



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Expresión diferencial de proteínas en semillas de  
*Cedrela odorata* L. como consecuencia del  
envejecimiento acelerado.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**ELENA ISABEL HERNÁNDEZ FLORES**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2015**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**            **Gutiérrez Venegas Gloria**

**VOCAL:**                    **Pedraza Chaverri José**

**SECRETARIO:**            **García Campusano Florencia Tiberia Aucán**

**1er. SUPLENTE:**        **Maldonado Jiménez Perla Deyanira**

**2° SUPLENTE:**         **Lara Núñez Aurora**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales, INIFAP, SAGARPA

## **ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. García Campusano Florencia Tiberia Aucán**

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

**Dr. Herrera Díaz Jorge**

## **SUSTENTANTE:**

Elena Isabel Hernández Flores

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales, INIFAP, bajo la dirección de la Dra. Florencia Tiberia Aucán García Campusano.

Formo parte del proyecto:

Bases estructurales, fisiológicas y moleculares que determinan la longevidad de semillas de especies forestales recalcitrantes: Caso del cedro rojo (*Cedrela odorata L.*) con numero de proyecto 13262631986, de los fondos fiscales del INIFAP, 2013.

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>Abreviaturas</b> .....   | 4  |
| <b>Resumen</b> .....  | 5  |
| <b>Summary</b> .....  | 6  |
| Introducción .....  | 7  |
| <b>1. Antecedentes</b> .....  | 10 |
| 1.1 Generalidades de <i>Cedrela odorata</i> L. ....                                     | 10 |
| 1.2 Conservación de semillas en almacenamiento. ....                                    | 12 |
| 1.3 Las semillas y su clasificación de acuerdo a su almacenamiento.....                 | 13 |
| 1.4 Comportamiento de las semillas de <i>C. odorata</i> durante el almacenamiento. .... | 15 |
| 1.5 Vigor y viabilidad de las semillas durante el almacenamiento. ....                  | 17 |
| 1.6 Evaluación de la germinación.....   | 19 |
| 1.7 Longevidad y envejecimiento en el almacenamiento. ....                              | 19 |
| 1.8 Procesos fisiológicos y moleculares asociados al envejecimiento de semillas. ....   | 20 |
| 1.9 Envejecimiento acelerado o deterioro controlado. ....                               | 24 |
| 1.10 Análisis proteómicos como herramienta para el estudio del envejecimiento. ....     | 25 |
| 1.11 Análisis proteómicos en semillas.....  | 29 |
| <b>Planteamiento del problema</b> .....   | 34 |
| <b>Justificación</b> .....  | 34 |
| <b>Hipótesis</b> .....  | 35 |
| <b>Objetivos</b> .....  | 35 |
| Objetivo general.....   | 35 |
| Objetivos particulares .....  | 35 |
| <b>2. Material y métodos</b> .....  | 36 |
| 2.1 Reactivos .....   | 36 |
| 2.2 Material biológico .....  | 36 |
| 2.3 Envejecimiento acelerado.....   | 36 |
| 2.4 Prueba de germinación. ....   | 37 |
| 2.5 Extracción de las proteínas totales. ....   | 38 |
| 2.6 Electroforesis dimensional.....   | 39 |
| 2.7 Electroforesis bidimensional.....   | 39 |

|   |            |
|---|------------|
| 2.8 Captura y análisis de imágenes.....   | 40         |
| 2.9 Espectrometría de masas.....  | 41         |
| <b>3. Resultados.....</b>   | <b>43</b>  |
| 3.1 Envejecimiento acelerado.....   | 43         |
| 3.2 Determinación del G50.....  | 46         |
| 3.3 Prueba del Tetrazolio.....  | 47         |
| 3.4 Análisis de proteínas.....  | 49         |
| 3.4.1 Electroforesis unidimensional.....  | 50         |
| 3.4.2 Electroforesis bidimensional.....   | 51         |
| 3.5 Identificación de proteínas en las manchas seleccionadas.....   | 58         |
| <b>4. Discusión.....</b>  | <b>67</b>  |
| 4.1 El envejecimiento acelerado como una estrategia para el estudio de la longevidad de las semillas..... | 67         |
| 4.2 Análisis de proteínas relacionadas al proceso de envejecimiento en semillas.....                      | 70         |
| <b>5. Conclusiones.....</b>   | <b>82</b>  |
| <b>6. Perspectivas.....</b>   | <b>85</b>  |
| <b>7. Literatura citada.....</b>  | <b>86</b>  |
| <b>Apéndices.....</b>   | <b>100</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>  | <b>105</b> |
| Anexo I.....  | 105        |
| Anexo II.....   | 107        |
| Anexo III.....  | 112        |
| ANEXO IV.....   | 134        |
| Anexo V.....  | 136        |

## Índice de tablas.

|   |     |
|---|-----|
| Tabla 1. Porcentaje de germinación y días al pico del genotipo 50. Los datos son promedios de cuatro replicas con 25 semillas cada una. ....  | 43  |
| Tabla 2. Promedio del porcentaje de germinación de las semillas sometidas a envejecimiento acelerado a 42°C y 95% HR y 42°C y 75% HR. Para las pruebas de germinación se utilizaron 40 semillas por cada día de muestreo, en 4 réplicas de 10 semillas cada una.....  | 45  |
| Tabla 3. Porcentaje de germinación y días al pico de semillas envejecidas artificialmente. Se usaron 80 semillas con 8 réplicas de 10 semillas cada una. Se indican promedios y desviaciones estándar.....  | 49  |
| Tabla 4. Promedios del total de manchas detectadas por el software Ludesi-REDFIN para análisis de geles de 2 dimensiones (2D).....  | 51  |
| Tabla 5. Densidades promedio calculadas por el software Ludesi REDFIN de las 15 proteínas con cambios significativos en los niveles de expresión ANOVA ( $p=0.05$ ). Las manchas sombreadas de verde son aquellas que son únicas para el control; mientras que las sombreadas de color café son las únicas en la condición T6.2. .... | 52  |
| Tabla 6. Resultado de la secuenciación por espectrometría de masas de las manchas seleccionadas. Las manchas sombreadas de verde son aquellas que son únicas para el control; mientras que las sombreadas de color café son las únicas en la condición T6.2. ....   | 59  |
| Tabla 7. Transformación de los datos a valores PROBIT.....  | 105 |
| Tabla 8. Tabla con los promedios de los resultados procesados de las 76 manchas que cumplieron con los criterios de selección. ....   | 134 |
| Tabla 9. Porcentajes de humedad relativa del lote 50 usado en el estudio.....   | 136 |

## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Condiciones de almacenamiento para los tipos de semillas. Esquema propio...  | 16 |
| Figura 2. Fases del proceso de germinación (Modificada de Nonogaki <i>et. al.</i> , 2010 y Márquez <i>et al.</i> , 2013 y diseñado por D.G. López J. Y.) .....   | 18 |
| Figura 3. Esquema del proceso de electroforesis bidimensional (2D). Esquema propio. ..   | 27 |
| Figura 4. Esquema del proceso general de identificación de proteínas mediante electroforesis bidimensional (2D) y EM. Tomado de <a href="http://www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion18.pdf">http://www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion18.pdf</a> .....  | 29 |
| Figura 5. Porcentaje de germinación diaria de los muestreos realizados para determinar las condiciones de envejecimiento acelerado. Para este ensayo se utilizaron 40 semillas por muestreo divididas en 4 réplicas de 10 semillas cada una las barras en cada punto indican la desviación estándar de cada réplica. ....  | 45 |
| Figura 6. Días al pico de cada uno de los tratamientos (T) realizados para determinar las condiciones de envejecimiento acelerado. Para este ensayo se utilizaron 40 semillas por muestreo divididas en 4 réplicas de 10 semillas cada una, las barras en cada punto indican la desviación estándar de las réplicas.....   | 46 |
| Figura 7. Pruebas del tetrazolio en las tres condiciones de estudio.....   | 48 |
| Figura 8. Separación de proteínas en gel de 12.5% SDS 1D. Se colocó en cada pozo la muestra un volumen de 1 $\mu$ L seguido de 2 $\mu$ L (Aproximadamente 15 $\mu$ g/ $\mu$ L) de la misma muestra; en el primer carril el marcador de PM; en los posteriores dos el extracto de la condición control (A, color verde), seguido del T6.2 (B, color café) y finalizó con el T10 (C, color azul). ....   | 50 |
| Figura 9. Numeración de las manchas en los geles analizados en las condiciones (Tabla 6). Las manchas con números de color azul, son aquellas que fueron secuenciadas. ....  | 53 |
| Figura 10. Diagrama de Venn de la expresión de las proteínas analizadas por el software Ludesi-REDFIN en las tres condiciones de estudio. Se analizaron un total de 77 manchas. ....   | 54 |
| Figura 11. Análisis estadístico (Prueba de Tukey o LSD) para comparar las diferencias entre los tratamientos realizados de las proteínas que son estadísticamente significativas. El número superior de cada gráfica es el número de identificación de la mancha. La primera columna es de aquellas proteínas que aparecen como resultado del envejecimiento; la segunda aquellas que disminuyen, mientras que la tercera representa proteínas de expresión variable. .... | 55 |
| Figura 12. Análisis estadístico (Prueba de Tukey) para comparar las diferencias entre los tratamientos realizados de las proteínas que son estadísticamente significativas y únicas para cada condición. El número superior de cada gráfica es el número de identificación de la mancha. ....  | 56 |
| Figura 13. Numeración de las manchas secuenciadas por espectrometría de masas (Tabla 6). Las manchas en recuadros verdes son aquellas que son únicas para el control, las de recuadros color café son las únicas en la condición T6.2. ....  | 61 |
| Figura 14. Numeración de las manchas secuenciadas por espectrometría de masas (Tabla 6). Las manchas en los recuadros azules son las que aparecen en todas las condiciones. ....   | 62 |



|  |     |
|--|-----|
| Figura 15. Valores del PROBIT gráficados para obtener la ecuación de la recta. ....  | 106 |
| Figura 16. Semillas y cubiertas teñidas con sal de tetrazolio (control).....   | 109 |
| Figura 17. Semillas y cubiertas teñidas con sal de tetrazolio (T6.2).....  | 110 |
| Figura 18. Semillas y cubiertas teñidas con sal de tetrazolio (T10).....   | 111 |
| Figura 19. Imágenes usadas para el análisis de la condición control o T0 con el software LUDESI REDFIN 3 (cuatro replicas). ....   | 112 |
| Figura 20. Imágenes usadas para el análisis de la condición control o T6.2 con el software LUDESI REDFIN 3 (cuatro replicas). .... | 114 |
| Figura 21. Imágenes usadas para el análisis de la condición control o T10 con el software LUDESI REDFIN 3 (cuatro replicas) .....  | 116 |

## Abreviaturas

Ácido γ amino- butírico (GABA)  
Ácido etildiaminotetraacético (EDTA)  
Diacilglicerol (DAG)  
DL-ditiotreitol (DTT),  
Electroforesis bidimensional (2D)  
Electroforesis unidimensional (1D)  
Especies reactivas de oxígeno (ROS)  
Espectrometría de masas (EM)  
Germinación (G)  
Gradiente inmovilizado de pH (IPG)  
Humedad relativa (HR)  
Inositol (IP3)  
Isoelectroenfoque (IEF)  
Muerte celular programada (PCD)  
O-metiltransferasa (OMTs)  
Porcentaje de germinación (%G)  
Proteínas de choque térmico (HSP)  
Proteínas de estrés universal (UPS)  
Proteínas de la embriogénesis tardía (LEA)  
Proteínas del grupo de alta movilidad (HMG)  
S-adenosil-L-metionina (SAM)  
Succinato semialdehido deshidrogenasa (SSADH)

## Expresión diferencial de proteínas en semillas de *Cedrela odorata* L. como consecuencia del envejecimiento acelerado.

### Resumen

*Cedrela odorata* L. (Cedro rojo) es una especie de importancia en la industria forestal en las regiones tropicales de México. Debido a la sobreexplotación se considera prioritaria su conservación y reforestación. Los bancos de germoplasma representan una alternativa de conservación; sin embargo, las semillas de cedro presentan una pérdida acelerada de la viabilidad, lo cual dificulta su almacenamiento a largo plazo. En este trabajo, se utilizó un enfoque proteómico comparativo para el estudio de los eventos que ocurren durante el envejecimiento en semillas de cedro. Con este fin, se evaluó un lote almacenado de semillas de *C. odorata* cuya germinación (G) fuera homogénea y mayor al 85%, la cual fue sometida a envejecimiento acelerado, a 42°C y 75% de humedad relativa. Se comparó el perfil de expresión de proteínas obtenido por electroforesis bidimensional (2 D) de semillas: a) con %G>85 (control), b) con %G50, c) con %G<20. Se obtuvieron cuatro geles de cada condición que se analizaron cualitativa y cuantitativamente utilizando el software de análisis especializado LUDESI-REDFIN. Se encontró una preponderancia de proteínas con pl de 5-10 y peso molecular menor a 40 KDa. Se detectaron un total de 130 proteínas, de las cuales 54 se comparten entre todas las condiciones, cuatro entre el control y la %G50, nueve entre la %G50 y G<20%, tres entre el control y la G<10%, dos se detectaron únicamente en las semillas control, cinco en la condición %G50 y ninguna para la G<20%. Se seleccionaron para secuenciación por nano-ESI-MS aquellas que modificaron su expresión significativamente. Se espera que la información contribuya a comprender mejor los procesos que ocurren durante el almacenamiento que conducen a la pérdida de viabilidad de las semillas de cedro rojo; asimismo, identificar potenciales marcadores moleculares asociados a la longevidad, que permitan de promover nuevas estrategias de conservación, selección y mejoramiento de la especie.

## Summary

*Cedrela odorata* L. (Red Cedar) is an important species in forestry industry in the tropical regions of Mexico. Due to overexploitation, conservation and reforestation of this species is considered a priority. Germplasm banks represent an important conservation approach; however, Cedar seeds show an accelerated loss of viability, which hinders its long term storage. In this research, a comparative proteomic approach was used for the study of the events that occur during seed aging in this species. A stored seed batch of *C. odorata* presenting homogeneous and vigorous germination (G) (above 85%), was subjected to accelerated aging, at 42° C and 75% relative humidity. The protein expression profile of seed with: a) %G > 85 (control), b) % G50, and c) %G < 20, was compared by two-dimensional electrophoresis (2D). Four gels of each condition were analyzed qualitatively and quantitatively using specialized analysis LUDESI-REDFIN software. A majority of proteins was found with a pI of 5-10 and less than 40 KDa molecular weights. Detected a total of 130 proteins, of which 54 are shared among all the conditions, four between the control and the % G50, nine between the G50 and G % < 20%, three between the control and the G < 20%, two were only detected in seed control, five in the condition % G50 and zero for the G < 20%. Those that modified their expression significantly were selected for sequencing by nano-ESI-MS. The information is expected to better understand the processes that occur during storage which lead to the loss of viability of the seeds of Red Cedar, leading to the identification of potential molecular markers which could enable new strategies of selection, improvement and conservation of the species.

## Introducción

México por su topografía es un país de gran diversidad biológica, variedad de climas y una con amplia historia biológica; estos factores forman un mosaico de condiciones ambientales que promueven una gran variedad de hábitat y formas de vida (CONABIO, 1998). Dentro de esta diversidad se encuentra *Cedrela odorata* L. (cedro rojo), que es considerada una de las especies maderables de gran importancia para la industria forestal en las regiones tropicales. El Anuario Estadístico de la Producción Forestal de México (SEMARNAT, 2014) la cataloga como una madera preciosa que, junto a la caoba y el cedro rosado, representan el 0.4% de la producción maderable. Aunque conforma una pequeña parte del ingreso total del sector, el valor de la madera ( $m^3/r$ ) es más elevado que el de otras especies como el pino y otras coníferas (SEMARNAT, 2014). Este motivo ha llevado a la sobreexplotación de la especie a lo largo de su distribución natural, que no se ha compensado con programas de reforestación (Patiño, 1997). La tala en zonas naturales ha tenido como efecto eliminar los individuos más favorables, puesto que se realiza la tala selectiva de individuos que presentan las mejores características para su explotación como lo es el fuste recto, altos, anchos, menos bifurcaciones, menos plagados, etc. (CITES, 2007), dejando a los menos favorecidos fenotípicamente en su lugar de origen, lo que lleva a la pérdida de biodiversidad y de especímenes favorables para su comercio. Actualmente el *C. odorata* está catalogada como una especie vulnerable y sujeta a protección especial en la norma la NOM-O59-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010), y es considerada como especie prioritaria para la conservación y reforestación por la Conafor.

Debido a la importancia que tiene esta especie en el país, una de las estrategias propuestas para ayudar a la conservación es el almacenamiento de semillas en los bancos de germoplasma, para así mantener un acervo del recurso genético disponible a largo plazo (Rao *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de que el cedro rojo posee características de bajo contenido de humedad y tolerancia a la desecación, tiene una reducida longevidad y es sensible a bajas temperaturas

(Burns *et al.*, 1965; Orwa *et al.*, 2009; CONABIO, 2013), por lo que podría clasificarse como semilla intermedia. Esto hace que su conservación a largo plazo represente un desafío, motivo por el cual este material no está disponible en la mayoría de los bancos de semillas comerciales ni institucionales (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

Se debe considerar que la disminución de la longevidad es una consecuencia del proceso de envejecimiento, lo cual implica una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren en las células que conducen a la pérdida de viabilidad, donde la manera más directa de evidenciar estos cambios es midiendo la germinación, que se verá visiblemente disminuida (Jain *et al.*, 2006). Esta pérdida depende de la sensibilidad de la semilla, por lo que la viabilidad en almacenamiento dependerá de las condiciones de almacén y del tipo de semilla (Rossetton y Filho, 1995; Rao *et al.*, 2007).

Si se considera que el proceso de envejecimiento es multifactorial, una estrategia para abordarlo es a través de estudios globales que permitan integrar los diferentes procesos involucrados. Los análisis proteómicos permiten conocer los procesos fisiológicos que están ocurriendo en un momento determinado o como consecuencia de una situación de estrés; permite detectar la abundancia de las proteínas involucradas en dichos procesos, a su vez como se modifica su expresión, la abundancia e incluso interacciones ante situaciones fisiológicas diversas (Espejel y Roa, 2008). Gracias a esto, las proteínas son las moléculas más empleadas como biomarcadores ante un proceso de estrés, ya que se puede seguir su aumento o disminución en la expresión, así como también los cambios postraduccionales que pueden llegar a presentarse (Dozal, 2012).

Con esta información se puede dilucidar que procesos están implicados en el almacenamiento y la pérdida de viabilidad de las semillas, con la finalidad de mejorar las estrategias de almacenamiento, que permitan mantener las semillas por mayor tiempo. A su vez aporta conocimiento no solo para el cedro si no también información para las especies forestales tropicales, de las cuales la información a nivel proteómico en procesos de envejecimiento es escasa.

Con el fin de estudiar los cambios en la expresión de proteínas en semillas de cedro rojo que ocurren como consecuencia del envejecimiento durante el almacenamiento, se comparó el perfil de expresión de las proteínas de semillas que se sometieron a un tratamiento de envejecimiento acelerado (deterioro controlado en condiciones de alta temperatura y humedad relativa), con semillas de alta viabilidad y vigor. Usando la electroforesis bidimensional (SDS-PAGE-2D) se identificaron cambios en los patrones de expresión de proteínas y se detectaron 15 manchas que presentaron cambios significativos en sus niveles de expresión. A través de la espectrometría de masas (EM) se identificaron seis, las cuales pudieran ser potenciales biomarcadores de la capacidad germinativa.

## 1. Antecedentes

### 1.1 Generalidades de *Cedrela odorata* L.

*Cedrela odorata* L. (1759) es un árbol perteneciente a la familia de las Meliaceas, conocido comúnmente como cedro rojo, cedro mexicano, cedro colorado, cedro oloroso, Acuy, Calicedra, etc. (CONABIO, 2013).

Es una especie originaria de América tropical y se distribuye de manera natural desde México hasta el norte de Argentina; se encuentra en las Islas Caribe, y se ha introducido en Europa, África, Australia así como otros países tropicales (Méndez y Sánchez, 2012). En México, se encuentra principalmente en la vertiente del Golfo, desde Tamaulipas y San Luis Potosí hasta Yucatán; en la vertiente del Pacífico, desde Sinaloa hasta Guerrero y Chiapas (CONABIO, 2013).

