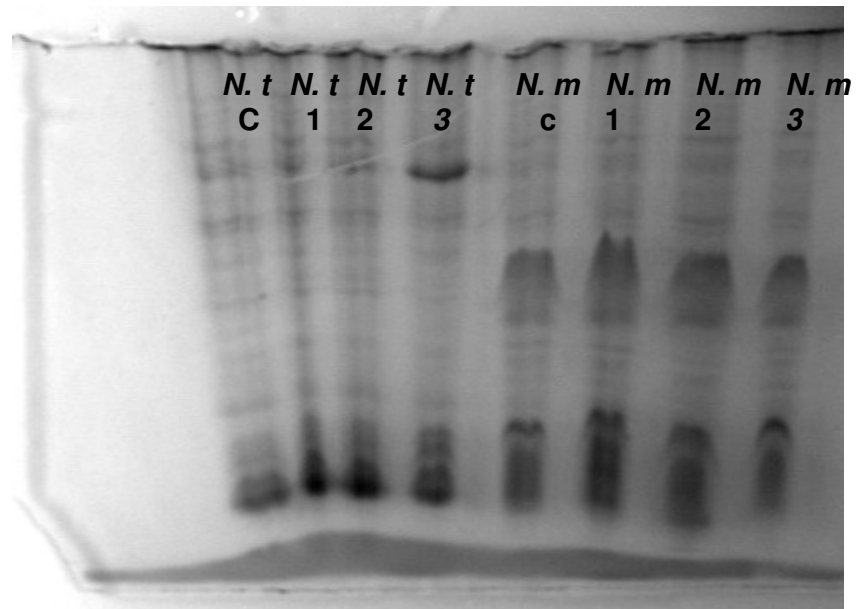


Figura 20. Gel de la electroforesis de proteínas en donde no se detectó diferencia en el control y en las repeticiones de muestras envejecidas en las semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* ni de *Neobuxbaumia mezcalaensis* después de 9 días de envejecimiento. (*N. t* C = *N. tetetzo* control; *N t* 1= *N.tetetzo* 1ra repetición; *N t* 2 = *N. tetetzo* 2da repetición; *N. t* 3= *N. tetetzo* 3ra repetición; *N. m* C = *N. mezcalaensis* control; *N. m* 1 = *N. mezcalaensis* 1ra repetición; *N.m* 2 = *N. mezcalaensis* 2da repetición; *N. m* 3 = *N. mezcalaensis* 3ra repetición).

Discusión

La capacidad de germinación de las semillas nos brindan información acerca de su estado, por lo que si se tiene un alto porcentaje de germinación nos indica que son potencialmente capaces de reemplazar a las plantas adultas de un determinado lugar (Lohengrin, 1999). En cuanto al porcentaje de germinación de semillas de *N. tetetzo* reportadas en un estudio previo fue del 95% (Godínez-Álvarez, y Valiente-Baunet, 1998), mientras que en este estudio fue del 100%. En cuanto a *N. mezcalaensis* en este estudio el porcentaje de germinación también fue del 100%. Esto probablemente se debe al tipo de colecta o a las condiciones de almacenamiento de las muestras y no tanto al tiempo de almacenamiento de las semillas, ya que a pesar de que las semillas empleadas en este trabajo pertenecen a una colecta de junio del 2001, almacenadas a temperatura y humedad relativa ambiental, estas conservaron su viabilidad.

Cabe señalar que las semillas fueron sometidas a tratamientos de envejecimiento acelerado de 55% HR a 45 y 50°C y su capacidad de germinación no se vio afectada, por lo que es evidente que el factor determinante para inducir al envejecimiento acelerado en esta semillas fue el contenido de humedad relativa elevado y no tanto la temperatura, debido a que cuando se incremento el contenido de humedad relativa a valores superiores del 60% la viabilidad de las semillas comenzó a decaer hasta el 0% de germinación cuando se lleo al 70% de HR para *N. tetetzo* y 65% de HR para *N. mezcalaensis*, además de que el contenido de humedad en suelo en Zapotitlan Salinas, Puebla oscila entre 7.5 y 12 % y la HR ambiental es de alrededor del 52 al 73% (Datos del 2001 y de 1998 respectivamente, del laboratorio de Fisiología vegetal UBIPRO), no obstante, cuando se utilizó una temperatura de 55°C a diferentes humedades relativas la viabilidad se pierde en su totalidad, debido a que ésta temperatura es demasiado extrema, ya que en condiciones naturales de los bancos de semillas de suelo, la temperatura, por lo menos en Zapotitlán salinas, Puebla es en promedio de 38°C y la ambiental es de 33°C (Datos de sep. 2004 del laboratorio de Edafología UBIPRO). Por lo que se puede afirmar que estas especies están adaptadas a germinar a temperaturas