El cedro rojo es una especie heliófila que llega a medir de 20 a 35 m de altura y tiene un diámetro de altura de pecho de 1.7 m. Presenta follaje caducifolio, es de copa grande, redondeada, robusta y extendida o achatada, sus hojas son alternas de 15 a 50 cm, compuestas por 10 a 22 folíolos opuestos o alternos; sus ramas son ascendentes, arqueadas y gruesas (Salazar *et al.*, 2000).

Es un árbol de tronco recto, robusto, a veces con pequeños contrafuertes (1 m de alto). La corteza externa es fisurada con costillas escamosas, de color pardo grisáceo o moreno rojiza; la interna es color rosada o pardo amarillenta, fibrosa y amarga; su grosor es aproximado a los 20 mm. (CONABIO, 2013)

Sus flores son monoicas, dispuestas en panículas terminales largas y sueltas de 15 a 30 cm, angostas tubulares con 5 pétalos, suavemente perfumadas con forma de cáliz de copa, color crema verdosa (Salazar *et al.*, 2000; SIRE, 2012). Sus frutos son infrutescencias de hasta 30 cm de largo, capsulas leñosas, elipsoides, de color pardo verdoso o moreno con grupos de lenticelas pálidas, con olor a ajo, las cuales producen un exudado blanquecino y acuoso cuando están inmaduras. Su desarrollo abarca aproximadamente 9 meses; la producción de frutos inicia



entre los 10 o 12 años de edad. Cuando el fruto abre libera alrededor de 30 o 50 semillas (Salazar *et al.*, 2000).

Sus semillas son aladas, de color café, de 2 a 5 mm de largo (incluyendo el ala, la cual está adherida al eje), y su peso es alrededor de 8 a 10% del peso seco del fruto. Un kilogramo contiene alrededor de 20,000 a 50,000 semillas. Estas son anemócoras y se liberan en temporada seca. Su viabilidad disminuye si se almacena en condiciones muy secas o a temperaturas bajas (Burns y Honkala, 1965; Pennington y Sarukán, 2005; CONABIO, 2013).

El cedro rojo se considera una de las especies preciosas, ya que produce una madera de muy alta calidad, es rojiza, fácil de trabajar, no presenta problemas en los procesos de secado, posee buena estabilidad y durabilidad (Cintrón, 1990; Méndez y Sánchez, 2012; SIRE, 2012) Dichas características hacen que, después de la caoba, sea considerada la madera más importante dentro de la industria forestal en México y América tropical.

La madera se usa principalmente para la fabricación de muebles finos, decoración de interiores y en construcción en exterior debido a su resistencia a las termitas; pero también es utilizada en productos torneados, artesanales, esculturas, instrumentos musicales, tablas, vigas, cajas de puros, etc. (SIRE, 2012). También posee características medicinales como: antipirético, abortivo, expectorante, analgésico, así como para padecimientos como bronquitis, dolor de muelas, indigestión, diarrea, vomito, etc. (Cintrón, 1990; Méndez y Sánchez, 2012).

Por su elevado valor comercial, esta especie se ha visto amenazada por la sobreexplotación y la tala selectiva, dicho término referido a la tala de árboles de mejor crecimiento, dejando la población con genotipos menos favorecidos (Barrance, 2003). En la mayoría de los países donde se encuentra de forma natural es considerada una especie de interés prioritario para su reforestación y conservación y en México se ha colocado en la lista de especies sujetas a protección especial en la NOM-O59-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010).

Diversas instituciones nacionales han implementado estrategias para conservación y protección de recursos forestales, entre ellas se plantea contar con una fuente de germoplasma de calidad que permita contribuir a reducir la presión sobre las poblaciones de cedro rojo en el país (Méndez y Sánchez, 2012).

## 1.2 Conservación de semillas en almacenamiento.

En virtud de la importancia de las semillas para la alimentación humana y para la conservación de su germoplasma se ha puesto gran interés en estudiar su comportamiento en almacén.

El almacenamiento es la preservación de las semillas en condiciones ambientales controladas para que mantengan la viabilidad durante periodos prolongados (Rao *et al.*, 2007); es considerado una forma de conservación *ex situ* la cual implica la recolección de muestras representativas de una especie y su mantenimiento fuera de las condiciones naturales. Las ventajas que proporciona son el control directo sobre el material, fácil accesibilidad y disponibilidad (Reid y Miller, 1989).

Existen dos modalidades de conservación de los recursos genéticos almacenados en forma de semilla: las colecciones base, que conservan las muestras de semilla a largo plazo para seguridad, y las colecciones activas, que mantienen muestras de semilla para el uso inmediato (Iriondo, 2001).

Para poder establecer procedimientos adecuados de almacenamiento, como estrategia de conservación, los avances en la biología durante las últimas décadas han permitido comenzar a comprender el comportamiento del deterioro de las semillas con el paso del tiempo, con el objeto de desarrollar técnicas que garanticen una alta calidad y una máxima longevidad en almacenamiento, lo que aporta beneficios a corto o largo plazo (Rao *et al.*, 2007).

Sin embargo, la reducida disponibilidad del material es un factor que acompaña a las actividades de conservación, de manera que la capacidad de ensayar protocolos y llevar a cabo experimentos con réplicas se encuentra a menudo muy limitada (Pence, 1999; Iriondo, 2001).

La realización de estos estudios permite un mejor conocimiento de las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado y aporta información útil para mejorar las estrategias de conservación de las especies, sobretodo de aquellas que se encuentran amenazadas (Miller *et al.*, 1990).

### 1.3 Las semillas y su clasificación de acuerdo a su almacenamiento.

La semilla es un óvulo fecundado que posee al embrión, el tejido de reserva, la cubierta seminal de reserva y la cubierta externa o testa (Bewley *et al.*, 2013) Representan la etapa inicial en la formación de una planta y tienen características estructurales, anatómicas y metabólicas que le permiten ser una estructura de resistencia independiente frente al medio ambiente; son un puente entre una generación a otra y permite la multiplicación de los individuos de las especies, su dispersión y persistencia en el tiempo, y por tanto su renovación en el ecosistema (Chin, 1994; CATIE, 1996; Márquez *et al.*, 2013).

Constituyen uno de los principales recursos para el manejo agrícolas, silvícola y de conservación del germoplasma vegetal, para la recuperación de especies valiosas sobreexplotadas (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997). Por ello, se deben conocer las diferentes características que permiten que su almacenamiento sea fácil y económico.

Bonner y Vozzo, (1988) clasifican a las semillas en tres formas dependiendo su viabilidad en condiciones de almacenamiento:

**Ortodoxas:** También conocidas como tolerantes, son semillas con bajo contenido de humedad al momento de su diseminación; soportan la desecación durante su desarrollo, la cual puede llegar hasta contenidos de humedad muy bajos sin sufrir daños, por lo que sobreviven en estos estados de deshidratación. La humedad que alcanzan debe mantenerse en equilibrio con la humedad ambiental relativa, aproximadamente un 10%; las semillas con almidón tienen contenidos cercanos al 5%, en tanto que las semillas grasas están entre el 2 y 3% (Vázquez-Yanes *et al.*,

1997; Pammenter y Berjak, 1999; Tommasi *et al.*, 1999; Arc *et al.*, 2011; Márquez *et al.*, 2013). Pueden almacenarse en estado seco y mantener así su viabilidad desde la cosecha hasta la siguiente temporada de cultivo, o incluso por varias décadas. Se debe considerar que no estén debilitadas por hongos. Su longevidad aumenta cuando disminuye el contenido de humedad y la temperatura durante el almacenamiento, en una forma cuantificable y predecible. Pueden ser almacenadas con una humedad inferior a 10% y rangos de bajas temperaturas (entre los -15 y -150°C, siempre y cuando los contenidos de humedad sean óptimos para exponerlas a estas temperaturas), en envases semipermeables (CATIE, 1996; Berjak y Parmenter, 1997; Pammenter y Berjak, 1999). La mayoría de las semillas usadas en la agricultura pertenecen a esta clasificación.

Dentro de este grupo, pueden subclasificarse a las semillas como subortodoxas cuando pueden ser almacenadas como ortodoxas pero por periodos cortos, debido a que presentan una amplia concentración de lípidos o su cubierta seminal es delgada (CATIE, 1996). Cualquier semilla que no se comporte de esta manera no puede considerarse ortodoxa, lo que significa que un gran número de semillas de especies tropicales son consideradas intermedias o recalcitrantes según su comportamiento de almacenamiento (Bewley *et al.*, 2013).

**Recalcitrantes:** También conocidas como sensibles, son semillas con altos contenidos de humedad al momento de su diseminación. En contraste con las ortodoxas estas no pueden desecarse por debajo de un punto relativamente alto de su contenido de humedad, generalmente mayor al 20%, ya que sufren daños en sus estructuras (Tommasi *et al.*, 1999; Arc *et al.*, 2011). Algunas especies comienzan a morir rápidamente aun en equilibrio con una humedad relativa ambiental de 98-99%, y la mayoría de las semillas mueren cuando su contenido de humedad está en equilibrio con una humedad ambiental de 60-70%, lo cual correspondería a un contenido de humedad del 16 al 30% sobre el peso fresco (Chin y Roberts, 1980; Vázquez-Yanes *et al.*, 1997). Esto implica que los procesos o mecanismos que confieren tolerancia a la deshidratación son variables, por lo que no existe un método satisfactorio para mantener la viabilidad de las semillas

por periodos prolongados, aproximadamente no mayores a un año (Berjak y Parmenter, 1997; Tommasi *et al.*, 1999). Su almacenamiento no puede ser a temperaturas menores a 0°C debido a que la cantidad de agua libre es elevada y al congelarse genera daño en los tejidos (Bewley *et al.*, 2013; Márquez *et al.*, 2013).

**Intermedias:** Son semillas que no presentan un comportamiento ni como recalcitrantes ni ortodoxas; presentan niveles de humedad relativa de entre 7 a 10% (en equilibrio con una humedad relativa ambiental de 30-50%), pero son sensibles a la desecación inferior a su humedad relativa, esto es debido a que pueden presentar daños en tejidos (CATIE, 1996; Vázquez-Yanes *et al.*, 1997). La longevidad de algunas semillas de origen tropical se reduce cuando la temperatura de almacenamiento es menor a 10°C, por lo que deben ser almacenadas a bajos contenidos de humedad y temperaturas mayores a las de congelación. Dependiendo la especie de las semillas, su viabilidad puede prolongarse por algunos años si se les da el correcto almacenamiento (Márquez *et al.*, 2013).

#### 1.4 Comportamiento de las semillas de *C. odorata* durante el almacenamiento.

Retomando la descripción de las semillas de cedro rojo, la literatura menciona que es una semilla cuyo comportamiento es ortodoxo, no se conoce un periodo de dormancia, posee un bajo contenido de humedad (9 a 10%), tienen una reducida longevidad, son tolerantes a la desecación y sensibles a bajas temperaturas (Burns y Honkala 1965; Orwa *et al.*, 2009; CONABIO, 2013) (Figura 1).

Al momento de ser liberadas de la planta madre, la semilla tiene un vigor de germinación mayor al 90%, presenta una rápida germinación, que se completa entre las 2 y 4 semanas (Burns y Honkala, 1965). Considerando lo que describe la literatura sobre esta especie, y la descripción de los diferentes tipos de semillas mencionados anteriormente, se puede considerar que las semillas de cedro se ubican mejor en la categoría de intermedias ya que no presentan todas las características de una semilla ni ortodoxa ni recalcitrante.

En cuanto a su almacenamiento, se ha recomendado guardarlas en recipientes herméticos a temperaturas entre los 2-4°C y con una humedad relativa de entre 6 a 9%, para mantener una viabilidad de aproximadamente 2 años (Vázquez-Yanes *et al.*, 1999; Orwa *et al.*, 2009; CONABIO, 2013). Debido a estas características, su almacenamiento a largo plazo resulta una tarea difícil, a su vez el estudio de este comportamiento durante el almacenamiento es muy escaso.

Debido a la falta de investigación acerca de las especies forestales tropicales, y a que la mayoría se consideran de tipo recalcitrante o intermedio, con viabilidad reducida, los métodos de almacenamiento no pueden abarcar periodos muy prolongados por lo que este tipo de material no está disponible en la mayoría de los bancos de semillas ni comerciales ni institucionales (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).



Figura 1. Condiciones de almacenamiento para los tipos de semillas. Esquema propio.

## 1.5 Vigor y viabilidad de las semillas durante el almacenamiento.

Para que una estrategia de almacenamiento sea considerada como exitosa, la semilla debe mantener su viabilidad y vigor por un período prolongado. La viabilidad se refiere a la capacidad de una semilla de germinar adecuadamente cuando las condiciones son propicias (Rajjou *et al.*, 2012) mientras que el vigor se define como una propiedad compleja, que determina el potencial para germinar rápidamente de manera uniforme y desarrollarse en un amplio rango de condiciones ambientales (Arc *et al.*, 2011; Rajjou *et al.*, 2012). El período durante el cual esto puede ocurrir depende del potencial de conservación fisiológico y genético de la semilla además de las condiciones de almacenamiento.

Dichas propiedades de las semillas son medidas realizando pruebas de germinación. La germinación es un proceso que comienza con la absorción de agua (imbibición) y culmina con la elongación del eje embrionario (emergencia de la radícula) a través de las cubiertas de la semilla. Incluye numerosos eventos: hidratación de proteínas, cambios estructurales subcelulares, respiración, síntesis macromoleculares y elongación celular, ninguno de los cuales es en sí misma única para la germinación (Patiño *et al.*, 1983; Nonogaki *et al.*, 2010; Weitbrecht *et al.*, 2011; Bewley *et al.*, 2013; Márquez *et al.*, 2013).

La semilla por lo general tiene una tasa metabólica baja (en el caso de las semillas recalcitrantes su tasa metabólica es un poco más elevada), por lo que una semilla madura deshidratada.

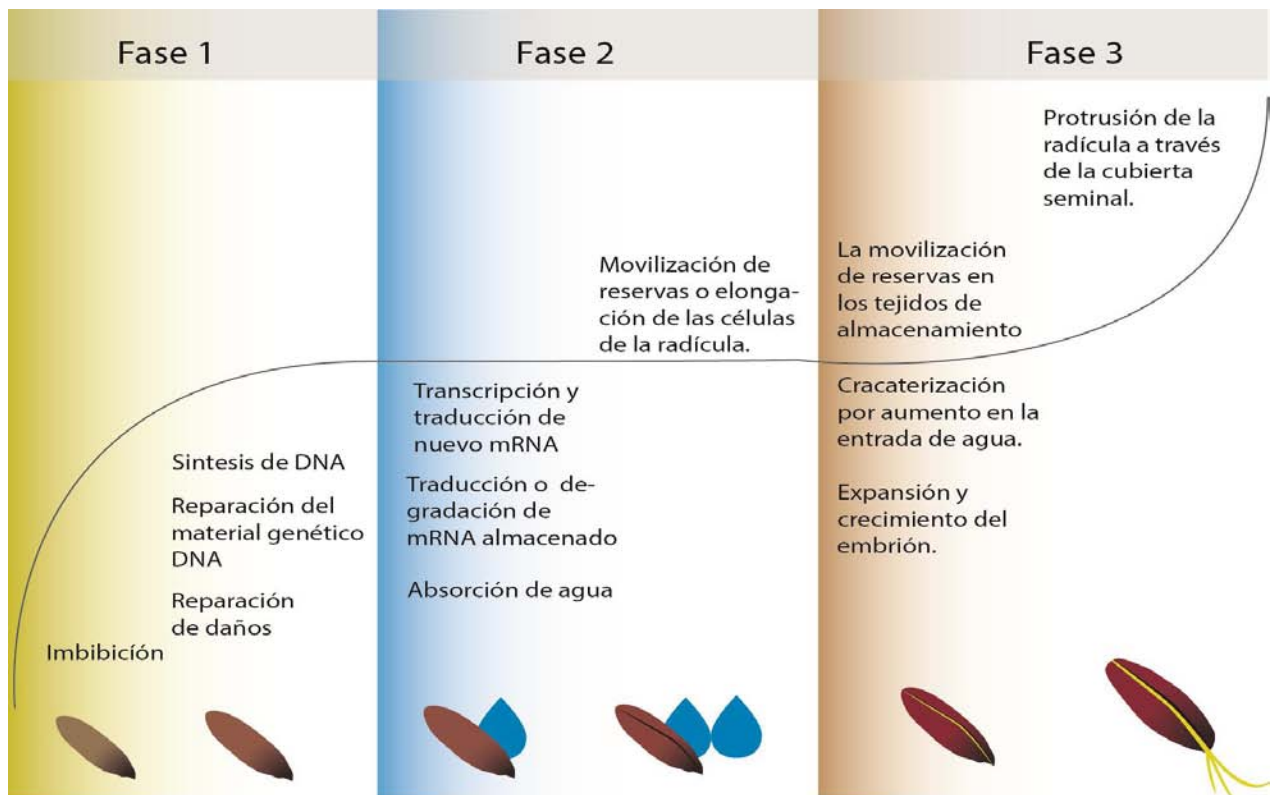


Figura 2. Fases del proceso de germinación (Modificada de Nonogaki *et al.*, 2010 y Márquez *et al.*, 2013 y diseñado por D.G. López J. Y.).

La germinación tiene tres fases (Figura 2): durante la primera, la semilla se hidrata totalmente e inicia la reparación de su material genético junto con la reparación de los daños que pudo haber sufrido en el proceso de deshidratación. Posteriormente, la entrada de agua se mantiene constante y los procesos bioquímicos que comenzaron en la primera fase se realizan con mayor intensidad y se inician nuevos procesos como como la movilización de reservas o elongación de las células de la radícula. En la etapa final, comienza el proceso de expansión y crecimiento del embrión, por lo que el requerimiento de agua es aún mayor y culmina con la protrusión de la radícula (Nonogaki *et al.*, 2010; Márquez *et al.*, 2013).



## 1.6 Evaluación de la germinación.

Para que se realice el proceso de germinación de manera adecuada se deben considerar las condiciones como lo son una humedad suficiente, temperatura, intercambio de gases requerido y luz adecuada, en caso de ser necesario (Rajjou *et al.*, 2012; Bewley *et al.*, 2013). Esta prueba se hace bajo condiciones favorables para cada semilla y se usan platos, bandejas de plástico o cajas Petri, en los cuales puede colocarse como medio de germinación papel filtro o papel secante, algodón absorbente o capas de papel toalla, papel higiénico, etc. El material utilizado debe mantenerse estéril o lo más limpio posible para evitar la contaminación por hongos (Sierra, 2005).

Se recomienda realizar las pruebas de germinación periódicamente para monitorear el estado de las semillas, así como su viabilidad durante el almacenamiento, ya que es una forma de comprobar el deterioro de estas. Aunque no es la única prueba que puede realizarse, es la más práctica y económica debido a que no necesita equipos ni material costoso.

Otras pruebas importantes que se considera para la evaluación de la viabilidad y calidad de la semilla, son las colorimétricas como la del Tetrazolio; sin embargo, la bibliografía al respecto en las especies forestales tropicales es muy escasa (Benito Matías *et al.*, 2004).

## 1.7 Longevidad y envejecimiento en el almacenamiento.

Una de las cualidades más importantes para el almacenamiento de semillas es que estas presenten una elevada longevidad. Propiamente, la longevidad se define como el lapso en el que las semillas mantienen su viabilidad (Rajjou *et al.*, 2012). Dicha condición puede verse disminuida por cuestiones propias de la semilla o condiciones ambientales; por lo cual se han generado dos conceptos: la longevidad ecológica, a lo que se le considera el tiempo en que la semilla permanece viable en condiciones naturales; y la longevidad potencial, el cual representa el tiempo en que puede permanecer viable en condiciones artificiales

(Márquez *et al.*, 2013). El presente trabajo se enfoca solo en la longevidad potencial, pues los únicos cambios que se consideran están presentes en el almacenamiento.

Durante el almacenamiento, las semillas disminuyen su longevidad como consecuencia del envejecimiento propio de cada especie; en algunos casos dicha disminución puede ser en periodos muy prolongados, mientras que en otros (semillas recalcitrantes), el proceso es muy rápido. El envejecimiento es un fenómeno universal que ocurre en todos los organismos vivos en el curso natural del desarrollo, aunque las condiciones desfavorables pueden causar que se apresure el proceso (Ellis y Roberts, 1981; Jain *et al.*, 2006). En general se define como un incremento en la probabilidad de la muerte de un individuo por unidad de tiempo, o un incremento de la edad. En las semillas, puede manifestarse de manera fisiológica y bioquímica, entre las que encontramos diversos parámetros como: retardo en la germinación y emergencia de radícula, crecimiento lento, aumento de la susceptibilidad al estrés ambiental (temperatura, humedad, patógenos, etc.), cambio en la coloración de la testa y finalmente pérdida de la capacidad germinativa (Jain *et al.*, 2006).

#### 1.8 Procesos fisiológicos y moleculares asociados al envejecimiento de semillas.

El envejecimiento es un proceso complejo en el cual se ven involucrados múltiples eventos: la muerte celular programada, el estrés oxidativo, el daño a membranas, así como el daño a macromoléculas (ADN, ARN y proteínas) y a los mecanismos celulares encargados de su síntesis y reparación (Hu *et al.*, 2012; Domínguez y Cejudo, 2014).

La muerte celular programada (PCD, por sus siglas en inglés) ocurre de manera natural en las células y se considera como un proceso ordenado y regulado de eliminación selectiva de células, en algunos casos eliminando células que tienen funciones temporales (Domínguez y Cejudo, 2014). La PCD es necesaria para completar con éxito la maduración de la semilla, así como para su germinación; a

su vez puede ayudar en la respuesta hipersensible ante el ataque de patógenos para evitar su propagación en el tejido. Se han realizado estudios de daño cromosómico, de escisión de ADN y de pérdida de viabilidad, en los que observan ciertas características que sugieren que la degeneración de semilla se produce por medio de la PCD (Murata *et al.*, 1984; Rao *et al.*, 1987; Cheah y Osborne, 1978; Kranner *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2012)

Por otra parte, durante el envejecimiento ocurre un proceso degenerativo no regulado de los componentes celulares, como daño a biomoléculas de reserva, disminución en la actividad respiratoria, en la cantidad de ARNr, en la síntesis de *novo* de ARNm, en la actividad enzimática, de la síntesis de proteínas y la integridad cromosómica. También se presentan procesos de degradación del ADN y ARNm en la semilla madura; así como la pérdida de la integridad membranal y pérdida de la producción de ATP, o deficiencia en su capacidad de almacenamiento (Noodén y Leopold, 1988; Smith y Berjak, 1995; Jain *et al.*, 2006; Hundertmark *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012).

Una señal del inicio de daño celular son los procesos de oxidación y peroxidación de las semillas a causa del envejecimiento (Bailly *et al.*, 1996). Este comienza con la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), las cuales son especies químicas altamente reactivas que son capaces de atrapar o donar electrones de las moléculas próximas, estas derivan de elementos químicos, siendo las de mayor importancia (desde el punto de vista biológico), aquellos derivados del hidrogeno, el oxígeno, el carbono y el nitrógeno (Parrish y Leopold, 1978; Paula, 2004; Bailly *et al.*, 2008)

Como resultado, los ROS son importantes intermediarios toxicológicos y están comúnmente involucrados en el "estrés oxidativo", término que se define como la interrupción del equilibrio oxidante-antioxidante, lo que lleva al daño potencial (Sies, 1997). Esto puede deberse a un aumento en la producción de especies oxidantes o una disminución de la capacidad de protección. Inicialmente estos ROS se producen mediante el metabolismo celular, afectando principalmente las membranas donde se comienza la cadena de reacciones de peroxidación lipídica,

lo que conlleva a la alteración del metabolismo (Kehrer, 2000; Roqueiro *et al.*, 2010; Hundertmark *et al.*, 2011).

La peroxidación de lípidos, inicia con la abstracción de un hidrógeno por un radical hidroxilo (Bewley y Black, 1994), por lo que los lípidos de las membranas celulares se oxidan fácilmente pues contienen abundantes ácidos grasos insaturados, lo que modifica tanto la estructura como el funcionamiento de la membrana; algunos son cambios en la permeabilidad celular, pérdida de fluidez e integridad de la membrana por disminución de fosfolípidos (Melo y Cuamatzi, 2008; Pichardo-González *et al.*, 2010; Roqueiro *et al.*, 2010; Bewley *et al.*, 2013). Como consecuencia, los ácidos grasos de las membranas disminuyen conforme la semilla se deteriora perdiendo así capacidad germinativa y vigor.

A su vez, se acumulan diferentes daños en las macromoléculas que componen las células, entre estos tenemos el daño al ADN y al ARN. El daño genético puede acumularse de tal manera que los embriones son incapaces de germinar y crecer. Se sabe que el número de aberraciones cromosomales observados en las primeras divisiones celulares durante la germinación permite estimar el daño acumulado durante el almacenamiento (Rajjou y Debeaujon, 2008; Arc *et al.*, 2011). Aunque hay mecanismos de reparación del ADN, como la reparación por escisión de nucleótidos y de bases la recombinación homóloga y extremos no homólogos (El Maarouf *et al.*, 2011; Ventura *et al.*, 2012) que contribuyen a mantener la integridad del genoma, cuando los daños que presenta son en gran cantidad, no es posible dicha reparación. La supervivencia a largo plazo de las semillas depende por lo tanto, de que los mecanismos de reparación se encuentren funcionales y no hayan sufrido también daños durante el almacenamiento.

Finalmente, la acumulación de daños espontáneos en proteínas es una causa de envejecimiento. Las semillas dependen de manera importante de proteínas almacenadas durante el desarrollo embrionario para su germinación, ya que la transcripción es muy limitada en esta etapa (Bewley *et al.*, 2013). Dichas proteínas juegan un papel importante en la reactivación metabólica, y forman parte de los

mecanismos de reparación y protección contra el daño y estrés oxidativo (Rajjou y Debeaujon, 2008; Bewley *et al.*, 2013). La proteólisis de proteínas alteradas y la formación de residuos de aminoácidos anormales son una fuente de daño importante que conduce al deterioro de las semillas. La síntesis *de novo* de proteínas a partir del ARNm almacenado puede permitir la renovación de las proteínas no funcionales que fueron alteradas en el almacenamiento y que son necesarias para reiniciar el metabolismo en la germinación (Rajjou y Debeaujon, 2008; Bewley *et al.*, 2013); por tanto, puede ser una estimación de la capacidad de germinación, ya que la capacidad de transcripción durante el envejecimiento disminuye (Pillay, 1977). Si no se pueden reparar las proteínas dañadas, estas deben ser reconocidas por proteínas chaperonas y ser eliminadas mediante el sistema ubiquitina-proteosoma. Esta vía está involucrada en el balance de la síntesis de proteínas y su degradación, a su vez en el catabolismo protéico, el cual interviene en el funcionamiento y recambio de proteínas reguladoras, y están implicadas en la modulación del ciclo celular, la reparación de ADN, el catabolismo de proteínas anormales, la biogénesis de los ribosomas, entre otros muchos procesos (Glotzer *et al.*, 1991; McDonald, 1999).

Existen también las proteínas de choque térmico (HSPs), o también conocidas como proteínas de estrés o chaperonas, que se encargan del plagado/desplegado de otras proteínas, de ensamblar complejos multiproteicos, del transporte y clasificación de proteínas en compartimentos celulares y de la señalización y protección de células contra el estrés y la apoptosis (Li y Srivastava, 2004). En el envejecimiento, la finalidad de las proteínas de choque térmico es evitar o reducir el daño a otras proteínas; sin embargo, se desconoce el momento en el cual actúan, si es durante el almacenamiento o posterior a la imbibición (Bewley *et al.*, 2013)

Algunos tipos de daño podrían ser reversibles sin un gasto energético (Reissner y Aswad, 2003). Esto es posible con la proteína L-isoaspartil (D-aspartil) O-metiltransferasa que es una enzima de reparación, que limita el daño producido por la acumulación de isoaspartil anormal (isoAsp) producido por la degradación

de asparaginil (Asn) y aspartil (Asp). De esta manera, este sistema enzimático contribuye a la longevidad y supervivencia de las semillas (Lowenson y Clarke, 1992; Ogé *et al.*, 2008)

### 1.9 Envejecimiento acelerado o deterioro controlado.

En algunas especies (en especial las del tipo ortodoxo), el estudio del envejecimiento en semillas podría abarcar un período demasiado prolongado de tiempo debido a la elevada longevidad, por lo que se han planteado estrategias que aceleren dicho proceso. Entre los diversos factores que se sabe influyen sobre la longevidad en almacenamiento, tanto la humedad relativa (HR) como la temperatura juegan un papel preponderante (Carpenter *et al.*, 1995; Rossetton y Filho, 1995; Salinas *et al.*, 2002).

El envejecimiento acelerado consiste en imitar el envejecimiento natural pero aumentando la velocidad del deterioro (Shibata *et al.*, 2011; Rajjou *et al.*, 2012), lo que permite acelerar considerablemente la tasa de envejecimiento (días en comparación con años). Esto ha resultado muy conveniente para evaluar rápidamente el potencial de vigor de las semillas, así como ofrecer una estrategia para estudiar los procesos fisiológicos y moleculares asociados al envejecimiento (Rajjou *et al.*, 2012).

Harrington (1960) sugirió que dentro de la gama normal de temperaturas y humedades de almacenamiento la reducción de 1% HR o 5°C duplica la vida de almacenamiento en semillas (Parrish y Leopold, 1978); por lo que las condiciones más utilizadas para este tratamiento son alta temperatura (aproximadamente 42°C) y elevada humedad relativa (en algunos casos muy cercana al 100%), considerando un tiempo no mayor a 10 días de deterioro.

El envejecimiento acelerado se ha utilizado principalmente como una herramienta para evaluar el vigor de las semillas y estimar su potencial de almacenamiento en especies agrícolas; por lo que las condiciones más idóneas para cada especie deberán determinarse experimentalmente al monitorear la pérdida de vigor por

dicho deterioro se usan las pruebas de germinación (Leprince *et al.*, 1995; Rossetton y Filho, 1995; Pukacka y Ratajczak, 2005; Samarah y Al-Kofani, 2008; Pedroso *et al.*, 2010; Madruga de Tunes *et al.*, 2011; Werner *et al.*, 2013).

#### 1.10 Análisis proteómicos como herramienta para el estudio del envejecimiento.

Gracias a las recientes investigaciones sabemos que el envejecimiento es un proceso complejo, donde las condiciones de estrés juegan un papel muy importante. Una herramienta útil que contribuye al conocimiento de este proceso son los análisis proteómicos, ya que las proteínas son los componentes funcionales del genoma y reflejan los procesos fisiológicos que ocurren en respuesta a estrés.

El proteoma se ha definido como el conjunto de proteínas que se expresa del genoma en una célula, tejido u organismos en un tiempo determinado, bajo condiciones determinadas (Honoré *et al.*, 2004). A su vez, la proteómica es el estudio sistemático de las propiedades de muchas y diversas proteínas, con el objetivo de proporcionar una descripción detallada de la estructura, función y control de sistemas biológicos en un estado óptimo y uno modificado por algún factor específico (Honoré *et al.*, 2004; Espejel y Roa, 2008). El proteoma se compone de un conjunto activo de moléculas que pueden sufrir más de 200 modificaciones postransduccionales (Krishna y Wold, 1993; Espejel y Roa, 2008; Khan *et al.*, 2011).

El término expresión de las proteínas fue introducido por Wilkins y Gooley (1997) en la definición del proteoma, el cual tiene por objetivo identificar y caracterizar todas las proteínas expresadas por un organismo o tejido, donde su identificación es fundamental (Jungblut *et al.*, 2008). Las primeras técnicas de proteómica se desarrollaron en la década de los setenta y su uso ha evolucionado continuamente desde entonces.

Los patrones de expresión de proteínas cambian ante situaciones fisiológicas o de estrés, lo que permite asociar dichas variaciones de patrones en las diferentes condiciones como biomarcadores moleculares (Espejel y Roa, 2008).

Por lo que el análisis del proteoma implica la identificación y caracterización de las proteínas expresadas, lo que resulta una herramienta para determinar roles biológicos y funciones de proteínas individuales (Sheoran *et al.*, 2005), que pueden funcionar como biomarcadores para una determinada condición de estudio.

Un biomarcador se define como un parámetro biológico medible y cuantificable (concentración enzimática, concentración hormonal, distribución fenotípica de un gen, etc.) que servirá como índice de las variaciones fisiológicas, patológicas o de estrés. Lo que los hace importantes es su capacidad para diferenciar dos o más estados biológicos basados en sus características de eficacia que son determinadas por su sensibilidad y especificidad (Dozal, 2012). Tienen la ventaja de poner en evidencia síntomas tempranos del daño causado por algún factor y, por tanto, pueden ser utilizados como señales de interés (Bozo *et al.*, 2007; Pernía *et al.*, 2008).

Las proteínas, por su abundancia, son las moléculas más empleadas como biomarcadores al denotar la asociación fenotípica. Estas se clasifican como proteínas de expresión diferencial (por su aumento o disminución en la expresión) y proteínas modificadas postraduccionalmente (Dozal, 2012).

Para el estudio del proteoma hay dos vías: el análisis de proteínas intactas obtenidas desde mezclas complejas, y la vía de análisis de péptidos proteolíticos. Para dichas vías se puede utilizar técnicas como la electroforesis bidimensional (2D), la cromatografía líquida o la marcación por isotopos estables. Todas estas técnicas se acoplan a la espectrometría de masas (EM) para la identificación final de las proteínas (Espejel y Roa, 2008).

La electroforesis es un método analítico en el que se utiliza la corriente eléctrica con la finalidad de separar moléculas según su relación tamaño-carga eléctrica,



usándose como base del desplazamiento una matriz gelatinosa (Dozal, 2012). La electroforesis bidimensional (2D) en geles de poliacrilamida es una herramienta muy usada en la separación y cuantificación de proteínas en mezclas muy complejas (Honoré *et al.*, 2004)

Inicialmente fue usada por O'Farrell y Klose (O'Farrell, 1975; Klose, 2009) para la separación de proteínas, esta técnica constan de dos pasos: en la primera dimensión se aprovechan las propiedades químicas de las proteínas, en este caso su pH característico denominado punto isoeléctrico (pI), donde la proteína tiene una carga neta de cero, las cuales al ser pasadas a través de un gel con un gradiente de pH inmovilizado, se moverán hacia su punto de gradiente correspondiente, y se mantendrán estables en esa posición (Görg *et al.*, 2000). La segunda dimensión consta de la separación de las proteínas de la primera dimensión por peso molecular (O'Farrell, 1975; Honoré *et al.*, 2004; Alberts y Bray, 2006; Espejel y Roa, 2008)

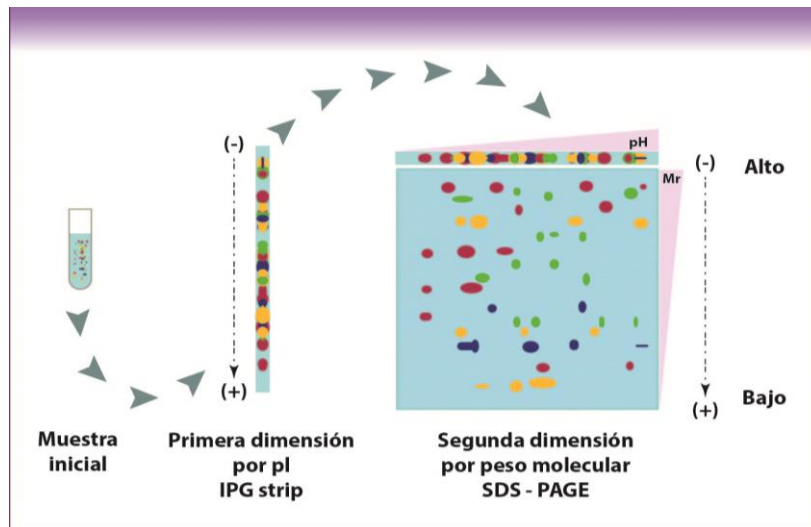


Figura 3. Esquema del proceso de electroforesis bidimensional (2D). Esquema propio.

Uno de los retos de la electroforesis bidimensional (2D) está vinculada a la diversidad química de proteínas y su variación en la expresión de células o tejidos, considerando que los límites de detección de la técnica tiene un rango de mínimo de  $10^4$  moléculas por célula, por ello aquellas proteínas que se expresen en cantidades menores, muy difícilmente podrán ser observadas, lo que complica el

estudio en células o tejidos muy complejos (Rabilloud, 2002); particularmente la identificación cuantitativa de proteínas ácidas o básicas, de membrana, de bajo número de copias, como las nucleares, así como proteínas de alto peso molecular (Espejel y Roa, 2008). Es necesario realizar una buena técnica de extracción de proteínas para lograr el éxito y repetibilidad. La electroforesis 2DE es la técnica más rápida, reproducible y rentable para el análisis del proteoma de especies cuyo genoma no está secuenciado (Carpentier *et al.*, 2005), como es el caso del cedro rojo.

Como se mencionó anteriormente, la electroforesis bidimensional puede acoplarse a espectrometría de masas (EM) que es una herramienta para identificar proteínas de interés después de su separación, fraccionamiento o marcación. Para su análisis debe haber un proceso en el cual se agrega Tripsina que escinde cadenas de polipéptidos exclusivamente en el extremo carboxilo terminal entre residuos de arginina y lisina, produciendo péptidos con residuos básicos en el extremo carboxilo terminal que producen serie de masas-ion que facilita la interpretación de los espectros (Jay y Jan, 2012). Con esta técnica se obtiene información sobre la masa de las proteínas, su secuencia de aminoácidos y en algunos casos los tipos de modificaciones postraduccionales que presente la proteína (He y Chiu, 2003). El péptido ideal para el análisis EM debe ser 7-35 residuos de largo, ser protonado, y tener un estado de baja carga ( $z$ ) y un alta relación de masa a carga ( $m / z$ ) (Khan *et al.*, 2011; Jay y Jan, 2012).

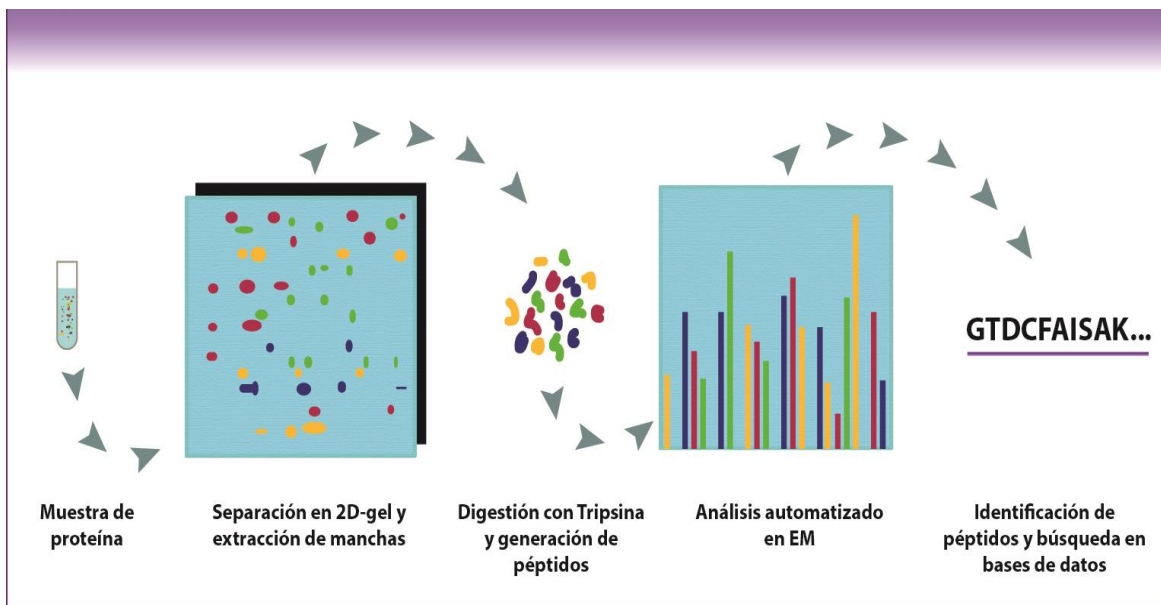


Figura 4. Esquema del proceso general de identificación de proteínas mediante electroforesis bidimensional (2D) y EM. Tomado de <http://www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion18.pdf>.