elevadas, lo cual es característico de especies de zonas áridas, ya que algunos autores han reportado que la germinación de varias especies de cactáceas oscila entre los 12 y 34°C (Fearn, 1974,1981 citado por Godínez-Álvarez y Valiente-Baunet, 1998 y Nobel, 1988).

De lo anterior, en comparación con otros estudios en los que se utilizaron semillas de *Tsuga mertensiana* (abeto), tanto la temperatura como la humedad relativa fueron determinantes para inducir el envejecimiento, ya que utilizaron 37.5 °C / 100% HR, observándose que la pérdida gradual de viabilidad de las semillas hasta 0%, se observó después de 12 días de envejecidas (El-Kassaby, 1998). En contraste con este reporte, en semillas de cacahuete utilizaron 45°C y 79% de HR, observándose una pérdida drástica de la viabilidad, daño severo y un aumento significativo de malondialdehído en los ejes embrionarios y cotiledones de la semilla (Sung y Jeng, 1994)

Otra forma de manifestación de la pérdida de la viabilidad en semillas es la disminución del vigor de las mismas, expresada como tiempo medio de germinación (TMG), aunque en este estudio no se afectó el TMG en ambas especies, sí se reporta en semillas de *Hechtia podantha* y *Beaucarnea gracilis*, donde aumentó de 4.55 a 18.5 días y de 5.7 a 28.4 días respectivamente (Zavaleta, 2003).

En cuanto al contenido de ácidos grasos insaturados de las semillas de *N. tetetzo* y *N. mezcalaensis* se muestra una tendencia a la disminución conforme pasan los días de tratamiento de envejecimiento acelerado; por lo que se permite suponer la presencia de radicales libres como el principal factor de envejecimiento celular, aunque no se tengan evidencias directas de su presencia, ya que no se realizaron pruebas para detectar el aumento del malondialdehído o alguno de los productos secundarios de la peroxidación lipídica.

Aunque si hay una tendencia a la disminución del contenido de ácidos grasos insaturados en las semillas estudiadas, ésta no fue significativa, por lo que se permite suponer la existencia de mecanismos enzimáticos que constantemente regeneran los daños producidos en los ácidos grasos insaturados, además de que hay que considerar la presencia de antioxidantes que permitieran controlar los mecanismos de peroxidación lipídica causados por los radicales libres que pudieran haberse generado durante el tratamiento de envejecimiento acelerado empleado. El comportamiento observado es similar en semillas de *Brassica napus* y *Stenocereus stellatus* (Vergara, 2002), y se contrasta con el comportamiento de semillas de *Beaucarnea gracilis* y *Hechtia podantha* donde los ácidos grasos linoléico y oleico disminuyeron drásticamente en ambas especies (Zavaleta, 2003).

En cuanto al porcentaje de germinación, éste si disminuyó significativamente en contraste con el contenido de ácidos grasos insaturados de las semillas estudiadas, por lo que se permite suponer que en la pérdida de la viabilidad hayan participado otros componentes de la semilla tales como carbohidratos, enzimas o proteínas, lo anterior, con base en lo observado en semillas de frijol mungo, donde hubo cambios en las proteínas contenidas en las semillas, el contenido de glucosa (evidencia de que hubo una hidrólisis de los carbohidratos) y los productos de la peroxidación lipídica aumentaron considerablemente durante el almacenamiento (Murthy y Sun, 2000).