Con el refinamiento de la electroforesis bidimensional y el desarrollo de métodos más sensibles para la visualización de proteínas y análisis por EM, se ha podido lograr el desarrollo de estudios proteómicos en plantas, en tejidos vegetales, en organelos y en diferentes etapas del desarrollo de las plantas, sin embargo en semillas es muy poca la información al respecto del proteoma embrionario y del tejido del endospermo, así como de la movilización de las proteínas entre estos tejidos durante la germinación (Sheoran *et al.*, 2005).

### 1.11 Análisis proteómicos en semillas.

En cuanto al análisis proteómico en semillas se tienen algunas complicaciones que no se ven en análisis en tejidos (vegetal o animal) u órganos. Esto es debido a las consideraciones anatómicas de las partes que componen a una semilla (embrión o endospermo), de las cuales pueden estudiarse de manera conjunta o separada; también debe considerarse el estado fisiológico, ya sea que la semilla este en desarrollo, maduro o este en proceso de germinación, si es semilla ortodoxa o recalcitrante, si se encuentra en latencia, etc.; también es importante

considerarse la uniformidad genética de las semillas (Miernyk y Hajduch, 2011; Miernyk, 2014).

Debido a que las semillas son ricas en proteínas de reserva esto genera problemas si el estudio incluye el análisis de las proteínas de baja abundancia (Miernyk, 2014). En general todas las semillas sujetas a análisis proteómico dependen de la naturaleza de las semillas y los objetivos previstos del estudio.

La mayoría de los estudios proteómicos realizados en semillas, estudian generalmente la maduración y el desarrollo de la misma, así como también aspectos relacionados con el procesos de germinación; algunos ejemplos son el caso del Lino (*Linum usitatissimum* L.), en el cual se estudiaron aspectos relevantes a la regulación y la acumulación de compuestos almacenamiento (Barvkar *et al.*, 2012). En el caso del arroz (*Oryza sativa*) se analizaron las proteínas que cambian en el proceso de germinación en el embrión (Kim *et al.*, 2009). En *Brassica napus* se estudió los procesos metabólicos que operan en su desarrollo (Hajduch *et al.*, 2006). En tomate (*Solanum lycopersicum*) se estudió el embrión y endospermo en la germinación para conocer las proteínas más abundantes en este proceso (Sheoran *et al.*, 2005). En todos estos estudios se observa que tratan de dilucidar por completo las proteínas y los procesos que dependen de estas y que están involucrados en el desarrollo y germinación, ya sea por si solos o con un factor que modifique un estado basal.

Son pocos los trabajos proteómicos que se han realizado para estudiar la longevidad o vigor de las semillas y estos se han realizado principalmente en especies de interés agrícola.

Con la especie *L. usitatissimum* L. se analizó únicamente el desarrollo de la semilla para obtener información de la regulación y acumulación de compuestos de almacenamiento. Se encontró que la mayoría de los cambios se asociaron a proteínas involucrados en el metabolismo primario, almacenamiento y energía. Las proteínas de reserva, metionina sintasa, RuBisCO y S-adenosilmetionina sintetasa fueron altamente expresadas transcripcionalmente (Barvkar *et al.*, 2012).

A su vez, investigaciones en *Medicago truncatula* mostraron la relación de la acumulación de las proteínas LEA (*Late Embriogenesis Abundant*, por sus siglas en inglés), donde se observó un incremento gradual de estas proteínas aumentan la longevidad. Estos cambios se correlacionaron con la desecación y la tolerancia a estrés (Chatelain *et al.* 2012).

Considerando un factor de estrés en semillas de maíz, se evaluó los efectos del envejecimiento artificial en embriones de semilla seca. Se encontró que el envejecimiento afectó las proteínas implicadas en el metabolismo y la energía, en lo que respecta a la glucólisis, ciclo de ácido tricarboxílico, la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Junto con la reducción en la actividad específica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y el contenido de glucosa-6-fosfato, ácido pirúvico y ATP en las semillas, sugiere que la movilización de los carbohidratos almacenados y suministro de energía es lo que se afecta en el envejecimiento y vigor de la semilla (Xin *et al.*, 2011).

También en maíz se identificó proteínas específicas relacionadas con la viabilidad y se encontró que se expresaron de manera significativamente diferente aquellas involucradas en respuesta al estrés, en el plegamiento y estabilización de proteínas, así como las proteínas relacionadas con el depósito de nutrientes y metabolismo, pequeñas proteínas de choque térmico, proteínas LEA y enzimas antioxidantes (Wu *et al.*, 2011).

En alfalfa (*M. sativa L*), expuesta a estrés salino, se han realizado estudios para conocer más acerca del proceso por el cual se mantiene el vigor de la semilla durante la germinación y, a su vez, se realizó un acondicionamiento osmótico. Las principales vías implicadas en estos cambios son las que están relacionadas al metabolismo de proteínas, estructura celular, metabolismo y defensa (Yacoubi *et al.*, 2011).

En guisantes (*Pisum sativum*) se ha considerado el estrés oxidativo y los antioxidantes enzimáticos en el proceso de envejecimiento en semillas y como se modulan durante el desarrollo de la planta. Se estudió la regulación transcripcional

durante las fases de pre y post-germinativas y en respuesta del envejecimiento (los genes estudiados fueron *PsAPX*, *PsSOD*, *PsGRcyt*, *PsGRcm* y *PsCAT*), De los cuales *PsAPX* y *PsSOD* eran predominantes, lo que sugirió que estos genes juegan un papel importante en el control de la homeostasis intracelular de ROS para promover la elongación celular, y el crecimiento temprano de las plántulas. El envejecimiento acelerado condujo a la reducción de viabilidad y crecimiento de las plántulas, y se asoció con cambios en la abundancia de proteínas específicas (Yao *et al.*, 2012).

Para la búsqueda de biomarcadores específicos para el vigor en semillas, se realizaron estudios en semillas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.), en las que se aplicó un pre acondicionamiento hídrico y un envejecimiento acelerado. Se sugiere que el vigor de las semillas se relaciona en rutas metabólicas implicadas en la movilización de lípidos y almidón, la síntesis de proteínas o el ciclo de metilo (Catusse *et al.*, 2011).

En todas estas investigaciones se trató de dilucidar como diversos factores afectan la viabilidad o el vigor de las semillas y a su vez que enzimas están siendo más afectadas y en que vías están implicadas; los cambios observados se relacionan comúnmente al metabolismo energético, a las proteínas de reserva o la movilización de reservas. Pero a pesar de esto es necesario profundizar en el conocimiento de este proceso.

Como se observa la mayoría de los estudios realizados son en especies agrícolas, de interés económico; sin embargo, en el plano de especies forestales de origen tropical son muy escasos. Es importante mencionar que las plantas tropicales representan 2/3 del total de número de plantas verdes del mundo (Balbuena *et al.*, 2011) por lo que sería prioritario avanzar en el estudio de este tipo de vegetación.

Los estudios que se han realizado en especies tropicales han sido realizados para detectar la mayor cantidad de proteínas con el fin de obtener perfiles de proteínas completos para así notar las variaciones que pudiesen presentarse en respuesta a patógenos o condiciones de estrés, dichos estudios ayudan a conocer la fisiología.

Debido a que algunas especies no solo son semillas tropicales si no también especies del tipo recalcitrante se complica su estudio proteómico debido a que al realizar los procesos de extracción de proteínas presentan muchos compuestos que interfieren; a su vez, no se han secuenciado los genomas de la mayoría de estas especies lo cual dificulta su identificación y por tanto su estudio (Balbuena *et al.*, 2011).

Hasta la fecha no se tiene un perfil proteómico del cedro rojo en una condición basal y debido a la escasa información acerca de la secuencia del cedro rojo, y de la mayoría de las especies forestales, no se tiene bases de datos que apoyen al estudio de los procesos de envejecimiento.

## **Planteamiento del problema**

*C. odorata* es una especie de gran importancia para la industria forestal en las regiones tropicales de México y latinoamérica. Debido a la sobreexplotación de sus poblaciones naturales, actualmente se ha catalogado como una especie sujeta a protección especial por el gobierno mexicano. Una estrategia para su conservación *ex situ*, consiste en el almacenamiento de sus semilla, sin embargo, las semillas de *C. odorata* presentan una reducida longevidad que por lo regular no excede los 2 años, lo cual dificulta su establecimiento en los bancos de germoplasma. Aunado a lo anterior, existe un desconocimiento de los procesos fisiológicos y moleculares asociados a la pérdida de viabilidad, que permitan plantear estrategias de conservación a mediano y largo plazos adecuados a las necesidades de la especie.

## **Justificación**

El envejecimiento es un proceso irreversible que resulta en la pérdida de vigor y viabilidad de las semillas. Depende del potencial genético y fisiológico de las semillas, así como de las condiciones ambientales a las cuales son expuestas durante el almacenamiento. En general se desconocen cuáles son los mecanismos fisiológicos y moleculares responsables del deterioro de las semillas de cedro rojo. Analizar los cambios en los perfiles de expresión de las proteínas que ocurren como resultado del envejecimiento, mediante un enfoque proteómico, puede proporcionar información respecto a las vías metabólicas necesarias para mantener el vigor de las semillas y de los eventos que conducen al envejecimiento. Asimismo, a través de ellos es posible identificar potenciales marcadores moleculares que contribuirán al establecimiento de estrategias para la conservación de las semillas de esta especie.



## **Hipótesis**

El envejecimiento acelerado en semillas de *C. odorata* inducirá un cambio en el patrón de expresión de proteínas, el cual será posible detectar mediante un análisis proteómico. Dichos cambios permitirán identificar posibles marcadores moleculares asociados a la longevidad de las semillas.

## **Objetivos**

### Objetivo general

Analizar la expresión de proteínas en semillas de *C. odorata* durante el envejecimiento acelerado, que permitan detectar posibles marcadores moleculares que estén asociado al proceso de envejecimiento.

### Objetivos particulares

- Establecer las condiciones para realizar el envejecimiento acelerado de semillas de *C. odorata*.
- Comparar los cambios en la expresión de proteínas de semillas de *C. odorata* en condiciones de envejecimiento acelerado, a través de un software especializado.
- Identificación por espectrometría de masas de las proteínas que se expresan diferencialmente durante el proceso de envejecimiento.

## 2. Material y métodos

### 2.1 Reactivos

Los reactivos usados de la marca Sigma-Aldrich fueron: Trizma® Base ((hidroximetil) aminometano), cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio, Triton X-100, DTT (DL-ditiotreitol), EDTA (ácido etildiaminotetraacético), sacarosa, vanadato de sodio, fluoruro de sodio, glicerofosfato di sódico,  $\beta$ -mercaptoetanol, SDS (dodecilsulfato sódico), TEMED (tetrametiletildiamina), glicina, iodoacetamida y tripsina. Los reactivos usados de la marca J.T.Baker® fueron: fenol, cloruro de litio, urea, CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato), acetato de amonio, etanol, metanol, acetona, acrilamida, glicerina, azul de bromofenol y azul brillante G250. De BioRad: tiras de IPG, reactivo de Bradford y albúmina de suero bovino (BSA). Se utilizó también tiourea (Tecnica Química), APS (persulfato de amonio) (AMRESCO), agarosa (IBI) y cloruro de trifenil tetrazolio (Merk).

### 2.2 Material biológico

Para todos los experimentos se utilizó un lote de semillas de *C. odorata* identificado como AA 549/4 (genotipo 50), colectado en el 2012. La semilla provino del huerto semillero de *C. odorata* localizado en la ex pista de aterrizaje del Campo Experimental “El Palmar” INIFAP (18° 32' L. N., 96° 47' L. W.; 180 msnm), en Tezonapa, Veracruz. El clima de la región es cálido-húmedo con lluvias en verano, una precipitación media de 2888 mm anuales, y temperaturas medias que fluctúan de 16 a 36°C en el año (Sánchez *et. al.*, 2003). Después de la colecta, las semillas se mantuvieron en refrigeración (entre 4 –7°C) hasta su uso.

### 2.3 Envejecimiento acelerado.

Se utilizó aproximadamente 1 g de semillas por replica y 40 semillas para las pruebas de germinación. Para establecer las condiciones de envejecimiento se

prepararon soluciones de cloruro de litio (LiCl) al 4 y al 23.5% (P/V); la primera para obtener un 95% de humedad relativa, y la segunda para obtener un 75% de humedad relativa (Gold y Hay, 2003). Para ambas condiciones se vertieron 200 mL de solución de LiCl en frascos de vidrio de 1 L, el cual se cerró herméticamente y se colocó en la incubadora bacteriológica (Blue M) a  $42^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche hasta conseguir equilibrar el frasco a la temperatura y humedad requerida, lo cual se monitoreó con un higrómetro (CEM, DT-172). Una vez alcanzadas las condiciones, se colocaron las semillas al interior del recipiente, de tal forma que estuvieran dispersas y sin amontonarse, sobre un soporte el cual las mantenía a una distancia de 2 cm sobre el nivel del líquido. Se cerró herméticamente y se incubó en las mismas condiciones. Se realizó un muestreo cada 24 horas durante 10 días consecutivos. El material obtenido se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización, a excepción del utilizado para las pruebas de germinación. Con dicho material se realizaron todos los ensayos posteriores.

#### 2.4 Prueba de germinación.

Este ensayo se realizó con cuatro réplicas de 10 semillas cada una, tomando en cuenta las recomendaciones generales de ISTA (2011) para otras especies forestales. Se usó el método del papel enrollado, para lo cual se colocaron ordenadamente las semillas en un papel filtro con agua destilada a saturación, se enrollaron y cada rollo se colocó verticalmente en un frasco de vidrio con agua. Los frascos con los cuatro rollos se metieron en bolsa de polietileno y se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  en obscuridad. Se monitorearon diariamente durante 30 días para obtener el promedio de los porcentajes de germinación (%G) de cada día de muestreo, los días al pico de cada tiempo, y con esto calcular el %G50. Datos necesarios para establecer las condiciones a analizar. Se determinó el %G50 como sugiere el Royal Botanic Garden (KEW:<http://data.key.org/sid/viability/convert.jsp>).

## 2.5 Extracción de las proteínas totales.

Se siguió el protocolo modificado de Agrawal y Thelen (2009). Los extractos de proteínas totales se prepararon a partir de: 1) control o T0: semillas almacenadas y refrigeradas, con un 90% de germinación; 2) envejecidas aceleradamente durante 6.2 y 10 días. De cada muestra se maceró aproximadamente 1 g de semillas usando mortero y pistilo enfriado con nitrógeno líquido. Se mezcló el macerado con 500  $\mu$ L de IEF (8 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 2% Tritón X-100, 50 mM DTT y cóctel inhibidor de proteasa Complete mini® (Roche Diagnostics); las mezclas se colocaron en hielo y vortexearon por lapsos de 30 segundos durante 3 minutos. Después se le agregó 7.5 mL de amortiguador de extracción (100 mM TRIS-HCl pH 8.8, 10 mM EDTA pH 8.5, 900 mM sacarosa, 0.8%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.5 mM vanadato de sodio, 5 mM fluoruro de sodio y 15 mM glicerofosfato di sódica) y 7.5 mL de Fenol pH 8.8. Se centrifugó a 8243g a 4°C por 60 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se le adicionaron 25 mL de 100 mM acetato de amonio/metanol frío. Para favorecer la precipitación de proteínas se dejó toda la noche a -20°C.

Pasado este tiempo se centrifugó a 8243g a 4°C por 60 minutos. El botón resultante se sometió al siguiente tren de lavado: 1 lavado con 100 mM acetato de amonio/metanol, 2 lavados con acetona al 80% y 2 lavados con etanol al 70%. Todos los lavados se realizaron en frío con 5 mL de cada solución y entre cada uno, el botón se resuspendió en su totalidad y luego centrifugó a 6311g a 4°C por 10 minutos. Una vez terminados los lavados, se dejó evaporar el etanol residual (15 min boca arriba y 15 min boca abajo), el botón se resuspendió en 450  $\mu$ L de amortiguador de IEF (urea 8 M; tiourea 2 M; CHAPS 4%; tritón X-100 2% y DTT 50 mM). Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos. Se tomó el sobrenadante (con cuidado de no tomar restos del material precipitado), ya que este corresponde al extracto de proteína total. La concentración se midió según el método de Bradford (Bradford, 1976) con suero de albúmina bovino (BSA) como estándar.

## 2.6 Electroforesis dimensional.

La electroforesis unidimensional (1D) nos permitió la separación de proteínas por peso molecular y observar un panorama general, se llevó a cabo cargando 1 y 2  $\mu\text{L}$  de la muestra, más 6  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga 6X, en un gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 12%; el corrimiento electroforético se llevó a cabo en una cámara Mini-PROTEAN II (BIO-RAD®). La electroforesis se programó a 100 V durante 150 minutos. Los geles se tiñeron con Coomassie coloidal durante toda la noche y se destiñeron con agua destilada hasta obtener un fondo claro.

## 2.7 Electroforesis bidimensional.

La electroforesis bidimensional (2D) permitió la separación de proteínas tanto por peso molecular como por punto isoeléctrico; se llevó a cabo utilizando 600  $\mu\text{g}$  de proteína total del extracto de cada muestra. Las proteínas de los diferentes extractos se separaron usando tiras de gel con un gradiente de pH inmovilizado lineal de 3 a 10 (IPG Strip pH 3-10 G, 11 cm; BIORAD®). El corrimiento de la primera dimensión se realizó rehidratando las tiras durante 12 horas a 20°C con el Buffer de IEF, anfollinas y los extractos de proteínas, en la celda Protean IEF (BioRad®), con el Programa de Biorad para tiras de 11 cm, 3-10G. Posteriormente, se separaron las proteínas por peso molecular en un gel SDS-PAGE (acrilamida-bisacrilamida 29:1) al 12%. Antes de realizar la segunda dimensión, las tiras de gel se equilibraron dos veces durante 15 minutos; primeramente con una solución reductora con amortiguador de equilibrio SDS (50 mM TRIS-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glicerol, 4 % SDS) y DTT al 2%; la segunda solución fue de alquilación con amortiguador de equilibrio SDS y Iodoacetamida al 2.5%. Una vez equilibradas las tiras se colocaron en la parte superior de los geles, sellados con una solución de agarosa con amortiguador de carga 6X. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente utilizando el amortiguador de corrida a 65 V durante 20 horas y posteriormente a 100 V por aproximadamente 4 horas. Por cada tratamiento, los geles se hicieron por cuadruplicado.

Los geles para teñirse se colocaron en recipientes con Coomassie coloidal G-250 hasta ser cubiertos en su totalidad, durante 24 horas en agitación moderada. Transcurrido este tiempo se destiñeron con agua destilada, hasta obtener un fondo claro, para su posterior digitalización.

## 2.8 Captura y análisis de imágenes.

Las imágenes de los geles 2D se digitalizaron empleando un escáner HP modelo Color Laser Jet CM2320n MFP, a una resolución de 600 ppp en escala de grises de 16 bits en formato TIFF. Posteriormente se analizaron con el programa Ludesi REDFIN 3 software.

El análisis consistió en registrar las manchas correspondientes en las imágenes del gel, con base en las características o patrones que se observaron en la imagen. Con esta información, las imágenes se alinearon y se transformaron geométricamente para lograr la superposición de las manchas. Ludesi REDFIN utiliza un enfoque semiautomático, por lo cual el usuario indica las manchas correspondientes en las distintas imágenes. La detección de manchas implica el uso de algoritmos para distinguir proteínas reales de los artefactos ocasionados por la técnica, y la sensibilidad del algoritmo de detección se ajusta para trabajar bien con las imágenes específicas.

Para la cuantificación se midió la intensidad de la tinción acumulativa contenida dentro de cada mancha que a su vez, corresponde con el volumen relativo de proteína. Esto implica el cálculo del nivel de fondo local alrededor de una mancha, lo cual se resta del valor detectado de la mancha definida. Con estos resultados se consideraron aquellas manchas que se presentaron en 3 de cada 4 geles, y se tomó como resultado el promedio del volumen para las comparaciones. El software analiza las diferencias significativas entre manchas entre los geles de las distintas condiciones mediante métodos estadísticos (ANOVA) (Ludesi, <http://www.ludesi.com>). En aquellas manchas que presentaron diferencias significativas se realizó una prueba post hoc (Tukey).

## 2.9 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas permitió identificar las proteínas de las manchas seleccionadas de los geles de acrilamida, las cuales se extrajeron de manera manual. Estas fueron enviadas para su secuenciación al Pediatrics Proteomics and Mass Spectrometry Facility de East Tennessee State University.

Cada muestra por separado se cortó en fragmentos pequeños, los cuales se destiñeron con bicarbonato de amonio (4 mg/mL) y acetonitrilo (1:1) por un mínimo de 30 min. El procedimiento se repitió dos veces. Posteriormente se lavaron con agua destilada. Las muestras se redujeron en 500 mM DTT durante 10 minutos a 60°C y se alquilaron con iodoacetamida 30 mM durante 2 horas. Posteriormente se lavaron 3 veces con 100 mM de bicarbonato de amonio. Se deshidrataron completamente con 100% de acetonitrilo y se llevaron a sequedad total. La digestión en gel fue llevada a cabo con 200 µL de tripsina de porcino (1 µg/ µL) y se incubaron por 18 horas a 37°C. Los péptidos se extrajeron con ácido fórmico/acetonitrilo/agua (5:50:45, v/v/v) durante 10 min y se llevaron a sequedad total. Posteriormente, se resuspendieron en ácido fórmico al 0.1% (v/v), se desalaron en columnas Ziptip C18 (ZipTipU-C18, Millipore Corp., Billerica, MA), se secaron y rehidrataron en 6 µL de ácido fórmico/acetonitrilo/agua (0.1:20:79.9, v/v/v). Se inyectó un volumen de 2 µL a una columna C18 picofrit (New Objective, Inc., Woburn, MA, USA). La columna primero se equilibró con el solvente A (ácido fórmico/acetonitrilo (98:2, v/v)) y la elusión se realizó con un gradiente de 2-40% de solvente B ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo a lo largo de 60 min a un flujo de 200 nL/min.

El análisis de péptidos se realizó mediante un sistema nanospray- LC/MS/MS integrado a un LTQ XL (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Las proteínas se identificaron de cada raw data file utilizando Thermo Proteome Discoverer 1.2 (Thermo Fisher) con un umbral de señal-ruido de 1.5, tolerancia de precursor de masa de 1400 mmu y tolerancia de masa de fragmento de 0.8 Da. Se

consideraron únicamente las identificaciones que tuvieran un coeficiente alto o medio. La base de datos utilizada para las búsquedas se obtuvieron a partir de la base de datos de secuencias de proteínas del NCBI y luego realizando una subserie de 1GB que contenía cualquiera de las siguientes palabras: *Arabidopsis*, *Hacer*, *Beta vulgaris*, *Brassica*, *Castanea*, *Citrus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Eucalyptus*, *Fraxinus*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Hordeum*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Vitis*, *Oryza*, *Phaseolus*, *Picea*, *Pinus*, *Pisum*, *Populus*, *Prunus*, *Pseudotsuga*, *Quercus*, *Solanum*, *Sorghum*, *Triticum*, *Theobroma*, *Zea*, *Fagaceae*, ash, soy, cotton, sunflower, barley, rice, bean, pea, Douglas-fir, castor bean, Solanaceae, wheat, maize, fungi.



### 3. Resultados

Para el estudio se seleccionó un solo lote de semillas que tuviera un porcentaje de germinación (G) mayor o igual a 90% y un tiempo de germinación homogéneo; con pocos días al pico (dicho término se refiere al día en que hay más semillas germinadas por réplica) y que contara con una cantidad suficiente que permitiera la realización de todos los ensayos. La prueba de germinación se realizó con cuatro réplicas de 25 semillas cada una. El lote que cumplió con dichas características fue el identificado como genotipo 50 (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de germinación y días al pico del genotipo 50. Los datos son promedios de cuatro replicas con 25 semillas cada una.

| Prueba inicial de germinación |         |              |
|-------------------------------|---------|--------------|
| Replicas                      | % de G  | Días al pico |
| A                             | 96      | 4            |
| B                             | 88      | 4            |
| C                             | 88      | 5            |
| D                             | 92      | 5            |
| Promedio                      | 91 ±3.8 | 4.5 ± 0.5    |

#### 3.1 Envejecimiento acelerado.

Inicialmente, se realizó la incubación a  $42^{\circ}\text{C} \pm 1$  y 95% de humedad relativa (HR). Se tomaron muestras de semillas para las prueba de germinación diariamente durante 10 días. Utilizando estas condiciones se presentaron problemas de contaminación por hongos a partir del tercer día. Para evitar que esta contaminación afectara la prueba de germinación, las semillas fueron sometidas a una limpieza antes de la siembra con Captan (0.5 g/L) durante 10 minutos. Sin embargo, a pesar de estas medidas, el muestreo número T9 fue omitido debido a la contaminación masiva por hongos que no pudo ser eliminada con el lavado.

Debido a la alta contaminación, la segunda prueba consistió en modificar únicamente la humedad relativa (de 95% a 75%). También se aumentó un día más al monitoreo para corroborar que a estas condiciones se obtendría una disminución de la germinación a menos del 20%. Con la disminución de humedad relativa en las condiciones de envejecimiento se evitó totalmente la aparición de hongos o cualquier otro microorganismo en las semillas.

Por otra parte, a 95% HR el proceso de envejecimiento provocó una disminución ligeramente más rápida a diferencia de la incubación a 75% HR; pero a pesar de esto la germinación se ve disminuida paulatinamente en ambos casos y prácticamente a partir del noveno día fue similar para ambos tratamientos (Tabla 2 y Figura 5). Por otra parte, a 95% HR aumentaron ligeramente los días al pico, aunque esto pudo deberse a la contaminación por hongos masiva que se presentó en los días finales del tratamiento. Respecto a la condición de 75% HR se observó un comportamiento más homogéneo, aunque en general no se obtuvo un efecto notorio sobre los días de germinación máxima (Figura 6). Debido a todas estas observaciones y a la repetitividad de los datos, se consideró que la condición de  $42^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  y 75% HR era la más propicia para los análisis requeridos en este trabajo.

Tabla 2. Promedio del porcentaje de germinación de las semillas sometidas a envejecimiento acelerado a 42°C y 95% HR y 42°C y 75% HR. Para las pruebas de germinación se utilizaron 40 semillas por cada día de muestreo, en 4 réplicas de 10 semillas cada una.

| Envejecimiento acelerado en semillas de <i>C. odorata</i> |              |              |              |              |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Condiciones de envejecimiento                             | 42°C, 95 %HR |              | 42°C, 75 %HR |              |
| Días de envejecimiento                                    | %G           | Días al pico | %G           | Días al pico |
| Control   | 87.5 ±5.0    | 5.5 ±0.6     | 91.3 ±8.8    | 4.8 ±0.4     |
| 1   | 97.5 ±5.0    | 4.0 ±0.0     | 87.5 ±3.5    | 5.6 ±1.9     |
| 2   | 77.5 ±12.6   | 9.0 ±2.4     | 87.5 ±0.0    | 5.9 ±1.2     |
| 3   | 80 ±21.6     | 5.0 ±1.3     | 83.75 ±1.8   | 4.5 ±0.4     |
| 4   | 47.5 ±22.2   | 4.8 ±0.5     | 80.0 ±0.0    | 6.0 ±2.8     |
| 5   | 75 ±5.8      | 5.5 ±2.4     | 81.3 ±5.3    | 6.5 ±0.7     |
| 6   | 35 ±12.9     | 5.0 ±1.4     | 45.0 ±14.1   | 7.5 ±2.1     |
| 7   | 17.5 ±17.1   | 3.0 ±2.2     | 32.5 ±24.7   | 7.0 ±0.4     |
| 8   | 28.05 ±22.2  | 4.3 ±2.9     | 43.2 ±7.3    | 8.1 ±1.6     |
| 9   | -            | -            | 11.6 ±16.3   | 4.3 ±6.0     |
| 10  | 0 ±0.0       | 0.0 ±0.0     | 22.2 ±0.0    | 6.8 ±1.9     |
| 11  | -            | -            | 0.0 ±0.0     | 0.0 ±0.0     |

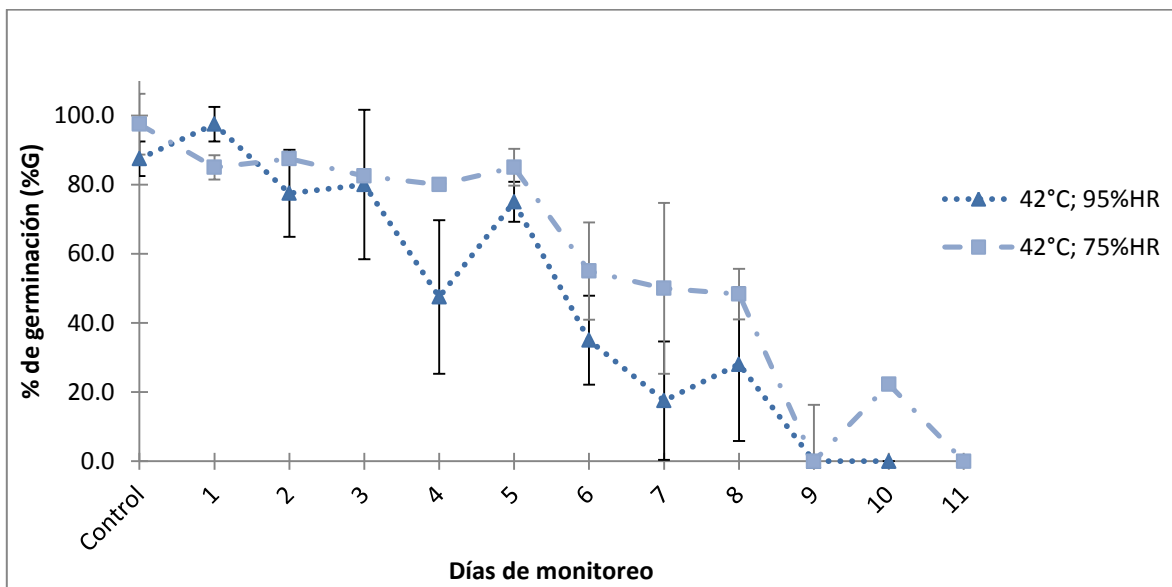


Figura 5. Porcentaje de germinación diaria de los muestreos realizados para determinar las condiciones de envejecimiento acelerado. Para este ensayo se utilizaron 40 semillas por muestreo divididas en 4 réplicas de 10 semillas cada una las barras en cada punto indican la desviación estándar de cada réplica.

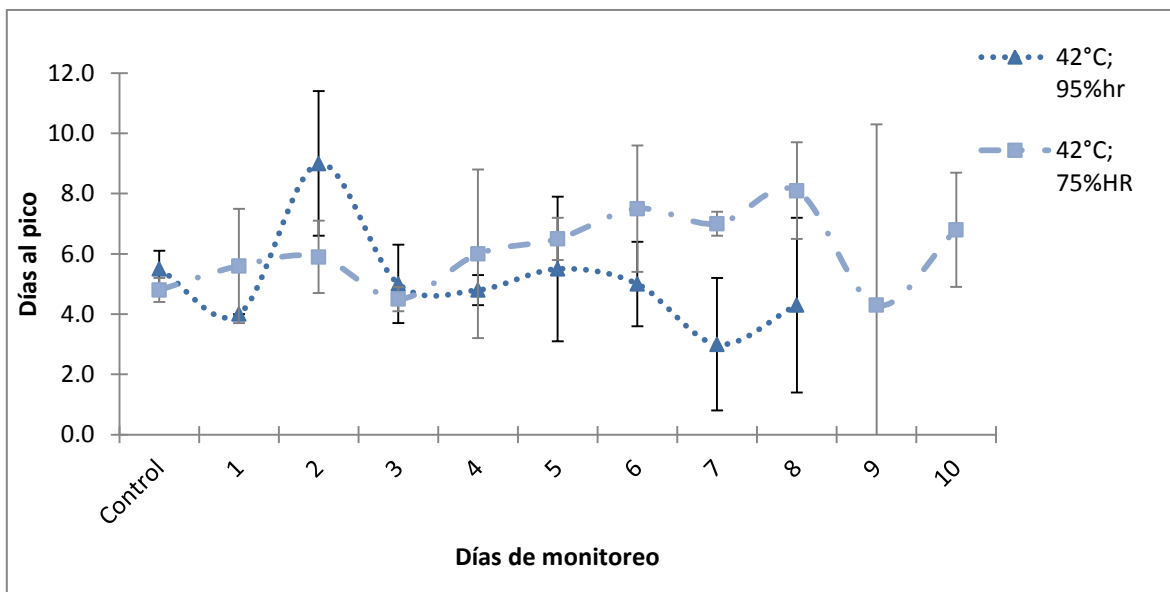


Figura 6. Días al pico de cada uno de los tratamientos (T) realizados para determinar las condiciones de envejecimiento acelerado. Para este ensayo se utilizaron 40 semillas por muestreo divididas en 4 réplicas de 10 semillas cada una, las barras en cada punto indican la desviación estándar de las réplicas.

### 3.2 Determinación del G50.

Para calcular el tiempo en el cual la germinación se reducía al 50% (G50), se transformaron los porcentajes de germinación en valores PROBIT (Anexo I) y se interpoló el PROBIT 5.0 (lo que es el G50). Se obtuvo que al tiempo de muestreo de 6.2 días (T6.2). Asimismo, se estimó que se requerían diez días de tratamiento (T10) para inducir la pérdida de la capacidad germinativa de la semilla a menos del 20%.

Con estos datos se determinaron las condiciones más adecuadas para realizar los análisis proteómicos: 1) El porcentaje de germinación medio, G50 o T6.2, el tiempo de envejecimiento que debe transcurrir para que el 50% de la población pierda su viabilidad, aunque en aquellas semillas que aún germinan los días al pico no se modificaron respecto a los del control. 2) Porcentaje de germinación

menor a 20% correspondiente al T10, en la cual se las semillas han perdido prácticamente su capacidad germinativa, sus días al pico se ven ligeramente aumentados respecto control, aunque el aumento no es significativo debido a la gran variabilidad observada.

### 3.3 Prueba del Tetrazolio.

Además de la prueba de germinación para determinar la viabilidad de las semillas, se usó una prueba fisiológica para conocer el estado del tejido sometido a envejecimiento, considerando a las semillas en las condiciones establecidas (T6.2 y T10) para el análisis. Entre las pruebas que sugiere el ISTA (2011), la prueba bioquímica del tetrazolio determina de manera rápida la viabilidad. Consiste en reacciones que inician cuando se agregan sales de tetrazolio, las cuales por la actividad de enzimas deshidrogenasas, presentes en tejido vivo, dan lugar a la formación de formazan, un compuesto que tiñe de rojo, diferenciando así el tejido vivo del muerto (que no presenta tinción) (Moreno, 1984). Se realizó dicha prueba para correlacionar los datos referentes a la viabilidad de estas, y ver el progreso de la pérdida de viabilidad (Anexo II).




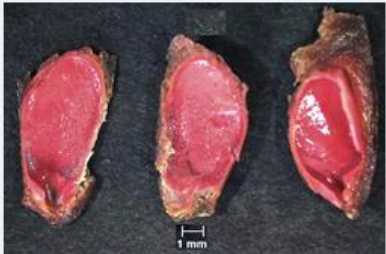


| Prueba del tetrazolio           |  |  |  |
|---------------------------------|--|--|--|
| Muestra                         | Control (T0)   | T6.2   | T10  |
| Semillas totales                | 10   | 40   | 40   |
| Cotiledones abiertos            | 10   | 23   | 29   |
| Cotiledones rotos               | 0  | 14   | 10   |
| %Germinación                    | 90.0 ±12.8   | 64.2 ±21.8   | 17.1 ±10.0   |
| Tinción embriones y cotiledones |   |   |   |
| Tinción cubierta                |  |  |  |

Figura 7. Pruebas del tetrazolio en las tres condiciones de estudio.

Durante la realización de esta prueba se observó que la mayoría de los cotiledones al ser extraídos de su cubierta reaccionan con la luz, abriéndose en igual proporción en cada condición. En cuanto a la tinción en las tres condiciones las semillas presentan una tonalidad roja en más de un tercio de la semilla; sin embargo, en las semillas de los tratamientos T6.2 y T10, la tinción no es uniforme ya que presentan zonas más coloreadas que otras. Esto sugiere que bajo condiciones de envejecimiento acelerado, al alcanzar la G50 y en valores por debajo de ella, la mayoría de las células del embrión y tejidos de reserva mantienen su viabilidad, aun si ya no son capaces llevar un proceso exitoso de germinación.

### 3.4 Análisis de proteínas.

Considerando estas condiciones, se buscó comparar los cambios en el patrón de expresión de proteínas que ocurren durante el envejecimiento. Se compararon las semillas con alto porcentaje de germinación (control), con las semillas envejecidas aceleradamente (T6.2 y T10). Se consideraron dos patrones generales: a) proteínas que aparecen o desaparecen conforme progresa el envejecimiento y b) proteínas cuya expresión varía como consecuencia del envejecimiento.

Tabla 3. Porcentaje de germinación y días al pico de semillas envejecidas artificialmente. Se usaron 80 semillas con 8 réplicas de 10 semillas cada una. Se indican promedios y desviaciones estándar.

| <b>Envejecimiento acelerado<br/>(42°C; 75% HR).</b> |            |              |
|---|------------|--------------|
| Días de envejecimiento                              | %G         | Días al pico |
| Control   | 90.0 ±12.8 | 6.1 ±1.1     |
| T 6.2   | 64.2 ±21.8 | 6.1 ±1.7     |
| T 10  | 17.1 ±10.0 | 6.3 ±2.9     |

Para iniciar el análisis proteómico se realizó una electroforesis unidimensional que permitiera conocer aquellas regiones donde se observará una abundancia de proteínas y si el patrón mostraba cambios distinguibles a este nivel.

Posteriormente, de estas muestras se realizó el análisis en 2 D. Se encontró que las proteínas más abundantes se localizan por debajo de los 36 kDa.

### 3.4.1 Electroforesis unidimensional

El gel de una dimensión (1D) mostro patrones de bandeo similares en todas las condiciones. Las principales bandas presentes en eran de aproximadamente 50, 36, 34, 33, 27, 20 y 16 KDa, fue posible notar que hay un ligero aumento en las bandas 33 y 27 KDa a medida que progresa el envejecimiento; mientras que en la banda de 16 KDa es inverso ya que en el control se ve ligeramente aumentada en comparación con las condiciones de envejecimiento. En general las proteínas más abundantes se detectaron a los 34, 27 y 16 KDa (Figura 8).

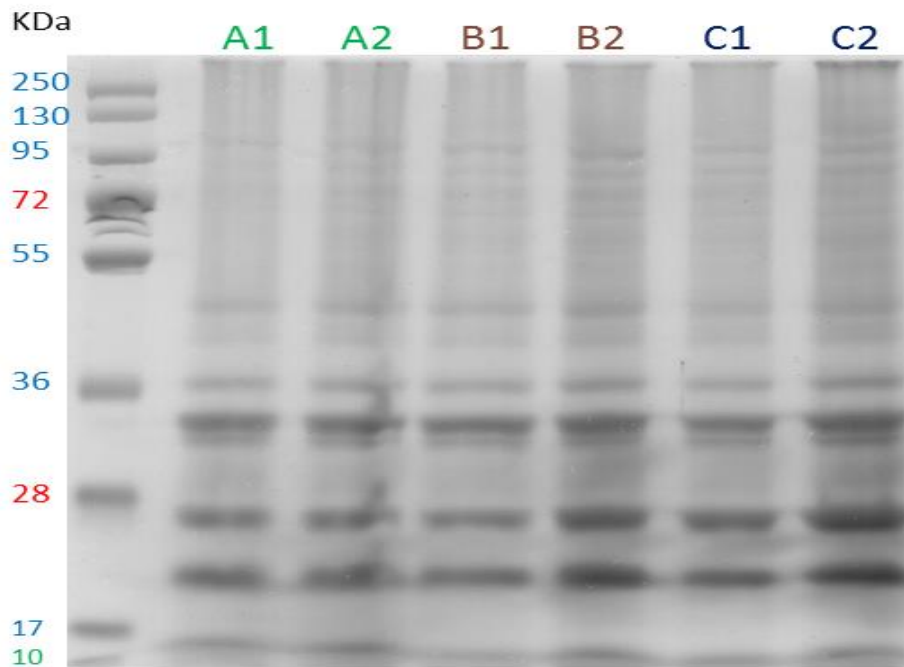


Figura 8. Separación de proteínas en gel de 12.5% SDS 1D. Se colocó en cada pozo la muestra un volumen de 1  $\mu$ L seguido de 2  $\mu$ L (Aproximadamente 15  $\mu$ g/  $\mu$ L) de la misma muestra; en el primer carril el marcador de PM; en los posteriores dos el extracto de la condición control (A, color verde), seguido del T6.2 (B, color café) y finalizó con el T10 (C, color azul).