Aunque en este trabajo se observó que la expresión de las proteínas no se afecta durante el tratamiento de envejecimiento acelerado, resulta interesante que para posteriores estudios de esta índole se evalúe el contenido de los lípidos, carbohidratos, proteínas, productos de la peroxidación lipídica, presencia de antioxidantes en las semillas, incluso, actividad enzimática que pudiera participar en el envejecimiento de semillas. Por otro lado, la temperatura empleada en este estudio (45°C) no fue muy alta como para desnaturalizar proteínas, además se debe considerar el origen de las semillas, ya que son de zonas áridas, las cuales se caracterizan por tener temperaturas elevadas, por lo que deben ser capaces de soportar dichas condiciones.

Con respecto a la concentración de los ácidos grasos saturados, ésta no resultó afectada ya que su comportamiento durante el tratamiento de envejecimiento se mantuvo con una tendencia constante, por lo que puede decirse que la peroxidación de los ácidos grasos insaturados está directamente relacionada con el envejecimiento, aunque para poder afirmar esto sería necesario evaluar el contenido de ácidos grasos insaturados junto con los productos de la peroxidación en semillas envejecidas de forma natural, para poder comparar si el envejecimiento acelerado afecta de la misma forma a las semillas que han sido envejecidas artificialmente con respecto a las envejecidas de forma natural, ya que las condiciones empleadas para inducir al envejecimiento acelerado son muy drásticas.

Por otra parte en cuanto al análisis quimiométrico realizado por el programa QUANT+ con los espectros de infrarrojo obtenidos, nos generó valores de calibración (el cual es igual al coeficiente de correlación) altos, como el de la germinación de las semillas de *N. tetetzo* y *N. mezcalaensis* con un valor de $R^2=0.99$, lo que nos indica que existe una correlación lineal directa significativa entre las dos variables relacionadas.

En lo concerniente a la estimación de los ácidos grasos insaturados, la correlación entre los valores obtenidos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) con los obtenidos mediante el modelo quimiométrico, nos muestra valores de $R^2=0.68$ para ácido oleico en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* lo que nos indica que la correlación entre las variables es baja, en cuanto al ácido linoléico el coeficiente de correlación fue de $R^2=0.75$ por lo que la relación entre las variables es buena. Esto probablemente se debe a que las semillas de ésta especie fueron más susceptibles al envejecimiento ya que a pesar de que las semillas que lograron germinar después del tratamiento de envejecimiento acelerado las plántulas no prosperaron. En el caso de *Neobuxbaumia mezcalaensis* el valor del coeficiente de correlación del ácido oleico y linoléico fue de $R^2=0.99$ indicando que la relación entre las variables es satisfactoria.

En general el empleo de la técnica del NIRS resulto ser confiable para analizar la viabilidad de las semillas estudiadas en este trabajo. Además de que esta técnica se ha utilizado para estimar el contenido de proteínas en semillas de *Brassica napus* L. en la cual el valor de correlación entre el contenido de proteínas obtenido mediante el método de combustión de Dumas contra el valor generado por la técnica del NIRS fue de $R^2=0.94$ (Velasco y Möllers, 2002), junto con otro estudio de estimación de contenido de aceites y composición de ácidos grasos en semillas de *Brassica napus* L. en donde se encontraron valores de correlación de $R^2=0.92$ para ácido oleico, $R^2=0.94$ para ácido erúxico y $R^2=0.75$ para ácido linoleico (Velasco *et al*, 1999), además de distinguir entre semillas viables y semillas vacías de *Pinus patula* Shiede y Deppe mediante espectroscopia de infrarrojo cercano la cual resulto ser exitosa (Tigabu y Christer, 2003).

Finalmente, con lo expuesto anteriormente, la técnica del NIRS ofrece una forma no destructiva de análisis de semillas enteras, sin necesidad de realizar extracciones exhaustivas de analitos o germinarlas, además de la alta precisión y sensibilidad del equipo de infrarrojo, es de mucha utilidad para que ésta técnica se emplee para la realización de pruebas periódicas de viabilidad en semillas que se encuentran depositadas en los bancos de germoplasma.