### 3.4.2 Electroforesis bidimensional

En los geles bidimensionales (2D) se observó que los patrones de expresión en todas las condiciones son similares, oscilan entre un pI de 5 a 10, mientras que, por peso molecular pueden dividirse en dos secciones: la primera abarca las proteínas de alto peso entre 130 KDa y 40KDa, las cuales son poco abundantes y por tanto de difícil visualización; y la segunda abarca aquellas menores a 40 KDa, donde se ubican las bandas de proteínas más abundantes. Cabe destacar que en este segundo conjunto es donde se detectan la mayoría de las proteínas y cambios de expresión que fueron posibles de detectar.

El análisis de las proteínas se realizó con Ludesi REDFIN 3 software, el cual tomó en cuenta el volumen abarcado por cada mancha, y se promedió entre las réplicas de su respectiva condición; con este dato se compararon los cambios en la expresión de cada mancha entre las diferentes condición de estudio (Anexo III). A cada mancha identificada, el programa le asignó un número. En cuanto a la cantidad de manchas presentes en cada condición, el T6.2 es el que presenta un ligero aumento en la cantidad de manchas detectadas (77 manchas).

Tabla 4. Promedios del total de manchas detectadas por el software Ludesi-REDFIN para análisis de geles de 2 dimensiones (2D).

| Días de envejecimiento | Número de geles analizados | Número de manchas identificadas |
|------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Control                | 4                          | 64                              |
| T6.2                   | 4                          | 77                              |
| T10                    | 4                          | 67                              |

Se analizaron estadísticamente un total de 130 manchas pertenecientes a las tres condiciones. De este análisis sólo se consideraron aquellas que estuvieran representadas en al menos tres de las cuatro réplicas; en los casos donde hubo una aparición (y no se encuentra presente en alguna de las otras dos condiciones) se tomó en cuenta si se presentaba en al menos dos réplicas. Para

todos los casos se calculó el volumen de cada mancha y se promedió entre el número de réplicas de esta mancha para cada condición. En el caso de manchas que se encontraron en una sola réplica el valor se consideró como una ausencia. Únicamente 77 manchas cumplieron estos criterios y se tomaron en cuenta para el resto del análisis (Anexo IV).

Tabla 5. Densidades promedio calculadas por el software Ludesi REDFIN de las 15 proteínas con cambios significativos en los niveles de expresión ANOVA ( $p=0.05$ ). Las manchas sombreadas de verde son aquellas que son únicas para el control; mientras que las sombreadas de color café son las únicas en la condición T6.2.

| Id  | g.l. | F    | ANOVA  | Control             | T6.2                | T10                 |
|-----|------|------|--------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 8   | 2, 9 | 6.7  | 0.0165 | 0.00 ± 0.00         | 3525.74 ± 2061.83   | 3924.23 ± 2022.82   |
| 83  | 2, 9 | 4.5  | 0.0438 | 0.00 ± 0.00         | 2434.97 ± 297.95    | 1825.58 ± 198.74    |
| 111 | 2, 9 | 4.3  | 0.0491 | 10253.03 ± 5509.78  | 9172.76 ± 1795.53   | 16035.96 ± 2119.50  |
| 117 | 2, 9 | 5.1  | 0.0324 | 25686.99 ± 9555.64  | 15809.11 ± 6350.27  | 10508.29 ± 2625.11  |
| 118 | 2, 8 | 14.3 | 0.0061 | 0.00 ± 0.00         | 1883.92 ± 372.44    | 2687.76 ± 1144.67   |
| 129 | 2, 9 | 5.6  | 0.0425 | 15248.09 ± 7154.91  | 0.00 ± 0.00         | 16677.49 ± 9916.17  |
| 135 | 2, 9 | 4.6  | 0.042  | 70271.83 ± 20074.95 | 33474.15 ± 15431.91 | 45745.86 ± 16549.82 |
| 137 | 2, 9 | 9.6  | 0.0059 | 16943.54 ± 6267.66  | 4687.94 ± 4051.30   | 5516.53 ± 4950.17   |
| 141 | 2, 9 | 5.7  | 0.0246 | 8583.47 ± 4999.50   | 0.00 ± 0.00         | 5884.46 ± 2684.05   |
| 43  | 2, 9 | 5.9  | 0.233  | 5341.75 ± 4409.74   | 0.00 ± 0.00         | 0.00 ± 0.00         |
| 146 | 2, 9 | 4.5  | 0.0448 | 7885.15 ± 4859.79   | 0.00 ± 0.00         | 0.00 ± 0.00         |
| 21  | 2, 9 | 6.2  | 0.02   | 0.00 ± 0.00         | 694.41 ± 283.92     | 0.00 ± 0.00         |
| 81  | 2, 9 | 46.5 | 0.0108 | 0.00 ± 0.00         | 2023.13 ± 593.33    | 0.00 ± 0.00         |
| 89  | 2, 9 | 4.4  | 0.0458 | 0.00 ± 0.00         | 5700.81 ± 3546.76   | 0.00 ± 0.00         |
| 155 | 2, 9 | 7.7  | 0.0113 | 0.00 ± 0.00         | 1472.41 ± 374.34    | 0.00 ± 0.00         |

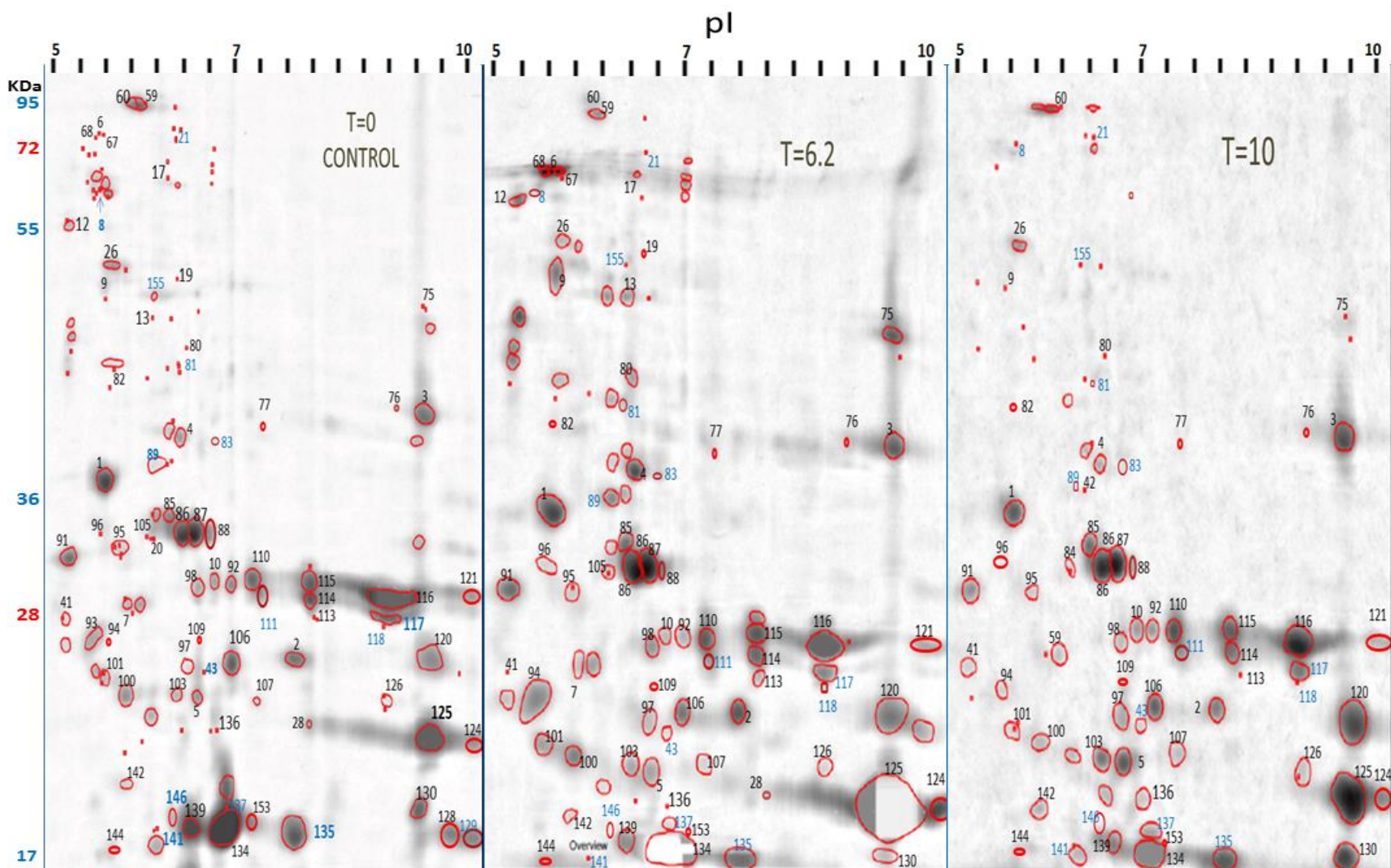


Figura 9. Numeración de las manchas en los geles analizados en las condiciones (Tabla 6). Las manchas con números de color azul, son aquellas que fueron secuenciadas.

En resumen, de las 77 manchas detectadas, 54 se compartieron entre las tres condiciones; cuatro se comparten únicamente entre T0 y T6.2; nueve sólo entre T6.2 y T10 y tres se comparten únicamente entre T0 y T10. Del resto de las proteínas, dos se presentan únicamente en la condición control o T0 y cinco en la condición T6.2 (Figura 10). Por lo que hay siete proteínas que pueden estar muy relacionadas en la pérdida de viabilidad de la semilla.

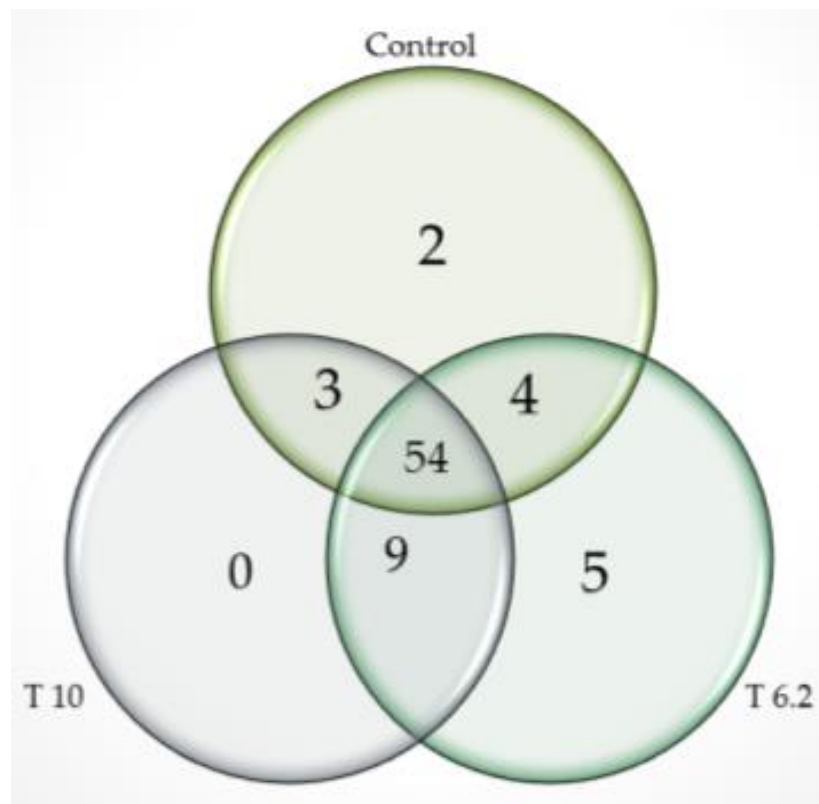


Figura 10. Diagrama de Venn de la expresión de las proteínas analizadas por el software Ludesi-REDFIN en las tres condiciones de estudio. Se analizaron un total de 77 manchas.

De esta selección, se obtuvieron 15 manchas con cambios estadísticamente significativos ( $p=0.05$ ). Se les realizó una prueba *post hoc* (Tukey HSD o LSD) con la finalidad de establecer entre cuáles de las condiciones se presentaron diferencias (Figuras 11 y 12).

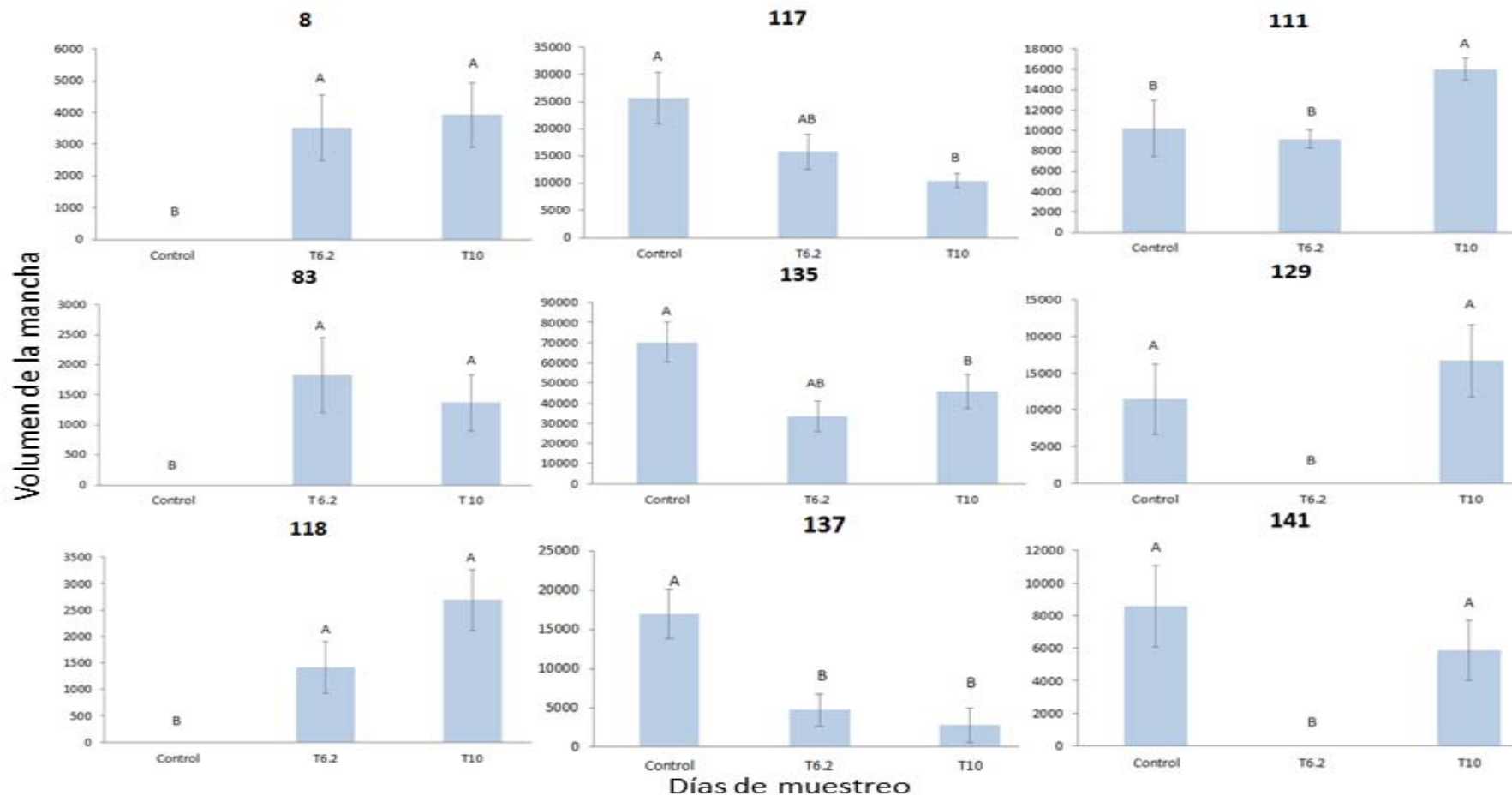


Figura 11. Análisis estadístico (Prueba de Tukey o LSD) para comparar las diferencias entre los tratamientos realizados de las proteínas que son estadísticamente significativas. El número superior de cada gráfica es el número de identificación de la mancha. La primera columna es de aquellas proteínas que aparecen como resultado del envejecimiento; la segunda aquellas que disminuyen, mientras que la tercera representa proteínas de expresión variable.

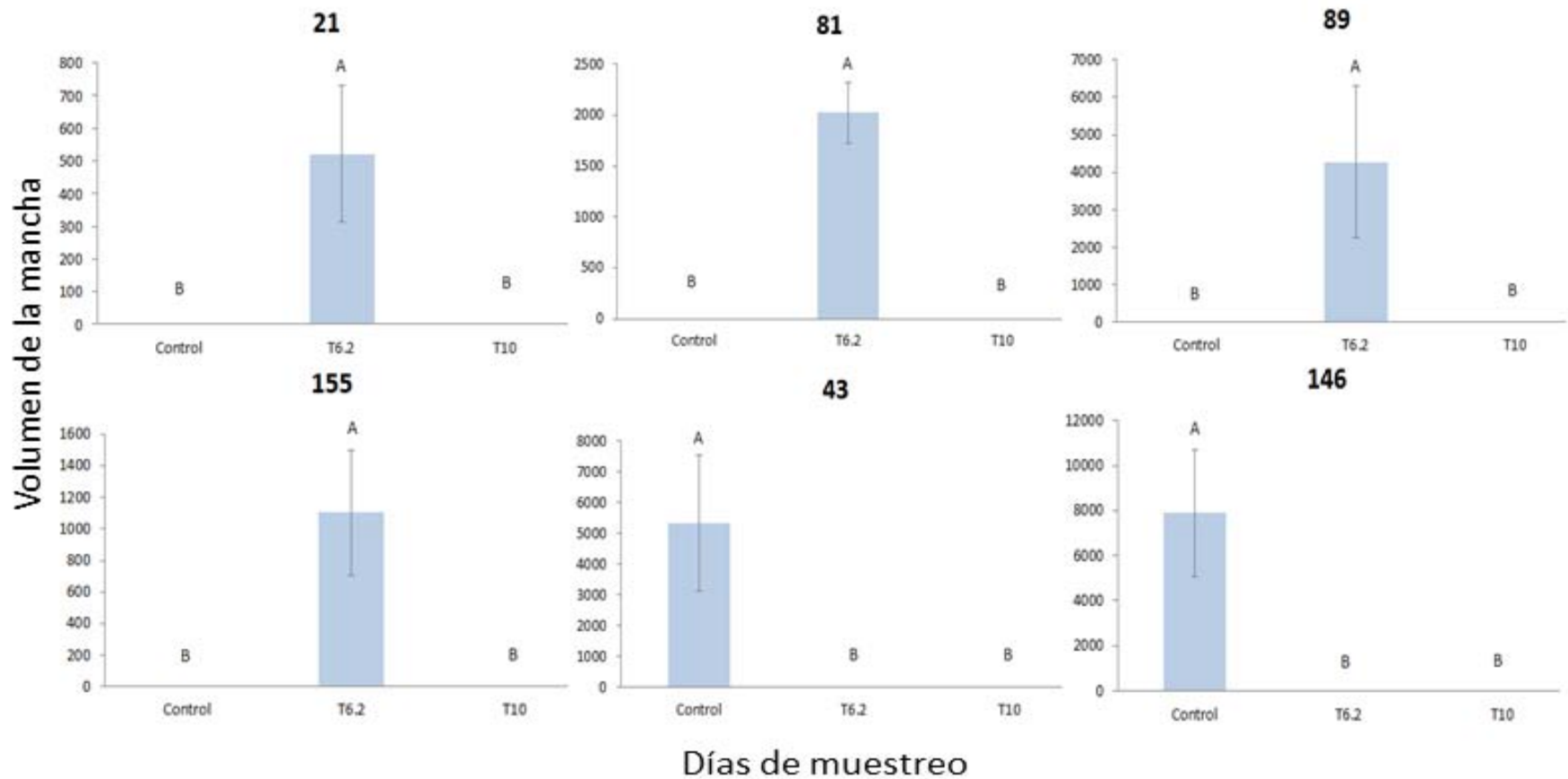


Figura 12. Análisis estadístico (Prueba de Tukey) para comparar las diferencias entre los tratamientos realizados de las proteínas que son estadísticamente significativas y únicas para cada condición. El número superior de cada gráfica es el número de identificación de la mancha.