Así mismo la técnica del NIRS ofrece la ventaja de que se emplea una pequeña cantidad de muestra para su análisis, aunado con la rapidez para realizar dichas pruebas y sobre todo el rango de energía empleada del espectro electromagnético es muy baja y no daña la viabilidad de las semillas, por lo que esta característica resulta ser potencialmente útil, muy atractiva e incluso económica para estimar la viabilidad, con la finalidad de analizar una gran cantidad de colecciones de los bancos de semillas sin que los acervos se pierdan.

Conclusiones

Basándose en los resultados obtenidos en este trabajo se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- ↑ El tratamiento de envejecimiento acelerado empleado (45°C/65% HR) genera un gradiente de envejecimiento en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* y *Neobuxbaumia mezcalaensis*.
- ↑ Por medio de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se lograron identificar los ácidos grasos contenidos en las semillas estudiadas así como su concentración.
- ↑ Las semillas de *N. tetetzo* y *N. mezcalaensis* muestran una disminución no significativa en el contenido de ácidos grasos insaturados durante el tratamiento de envejecimiento acelerado.
- ↑ La correlación de los valores de germinación obtenidos mediante la técnica del NIRS y la germinación real en las semillas de *N. tetetzo* y *N. mezcalaensis* fue satisfactoria.
- ↑ La correlación de los valores de la predicción generados por la técnica del NIRS de la concentración de ácidos grasos insaturados y la concentración real de los mismos en las semillas estudiadas fue buena.
- ↑ El tratamiento de envejecimiento acelerado no afectó la expresión de proteínas totales en las semillas de *N. tetetzo* y *N. mezcalaensis*.
- ↑ La técnica del NIRS es un método confiable para estudiar la viabilidad de las semillas de *N. tetetzo* y *N. mezcalaensis* por ser no destructiva.

Referencias.

- € Arias, T. A. A. 2000. Las plantas de Zapotitlán Salinas, Puebla: un folleto de divulgación sobre botánica y conservación. Tesis Licenciatura. UNAM. Facultad de ciencias. 47 pags.
- € Bravo-Hollis, H.1978. Las cactáceas de México. Vol I. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 654-658, 638-643.
- € Cuevas, S. J. A. 2000. Semillas recalcitrantes: Importancia, Características y Alternativas para su Conservación. Publicaciones del Programa Nacional de Etnobotánica. 3ra Ed. Chapingo, México.
- € Delouche, J. C. 2002. Germinación, deterioro y vigor de semillas. *Seed news*. http://www.seednews.inf.br/espanhol/seed66/artigocapa66_esp.shtml Fecha de consulta: Agosto del 2003.
- € Daniel, W. W. 2002. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta ed. Ed. Limusa, México. 755 pags.
- € El-Kassaby, Y. A., D. G. W. Edwards. 1998. Genetic control of germination and the effects of accelerated aging in mountain hemlock seeds and its relevance to gene conservation. *Forest Ecology and Management*. 112: 203-211.
- € Flores, O. C. M. 2004. Quimiotaxonomía del género *Neobuxbaumia*. Tesis de Doctorado en ciencias. FES Iztacala. UNAM. México. 112 pags.
- € Flores , O. C. M; Peñalosa, C. I; Hernández, P. L. B; Dávila, A. P. D y Arizmendi, M. C. 2003. Carbohydrate Analysis of Floral Nectar Using Medium Infrared. *Phytochem. Anal.* 14: 319-324.

- € 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.
- € Godínez-Álvarez, H. y Valiente-Baunet, A, 1998. Germination and early seedling growth of Tehuacan Valley cacti species: the role of soils and seed ingestion by dispersers on seedling growth. *Journal of Arid Environments*. 39: 21-31.
- € Golovina, E., Tikhonov, A. y Hoekstra, F. 1997. An electron paramagnetic resonance spin-probe study of membrane-permeability changes with seed aging. *Plant Physiology*. 114: 383-389.
- € Gómez, R. J. F. 2000. Envejecimiento. *Revista de Posgrado de la Cátedra Via Medicina*. 100: 21-23.
- € Harman, G. y Mattick, L. 1976. Association of lipid oxidation with seed ageing and death. *Science*. 206: 323-324.
- € Hay, F. and Tietmeyer. Proyecto: Millennium Seed Bank Project Kew. Institución: Royal Botanic Gardens, Kew, Inglaterra. En prensa.
- € Halistones, M. y 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.
- € 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.