Es importante mencionar que debido a que hay manchas únicas para ciertas condiciones (ya sea que aparecen o desaparecen) que pudiera ser biológicamente importante, se tomaron en consideración aun si los resultados estadísticos no presentaron significancia, como consecuencia de la variación en la expresión a causa de las limitaciones de la técnica (como el caso del corrimiento del gel y las regiones en donde se aprecian las manchas). Este es el caso para las manchas número 76, 67, 128, 80, 77, 17, 108, 19, 126, 82, 28 y 105 (Anexo IV).

- Proteínas asociadas a la capacidad germinativa: Se detectaron dos proteínas (43 y 146) que son exclusivas de la condición control. Por otra parte, se detectaron cuatro proteínas (77, 82, 105 y 126) que se expresan únicamente en las condiciones control y T6.2 y desaparecen cuando se pierde la capacidad germinativa, por lo cual también pudieran tener un papel en mantener este estado.

- Proteínas que se expresan en el envejecimiento: se detectaron once proteínas (8, 17, 19, 28, 67, 76, 80, 81, 83, 108 y 118) que no se expresan en el control y que por su expresión estable tanto en T6.2 como en T10 pueden asociarse exclusivamente al envejecimiento y pérdida de capacidad germinativa.

Las proteínas 21, 67, 81, 89 y 155 son únicas para el T6.2, por lo que podrían asociarse a proteínas de defensa ante el proceso de envejecimiento (o que se expresan como respuesta al estrés) ya que se detectaron únicamente cuando las semillas están en proceso de deterioro, pero no cuando las semillas se encuentran viables ni cuando hay una pérdida casi total de la capacidad germinativa.

- Proteínas cuya expresión varía como consecuencia del envejecimiento. Son proteínas que se encuentran presentes en todas las condiciones, y varía su expresión durante el envejecimiento. Se detectó una que aumenta (111) y cuatro que disminuyen (137, 135, 117). En general la variación significativa se encuentra entre el control y T10.

- Proteínas de expresión variable. Representa al conjunto de proteínas que no tuvieron un patrón en las tres condiciones sin embargo su patrón de expresión fue similar tanto en el control y T10. La proteína 129 presento un aumento mientras que la 128 y 141 una disminución. Entre estas condiciones no se encontró diferencia en dicha expresión a pesar de ser los extremos del proceso de envejecimiento.

### 3.5 Identificación de proteínas en las manchas seleccionadas

De las manchas que tuvieron una variación significativa y se mandaron a secuenciar se tuvo el resultado de únicamente de seis. Si bien esto nos da un acercamiento respecto a los procesos que están implicados en el envejecimiento, aun representa una lista parcial. Se encontró que la mayoría de estas proteínas están relacionadas a diferentes vías de estrés (Tabla 6, figuras 13 y 14).



Tabla 6. Resultado de la secuenciación por espectrometría de masas de las manchas seleccionadas. Las manchas sombreadas de verde son aquellas que son únicas para el control; mientras que las sombreadas de color café son las únicas en la condición T6.2.

| ID  | Péptido  | Descripción   | Accesión                 | Nivel de confianza | Score  | Cobertura | Prob      | PM   | pl   | Función putativa   |
|-----|--|---|--------------------------|--------------------|--------|-----------|-----------|------|------|--|
| 43  | SMALGcTAKLG<br>VADAIHRAGGR                               | O-metil transferasa putativa <i>Oryza sativa</i> (Osl 25902)                                      | EAZ03774<br>GI:125558238 | Alto               | 9.56   | 5.98      | 1         | 39.8 | 5.77 | Metila el oxígeno de diversos metabolitos incluyendo flavonoides, fenilpropanoides y alcaloides. Involucrados en múltiples procesos. |
|     | AETLILDGDPK  | Producto de proteína sin nombre [Vitis vinifera] Proteína de estrés universal A-like protein-like | CBI39085<br>gi296089313  | Alto               | 8.05   | 8.53      | 13.7<br>6 | 14.2 | 8.47 | Proteína de estrés universal, presentes en archea, bacterias, hongos y plantas. Mecanismo de defensa ante múltiples estreses.        |
| 155 | VYGDIIATLPD<br>RVETFVEDAVS<br>KVLVQEGIYEKI<br>TFTGSTAVGK | Proteína hipotética ciclo_v10004713mg [Citrus clementina]   | gi567859218              | Alto               | 504.8  | 9.15      | 31.7<br>8 | 52.5 | 7.85 | Succinato semialdehído deshidrogenasa  |
| 89  | DAFLANEATK   | Predicha: annexina D1 [Vitis vinifera]  | gi225459318              | Alto               | 14.17  | 3.24      | 1         | 35.2 | 7.58 | Tiene actividad peroxidasa. Función durante estrés oxidativo.  |
|     | GMEILEFSRWV<br>LSASPFDR                                  | Proteína remodelador de cromatina 9 [Arabidopsis thaliana]  | gi42561667               | Alto               | 7.66   | 2.2       | 1         | 98.4 | 6.96 | Remodelador de cromatina perteneciente a la familia de las helicasas   |
| 135 | DEEAAEHMKE<br>EEELMKLK                                   | Predicha: Proteína de alta movilidad del grupo B 13-like [Solanum lycopersicum]                   | gi460400021              | Alto               | 216.89 | 3.61      | 1         | 58.7 | 9.29 | Factor de transcripción  |

|     |               |   |                                |      |        |       |   |      |      |   |
|-----|---------------|---|--------------------------------|------|--------|-------|---|------|------|---|
| 117 | EQQEMKEASFR   | Proteína predicha [Hordeum vulgare subsp. vulgare]                      | gi326507446                    | Bajo | 81.41  | 1.42  | 1 | 86.8 | 6.77 | Facilitador del splicing de intrones del cloroplasto  |
|     | AVDSLAKLELIDR | Proteína hipotética EUGRSUZ_L01753 [Eucalyptus grandis]                 | gi629076583                    | Bajo | 81.4   | 2.42  | 1 | 62.3 | 5.43 | Alfa farneseno sintasa vía de síntesis de terpenos  |
|     | ELEIAELLENLR  | Proteína predicha no caracterizada LOC100263435 [Vitis vinifera]        | gi225462023                    | Bajo | 75.78  | 1.93  | 1 | 71.6 | 8.09 | Transferasa de fosfatidilinositol, fosfatidilcolina SFH13.  |
| 141 | ETSALANTR     | Predicha 18.2 kDa clase 1 proteína tipo shock térmico [Citrus sinensis] | XP_006486450.1<br>GI:568866208 | Bajo | 115.72 | 19.23 | 1 | 17.6 | 5.72 | Proteína implicada en la respuesta al estrés, un cambio de estado o la actividad de una célula o un organismo como consecuencia de algunas condiciones estresantes. |
|     | VLQISGER      | 17.6 kDa clase 1 proteína tipo shock térmica [Solanum lycopersicum]     | XP_010326283.1<br>GI:723729858 | Bajo | 75.00  | 18.87 | 1 | 18.1 | 6.6  |   |

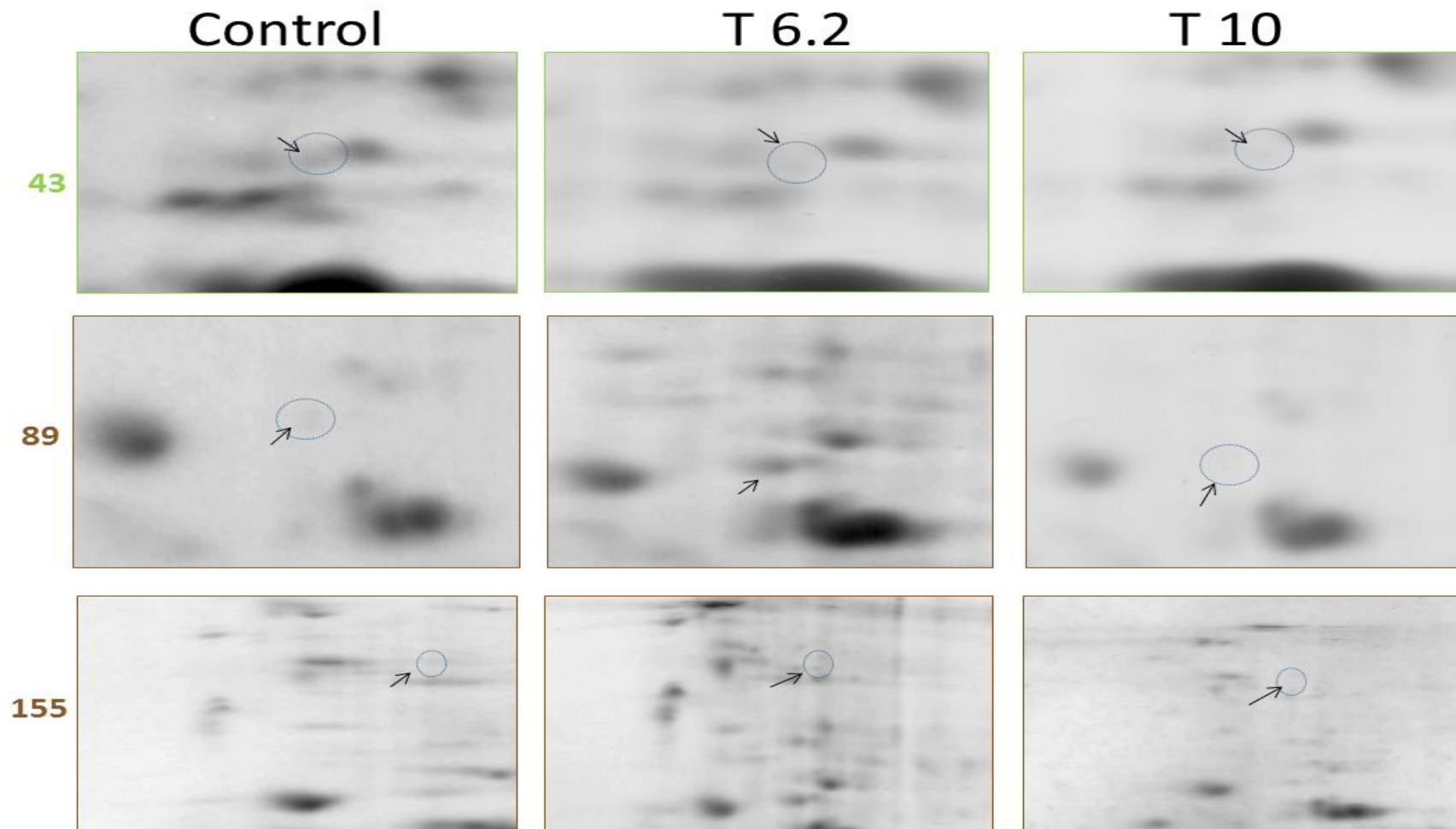


Figura 13. Numeración de las manchas secuenciadas por espectrometría de masas (Tabla 6). Las manchas en recuadros verdes son aquellas que son únicas para el control, las de recuadros color café son las únicas en la condición T6.2.

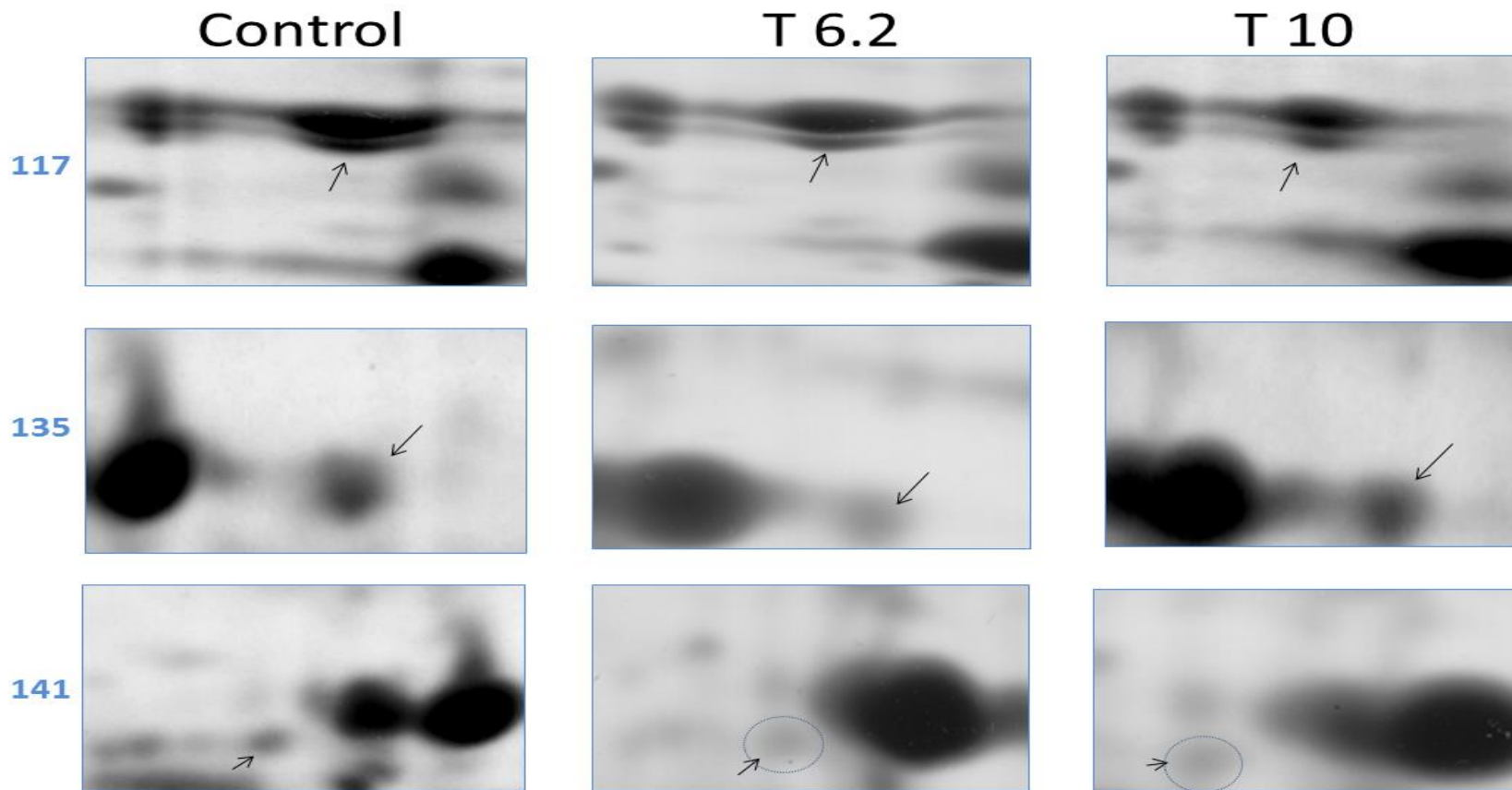


Figura 14. Numeración de las manchas secuenciadas por espectrometría de masas (Tabla 6). Las manchas en los recuadros azules son las que aparecen en todas las condiciones.

- Proteínas asociadas a la capacidad germinativa.

En la mancha 43 (aprox. 28 kDa con un pI de 8), se detectaron dos péptidos con alto nivel de confianza. La primera pertenece a la familia de proteínas de estrés universal (USP), tipo A presente en archea, bacterias, hongos y plantas las cuales han sido estudiadas principalmente en bacterias y que se sabe se regula positivamente cuando la célula se expone a agentes estresantes (Nyström y Neidhardt, 1996a; Nyström y Neidhardt, 1996b; Maqbool *et al.*, 2009). Se han detectado proteínas homólogas en plantas, pero están ausentes en las especies animales (Nyström y Neidhardt, 1992; Nyström y Neidhardt, 1993; Nyström y Neidhardt, 1994; Sauter *et al.*, 2002). Esta proteína tiene la capacidad de responder a diversas condiciones de estrés ambiental. Aunque su diversidad funcional en plantas no está muy bien descrita.

Por otra parte, también se relacionó con la O-metiltransferasa (OMTs) que cataliza la formación de éteres metílicos de molécula pequeña a través de la transferencia de un grupo metilo de la molécula donante S-adenosil-L-metionina (SAM) a un grupo hidroxilo de la molécula de sustrato (Inoue *et al.*, 1998; Lam *et al.*, 2007). Estas proteínas pertenecen a vías implicadas en modificaciones postraduccionales de las proteínas, las cuales pueden ocurrir en defensa a un proceso que altere la homeostasis de los diferentes sistemas implicados en un proceso óptimo para la germinación. Debido a que es una enzima de metilación ayuda a las reacciones de ubiquitinación que ocurre en diversos organismos y es el resultado de modificaciones en macromoléculas para diferentes funciones o propósitos de regulación (Ibrahim *et al.*, 1998; Maury *et al.*, 1999).

- Proteínas que se expresan durante el envejecimiento

De la mancha 89 (40 KDa y un pI de 7) se identificó a dos péptidos con alto nivel de confianza, el primero perteneciente a una proteína remodeladora de cromatina 9 (familia de las helicasas), por lo cual está involucrada en procesos de replicación

y transcripción del ADN. Estas proteínas son de gran importancia ya que regulan los cambios en la estructura de la cromatina lo que está asociado con la activación y el silenciamiento temporal y espacial de la expresión genética, proceso importante para regular los procesos de desarrollo celular (Aalfs y Kingston, 2000; Urnov y Wolffe, 2001; Reyes *et al.*, 2002). Dichos remodeladores alteran el estado basal ya sea activando o reprimiendo la transcripción en determinadas regiones génicas (Aalfs y Kingston, 2000).

También se identificó en esta mancha una secuencia perteneciente a una proteína relacionada a procesos de defensa ante el estrés oxidativo, por formación de radicales libres. Las anexinas que son proteínas de una familia multigénica, dependientes del calcio que se unen a membrana. Existen 8 distintos genes que codifican para las anexinas y se sabe que la expresión de éstas se regula por diversos factores de estrés abiótico (Konopka-Postupolska *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2010).

La mancha 155 (aprox. 30 kDa con un pl de 9) es una proteína conocida como succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH), que se encarga de convertir el succínico semi aldehído a ácido succínico en presencia de  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ . Es una enzima dependiente de  $\text{NAD}^+$  y está involucrado en el paso de ácido butírico-y amino (GABA); una de las funciones en las que está involucrada esta enzima en la protección contra estrés oxidativo (Rajjou y Debeaujon, 2008).

- Proteínas cuya expresión varía como consecuencia del envejecimiento

En el caso de la mancha identificada con el número 135 (aprox. 17 kDa con un pl de 8.5), se trata de una proteína del grupo de alta movilidad (HMG) que se encuentran en el núcleo de células eucariotas y está implicado en procesos como replicación, transcripción y ensamble del nucleosoma (Kwak *et al.*, 2007). Se expresa constitutivamente en muchos tipos de células, se dividen en tres familias la HMGB, la HMGN y la HMGA (Bustin, 2001) y actúan como chaperonas del ADN.