- € Jaramillo, S. y Baena, M. 2000. Conservación ex situ de recursos filogenéticos. Material de apoyo a la capacitación en conservación ex situ de recursos filogenéticos. www.ipgri.cgiar.org/training/exsitu/web/arr_contenido.htm Fecha de consulta: 18 Febrero de 2005.

- € Khan, M., Hendry, G., Atherton, N. y 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.

- € Laemli, U. K. 1970. *Nature*. 227: 680.

- € Lohengrin A. Caviaries.1999. Bancos de semillas persistentes: modelos de germinación retardada y su aplicación en ambientes alpinos. *Revista Chilena de Historia Natural* 72: 457-466, 1999.

- € Morrison, W. R. y 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. y Bro, R. 2001. Exploring the phenotypic expression of a regulatory proteome-altering gene by spectroscopy and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*. 446: 171-186.

- € Murthy, N. U. M. y Sun, W. Q. 2000. Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*. 51: 1221-1228.

- € Nobel, P. S. 1988. *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. New York: Cambridge University press. 270 pags.

- € Pérez-Vich, B., Velasco, L. y 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.

- € Priestley, D. Werner, B. Leopold, C. y 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 Aging. Implications for Seed Storage and Persistence in the Soil. Cornell University Press. USA. 17-18.

- € Pucacka, S. 1998. Changes in membrane fatty acid composition during desiccation of seeds of silver maple. *Seed Science and Technology*. 26: 535-540.

- € Sacandé, M. Buitink, J. y Hoestra, F. 2000. A study of water relations in neem (*Azadirachta indica*) seed that is characterized by complex behavior. *Journal of Experimental Botany* 51: 635-643.

- € Sung, J. M. y Jeng, T. L. 1994. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. *Physiol. Plant*. 91: 51-55.

- € Stewart, R. y Bewley. P. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology*. 65: 245-248.

- € Stuart, B. y Ando, D. 1997. Biological Applications of Infrared Espectroscopy. ACOL (University of Greenwich).

- € Tigabu, M., y Christer, O. P. 2003. Discrimination of viable and empty seeds of *Pinus patula* Shiede & Deppe with near-infrared spectroscopy. *New Forest*. 25: 163-176.

- € Velasco, L., Fernández-Martínez, J. y 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. y 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. y Möllers, C. 2002. Nondestructive assessment of protein content in single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.) by infrared reflectance spectroscopy. *Euphytica* 123: 89-93.

- € Velasco, L., Möllers, C. y 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, M. L. F. L. 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. Facultad de Ciencias. UNAM.47pags.

- € Wilson, D. y McDonald, M. 1986. The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Science and Technology*. 14: 269-300.

- € Zavaleta, P. M. 2003. Relación entre los niveles de ácidos grasos insaturados y la viabilidad en semillas de *Hechtia podantha* y *Beaucarena gracilis* durante el envejecimiento acelerado. Tesis Licenciatura. FES Iztacala. UNAM, México. 47pags.

€ Zentella, P. M., y Saldaña, B. Y.1996. Papel Fisiológico de los radicales libres. *Biol. Educ. Bioq* (México) 15:152-161.

Apéndice.

Sección I

Análisis de varianza de un factor correspondiente al porcentaje de germinación en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado (45 °C/65% HR, durante 18 días con registro cada 3 días).

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

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	34279.61905	6	5713.269841	105.615023	7.6391E-11	2.847727387
Dentro de los grupos	757.3333333	14	54.0952381			
Total	35036.95238	20				

Como F experimental es mayor que F tablas acepto la hipótesis alterna, por lo tanto hay diferencia significativa entre el tiempo de envejecimiento reflejado en porcentaje de germinación, en las semillas de *Neobuxbaumia tetetzo*.

Prueba de Tukey

$$W = 34.18$$

De acuerdo con el valor de tukey existe diferencia entre: los siguientes grupos: Control y 5to y 6to muestreo (97.3), control y 4to muestreo (92), control y 3er muestreo (82.6), control y 2do muestreo (45.3), 1er muestreo y 6to y 5to muestreo (94.7), 1er muestreo y 4to muestreo (89.4), 1er muestreo y 3er muestreo (80), 1er muestreo y 2do muestreo (42.7), 2do muestreo y 6to y 5to muestreo (52), 2do muestreo y 4to muestreo (46.7), 2do muestreo y 3er muestreo (37.3).

Sección II

Análisis de varianza de un factor correspondiente a la concentración del ácido oleico en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado (45° C/65% HR, durante 18 días con registro cada 3 días).

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

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00018103	6	3.01717E-05	1.348273	0.300618	2.84772739
Dentro de los grupos	0.000313293	14	2.2378E-05			
Total	0.000494323	20				

Dado que F experimental es menor que F tablas acepto la hipótesis nula por lo tanto no hay diferencia significativa entre el tiempo de envejecimiento expresado en el contenido de ácido Oleico, en las semillas de *Neobuxbaumia tetetzo*.

Sección III

Análisis de varianza de un factor correspondiente a la concentración del ácido Linoléico en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado (45° C/65% HR, durante 18 días con registro cada 3 días).

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

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.000180283	6	3.00471E-05	2.054061	0.125322	2.84772739
Dentro de los grupos	0.000204794	14	1.46281E-05			
Total	0.000385076	20				

Dado que F experimental es menor que F tablas acepto la hipótesis nula por lo tanto no hay diferencia significativa entre el tiempo de envejecimiento expresado en el contenido de ácido Linoléico, en las semillas de *Neobuxbaumia tetetzo*.

Sección IV

Análisis de varianza de un factor correspondiente al porcentaje de germinación en semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis* posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado (45° C/65% HR, durante 18 días con registro cada 3 días).

Ho: $X_1=X_2=X_3...$ Ha: $X_1 \neq X_2 \neq X_3...$

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	35311.2381	6	5885.2063	100.3	1.1E-10	2.84772739
Dentro de los grupos	821.333333	14	58.666667			
Total	36132.5714	20				

Como F experimental es mayor que F tablas acepto la hipótesis alterna, por lo tanto hay diferencia significativa entre el tiempo de envejecimiento reflejado en porcentaje de germinación, en las semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis*.

Prueba de Tukey

W= 35.34.

De acuerdo con el valor de tukey existe diferencia entre los siguientes grupos: Control y 6to muestreo (96), control y 5to muestreo (98.6), control y 4to muestreo (93.3), control y 3er muestreo (90.6), 1er muestreo y 6to muestreo (84.06), 1er muestreo y 5to muestreo (86.6), 1er muestreo y 4to muestreo (81.3), 1er muestreo y 3er muestreo (78.6), 2do muestreo y 6to muestreo (68), 2do muestreo y 5to muestreo (70.6), 2do muestreo y 4to muestreo (65.33), 2do muestreo y 3er muestreo (62.66).

Sección V

Análisis de varianza de un factor correspondiente a la concentración del ácido oleico en semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis* posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado (45° C/65% HR, durante 18 días con registro cada 3 días).

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

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00050495	6	8.416E-05	1.187	0.36786	2.84772739
Dentro de los grupos	0.00099276	14	7.091E-05			
Total	0.00149771	20				

Dado que F experimental es menor que F tablas acepto la hipótesis nula por lo tanto no hay diferencia significativa entre el tiempo de envejecimiento expresado en el contenido de ácido Oleico, en las semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis*.

Sección VI

Análisis de varianza de un factor correspondiente a la concentración del ácido Linoléico en semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis* posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado (45° C/65% HR, durante 18 días con registro cada 3 días).

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

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00016316	6	2.719E-05	0.641	0.69638	2.84772739
Dentro de los grupos	0.00059376	14	4.241E-05			
Total	0.00075692	20				

Dado que F experimental es menor que F tablas acepto la hipótesis nula por lo tanto no hay diferencia significativa entre el tiempo de envejecimiento expresado en el contenido de ácido Linoléico, en las semillas de *Neobuxbaumia mezcalaensis*.