Por otra parte, se identificó un péptido perteneciente a una enzima que puede estar relacionadas con modificaciones en la transcripción, como en uno de los péptidos de la mancha 117 (aprox. 30 kDa con un pI de 7). El primero de ellos correspondiente a un facilitador del empalme (splicing) de intrones del cloroplasto que es una proteína encargada de la modificación por edición de RNA, ya que los genomas de los organelos son ricos en intrones (Kroeger *et al.*, 2009). Este mecanismo de edición determina la abundancia de genes codificados. En cuanto a los intrones que codifican para los organelos se saben tres categorías, el grupo I y II tiene una ancha distribución filogenética y se encuentran presentes en plantas y algas; mientras que el grupo III se encuentran en cloroplastos de protista tipo *Euglena* (Barkan, 2004; Asakura y Barkan, 2006). Existen tres complejos de proteínas en los cloroplastos que se requieren para el empalme de diferente subconjuntos de intrones, y que se ensamblan de manera estable con los intrones en vivo; CRS1, un complejo CRS2 / CAF1, CRS2 / CAF2 relacionados con una enzima hidrolasa llamada peptidil-ARNt (Asakura y Barkan, 2007).

El segundo péptido identificado en la mancha 117 está relacionado con una  $\alpha$ -farneseno sintasa de la vía de síntesis de terpenos, el (E,E)  $\alpha$ -farneseno es un hidrocarburo producido por un sesquiterpeno, se reportó como un compuesto volátil bioactivo en la piel de la manzana (*Malus domestica*), por lo que su estudio se ha centrado en como este compuesto está relacionado con la escaldadura superficial (trastorno caracterizado por padecimiento o broceado de la piel de la manzana, asociado con la muerte celular pipodermal) (Rupasinghe *et al.*, 2000; ; Pechous y Whitaker, 2004; Green *et al.*, 2007). En manzana se sabe que las características de la  $\alpha$ -farneseno sintasa es un peso molecular de 108 KDa oligomérica con un pH de actividad de 5.6, y requiere un cofactor ya sea  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  (Rupasinghe *et al.*, 2000; Green *et al.*, 2007). A su vez se sabe que se ha producido por muchas plantas en diversos tejidos, en respuesta a ataques de patógenos o heridas por herbívoros (Huang *et al.*, 2003).

En cuanto a proteínas que se relacionan con las membranas tenemos al tercer péptido de la mancha 117, la cual presenta una alta identidad a una transferasa de fosfatidilinositol-fosfatidilcolina; las moléculas de fosfolípidos desempeñan una función estructural ya que conforman las membranas celulares y su composición se asocia al estado de la misma, lo cual es sumamente importante durante la germinación. Se sugiere que actúan además como segundos mensajeros que regulan el crecimiento de plantas, el desarrollo y respuesta a cambios ambientales. Las fosforilaciones de anillos de inositol del fosfatidilinositol se lleva a cabo por diferentes cinasas (Lingaraj *et al.*, 2008). La vía de fosfoinositol (phosphoinositide) puede afectarse en respuesta a diferentes condiciones de estrés como el salino, osmótico, de temperatura, de patógenos, etc (Xue *et al.*, 2009).

- Proteínas de expresión variable

Otra vía de respuesta a estrés implicada, se refleja en la mancha 141 (aprox. 15 kDa con un pI de 7), una pequeña proteína de choque térmico (smHSP, por sus siglas en inglés), que son un grupo de proteínas con masa molecular de entre 42 a 15 kDa. Estas protegen a las células de los efectos perjudiciales de la elevación de la temperatura, y el aumento de dichas proteínas conduce a una mayor tolerancia a la misma. Se sabe que actúan como chaperonas, algunas promueven la degradación de las proteínas mal plegadas (Waters *et al.*, 1996; Queitsch *et al.*, 2000). Estas pueden ser detectadas al inducirse por las condiciones ambientales, este aumento dependerá de las condiciones de estrés y el tiempo al que sea expuesto, aunque cabe destacar que pueden expresarse también ante estrés osmótico; a su vez, las formas localizadas en citosol, mitocondrias y cloroplasto pueden ser inducidas también por estrés oxidativo (Waters *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2002).



#### 4. Discusión.

*C. odorata* es una especie de gran importancia para la industria forestal, por lo que es necesario profundizar sobre los procesos que están involucrados en la pérdida de viabilidad de sus semillas durante el almacenamiento. En general existe poca información respecto a la fisiología seminal de cedro, así como de la mayoría de las especies forestales de origen tropical, que permitan desarrollar mejores estrategias de manejo y conservación.

Para conocer los procesos que están involucrados en la pérdida de viabilidad de las semillas de cedro durante el almacenamiento, se usó como herramientas el envejecimiento acelerado y la proteómica comparada. Es importante mencionar que no se ha reportado ningún estudio previo de análisis de expresión de proteínas en esta especie, por lo que la información que se obtuvo es la primera que ayudara a dilucidar estos procesos.

##### 4.1 El envejecimiento acelerado como una estrategia para el estudio de la longevidad de las semillas.

Debido a que el proceso de envejecimiento natural puede prolongarse hasta dos años (Vázquez-Yanes *et al.*, 1999; Orwa *et al.*, 2009; CONABIO, 2013) y la información de envejecimiento acelerado para esta especie es escasa, fue necesario establecer las condiciones de envejecimiento. Para realizarlo se necesitó contar con un lote vigoroso y con germinación homogénea que garantizó que los cambios en el proceso fueran ocasionados exclusivamente por el envejecimiento y no por cualquier otro factor. Se consideraron dos factores que influyen de manera crucial en el proceso de envejecimiento: la humedad y temperatura (Rossetton y Filho, 1995); se probó el uso de LiCl ya que diversos autores consideran el uso de soluciones salinas saturadas para estas pruebas (Jianhua y McDonald, 1997; Madruga *et al.*, 2011), debido a que se obtienen niveles específicos de humedad relativa, lo que permite reducir la tasa de

absorción de agua, la velocidad y la intensidad del deterioro, sin ocasionar una pérdida de sensibilidad en la prueba. Asimismo, evita la proliferación de microorganismos, aunque debe considerarse que ésta puede favorecerse en niveles de humedad relativa mayores a 75% (Bewley *et al.*, 2013). Resultó de gran utilidad para el envejecimiento de semillas de cedro.

En general, el envejecimiento acelerado se ha implementado principalmente para semillas agrícolas (ISTA, 2011) y requiere de tiempos cortos (aproximadamente 5 días), con una temperatura de 42°C y una humedad de 95% o 100% (Bailly *et al.*, 1996; Pedroso *et al.*, 2010; Shibata *et al.*, 2012). Para el caso específico del cedro, el único estudio de este tipo que se ha realizado, menciona que las condiciones más favorables son a 50°C y 40°C sin dar información acerca de la humedad relativa; con estas condiciones se reportó una pérdida progresiva de la germinación de 87% en 5 días a 40°C y del 45% en 2 días a 50°C. (Borges *et al.*, 1990).

Otra recomendación para este proceso consiste en equilibrar la humedad de las semillas antes de iniciar un envejecimiento acelerado, ya que este puede diferir de una semilla a otra. Para esto, se necesita un tiempo de incubación bajo diferentes condiciones de humedad ambiental, para que las semillas lleguen al punto de equilibrio higroscópico, lo que dependerá, entre otros factores, del contenido de humedad de la semilla y la humedad relativa del aire (Rossetton y Filho, 1995). En el caso del presente estudio, las semillas fueron almacenadas aproximadamente un año, en refrigeración a una humedad y temperatura constantes, por lo que se consideró que las semillas eran un lote en equilibrio higroscópico. Antes de realizar el envejecimiento se determinó su contenido de humedad en 8.7% (Anexo V).

Tomando en cuenta esta información se consideró una prueba inicial de envejecimiento utilizando las condiciones más comunes entre las especies agrícolas, a 42°C  $\pm$ 1 y 95% HR (Shibata *et al.*, 2011; Rossetton y Filho, 1995; Filho, 1999; Pedroso *et al.*, 2010; Madruga *et al.*, 2011), aunque por un tiempo de muestreo más prolongado (10 días); estas condiciones no resultaron favorables

debido a la proliferación fúngica, y por lo tanto se disminuyó la humedad a 75%, sin modificar la temperatura. Bajo estas condiciones ( $42^{\circ}\text{C} \pm 1$  y 75% HR) se obtuvo la disminución de la capacidad germinativa únicamente por las condiciones de incubación.

En el caso de los días al pico, que se refiere al día donde hay una mayor cantidad de semillas germinadas (Czabator, 1962), se observa que a pesar del proceso de envejecimiento, estos no presentan una variación considerable, ya que tanto en semillas envejecidas como sin envejecer fue aproximadamente cinco días, por lo que se puede concluir que el proceso de envejecimiento acelerado no afecta la velocidad de germinación de manera significativa, si bien afecta el porcentaje final de germinación.

Se buscó relacionar los resultados de la pérdida de la capacidad germinativa con la prueba de viabilidad medida con tetrazolio (ISTA, 2011) y la abertura de los cotiledones. No se encontró una relación clara entre la tinción del tejido (el cual indica viabilidad) y el porcentaje de germinación, debido a que a pesar de que las pruebas de germinación demuestran que las semillas son incapaces de germinar, la prueba del tetrazolio refiere que el tejido se encuentra vivo.

Cabe mencionar que tampoco se encontró una relación entre la germinación y la abertura de los cotiledones, la cual se presentó en los días del envejecimiento (T6.2 Y T10), ya que fue mayor al 50% mostrando que a pesar de que las semillas pasaron por un proceso de envejecimiento el tejido se mantuvo vivo. Esta es una prueba que se realiza comúnmente en los bancos de germoplasma en conjunto con la prueba de tetrazolio como un indicador de viabilidad y refleja la capacidad del tejido a responder a la luz, ya que, al activarse los fotoreceptores se activa una cadena de transducción de señales, generalmente llevada a cabo por cinasas, que trae como resultado la expansión de los cotiledones, en preparación para su función en la captación de energía y aportar nutrientes a la plántula en desarrollo (Christie, 2007; Sullivan y Deng, 2003; Chen *et al.* 2004).

Estos resultados indican que como resultado del envejecimiento acelerado, si bien las células y tejidos se mantuvieron vivos, sufrieron un proceso de deterioro irreversible que culminó en la pérdida de la capacidad germinativa. Lo anterior ofreció una perspectiva interesante en el cual estudiar los procesos asociados al deterioro de las semillas, ya que se contó con tejido vivo, en el cual se pueden evidenciar los efectos del daño y las respuestas celulares de defensa. Debido a la falta de profundidad en el estudio del proceso de envejecimiento no podemos relacionar estos resultados a una vía en particular, ya que los resultados obtenidos en las proteínas secuenciadas muestran muchas vías implicadas (Noodén y Leopold, 1988; Smith y Berjak, 1995; Jain *et al.*, 2006; Hundertmark *et al.*, 2011; Hu, *et al.*, 2012).

#### 4.2 Análisis de proteínas relacionadas al proceso de envejecimiento en semillas.

La ventaja de usar la electroforesis bidimensional para estudiar y analizar el envejecimiento es que a través de una mezcla compleja de proteínas permite la identificación y la visualización de componentes individuales y de manera simultánea a varias proteínas (Dozal, 2012); para que esto sea posible es necesario llevar a cabo un proceso de extracción en el cual se considere el tipo de tejido y el método. En este trabajo, el método usado fue el de fenol en medio básico debido a que ayuda a la solubilidad de proteínas de membranas, glicoproteínas, citosolicas y algunos lípidos y pigmentos (Tsugita y Kamo, 1999; Chatterjee *et al.*, 2012); su vez el fenol reduce la degradación de proteínas durante la extracción y posee una alta capacidad de limpieza de proteínas, ya que evita su unión con otras macromoléculas. Gracias al pH se inhiben la actividad de proteasas y evita la formación de enlaces de proteínas con el hidrogeno (Carpentier *et al.*, 2005; Chatterjee *et al.*, 2012). Por lo cual este método puede darnos una cobertura de aproximadamente el 95% del total de las proteínas de una muestra y con la calidad requerida para llevar a cabo una electroforesis 2D con una buena distribución de manchas y buena calidad (Schuster y Davies, 1983; Rose *et al.*, 2004; Carpentier *et al.*, 2005; Chatterjee *et al.*, 2012).

Aunque la 2D puede presentar una desventaja en la cobertura de proteínas con muy altos o bajos pesos moleculares, valores altos o bajos de puntos isoeléctricos o que presenten baja abundancia (ya que pueden quedar enmascarados por otras proteínas más abundantes). A su vez la sensibilidad del método de tinción utilizado puede ser una limitante adicional, pero aun así se obtiene buenos resultados, por lo que es un método muy usado en la actualidad para el análisis del proteoma (O'Farrell, 1975; Rabilloud, 2002; Carpentier *et al.*, 2005; Alberts y Bray 2006).

En cuanto al análisis proteómico de 1 y 2 D podemos notar que la mayoría de las proteínas se encuentran por debajo de pesos moleculares de 40 KDa y tienen una distribución a lo largo de pI más básicos; en cuanto a las proteínas de alto peso molecular en su mayoría tiene una menor expresión lo que dificulta su análisis.

En general se observaron patrones muy similares (en ambas electroforesis) entre la condición control y las envejecidas, por lo que los cambios en la cantidad de manchas detectadas son sutiles, aunque cabe destacar que en el caso de la condición de G50 el número de manchas se incrementó ligeramente, lo que denota que una aparición de proteínas, que pudieran estar relacionadas a mecanismos de defensa ante el envejecimiento, y se refleja en las 5 proteínas únicas en esta condición.

Se detectaron dos proteínas en la condición control que son únicas en el estado inicial que pueden estar relacionadas en la elevada capacidad germinativa que tiene la semilla, pero se pierde totalmente su expresión una vez que ocurre el envejecimiento. De estas proteínas únicas se encontró que una de las está relacionada con una OMTs (mancha 43) que lleva acabo metilaciones relacionadas con diferentes funciones o propósitos de regulación. Entre las diversas vías en las que están relacionadas las OMTs es la síntesis de compuestos secundarios como fenilpropanoides, flavonoides y derivados del ferúlico (que se acumulan en la pared celular como barrera mecánica). En semillas se sabe que algunos de estos metabolitos secundarios como lo es la vía de los fenilpropanoides actúan como reguladores en la germinación. (Inoue *et al.*, 1998;

Ibrahim *et al.*, 1998; Maury *et al.*, 1999; Lam *et al.*, 2007). Por otra parte la OMTs puede estar relacionada con la L-isoaspartil (D-aspartil), debido a que la reparación del D-aspartil que son generados durante la desecación o el envejecimiento que ayuda a la preservación de la viabilidad del embrión (Lowenson y Clarke, 1992; Mudgett *et al.*, 1997; Ogé *et al.*, 2008).

Otra proteína relacionada es la proteína de estrés universal (USP) que como su nombre lo dice es una proteínas que se regula positivamente cuando la célula se expone a agentes estresantes, se han estudiado ampliamente en bacterias, mientras que en plantas se han estudiado en *A. thaliana* y su respuesta ante patógenos (Shinozaki *et al.*, 2007), en *Oryza sativa* L. en adaptación a hipoxia (Sauter *et al.*, 2002), mientras que en *Gossypium arboreum* su resistencia a sequias, las cuales son inducidas ante una condición de estrés (Maqbool *et al.*, 2009; Isokpehi *et al.*, 2011). En *Fagus sylvatica*, la pérdida de actividad y degradación de proteínas de USP como consecuencia de la carbonilación se relacionó a la pérdida de viabilidad en semillas almacenadas (Kalemba y Pucacka, 2014). Esto hace a proteínas USP candidatos importantes para su estudio como marcadores moleculares de la viabilidad de semillas de *C. odorata*.

Por otra parte, se detectaron cinco proteínas que se presentan únicamente en el G50, las cuales podrían tratarse de defensa o respuesta al deterioro, ya que pertenecen a semillas que fueron sometidas durante 6.2 días a una condición de estrés, y pudieran representar aquellas que están ayudando a contender contra los daños ocasionados por las condiciones de estrés y mantener la viabilidad de las semillas. No pudieron ser detectadas con el aumento en el tiempo de envejecimiento.

Entre ellas, se detectó una proteína de la familia de las anexinas (mancha 89). En *Escherichia coli* se ha estudiado y se ha relacionado con protección celular ante el estrés oxidativo y es activada por la oxidación de cisteínas (Clark *et al.*, 2010); en plantas se cree que tiene una función similar, y estar relacionada a canales iónicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que inician cascadas de fosforilación o activan factores de transcripción que controlan la expresión de genes como respuesta a una condición de estrés. En *A.*

*thaliana* se ha estudiado la respuesta de las anexinas ante estrés abiótico, y como el ABA puede ser un regulador de su expresión; mientras que en *O. sativa* L. en condiciones de sequía es altamente expresada, y en *Pinus taeda* se afectó su expresión debido a estrés por sequía (Watkinson *et al.*, 2003; Gorantla *et al.*, 2005; Konopka-Postupolska *et al.*, 2009). El que en semillas de cedro se exprese preferentemente al ser sometido a condiciones de deterioro, sugiere que participa como uno de los mecanismos de defensa para contender contra el daño celular y asistir en mantener la viabilidad de las semillas. Su desaparición en el estado más avanzado de envejecimiento sería indicativo que el daño ha avanzado a un nivel que no permite la activación de este mecanismo de defensa, ya sea porque la proteína se degrada o se inhibió su transcripción/traducción.

En esta misma mancha se identificó también un remodelador de cromatina, la cual está relacionada a la activación o silenciamiento de genes. El remodelaje de la cromatina se ha estudiado activamente en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), en moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y los mamíferos, y han revelado que para la generación de cambios en los patrones de expresión es necesario la remodelación de la cromatina en promotores y otras regiones reguladoras del ADN, además pueden estar relacionados con la actividades de reparación de ADN (Kingston y Narlikar, 1999; Aalfs y Kingston, 2000; Urnov y Wolffe, 2001; Reyes *et al.*, 2002; Clapier y Cairns, 2009; Rosa *et al.*, 2013). Sin embargo, su función en semillas sigue siendo en gran parte inexplorado, se ha encontrado que están relacionados en la ruptura de la latencia y como se desarrolla una respuesta ante un factor exógeno (Ogas *et al.*, 1999; Clapier y Cairns, 2009). En particular, las helicasas están implicadas en la reorganización de ribonucleoproteínas y jugar un papel crítico en la regulación de la expresión génica (De la Cruz *et al.*, 1999; Kanai, *et al.*, 2013); representan una familia grande de proteínas que se han identificado en virus, bacterias, hongos, plantas y animales (Umate *et al.*, 2010).

El remodelador de cromatina 9 pertenece a una subfamilia de helicasas constituyente a la familia DEAD-box que utilizan ATP para abrir de manera transitoria la doble cadena de ADN (Tuteja, 2003; Umate *et al.*, 2010). Aunque no

se ha descrito su función, otras proteínas de esta familia se han estudiado en *Arabidopsis* y al parecer participan como activadores de la transcripción, y se han asociado a la tolerancia a estrés abiótico y a temperatura (estrés por frío) (Gong *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2008); en arroz, se han relacionado a respuestas a patógenos y estrés oxidativo; en tomate a la tolerancia al estrés salino y por sequía (Umate *et al.*, 2010); mientras que en tabaco se ha involucrado en la diferenciación y morfogénesis del cloroplasto (Wang *et al.*, 2000). En general esta subfamilia de helicasas están muy relacionada a respuesta a estrés biótico y abiótico (Tuteja, 2003; Umate *et al.*, 2010).

Si se considera que estos remodeladores de cromatina pueden estimular o silenciar la expresión de los genes, se puede suponer que a medida que progresa el envejecimiento es necesario modificar la actividad de genes que expresan proteínas necesarias para contrarrestar los daños generados.

Otra proteína implicada (mancha 155) es una succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH) que en plantas se localiza en la mitocondria está relacionada con la síntesis del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y formación de sustratos de la cadena respiratoria mitocondrial (succinato y NADH), en plantas la producción de GABA aumenta significativamente en respuesta a diversos estreses bióticos, abióticos, heridas mecánicas y senescencia (Bouché *et al.*, 2003; Ludewig *et al.*, 2008). La deficiencia de síntesis de GABA o de algunas de las enzimas implicadas en esta síntesis, puede promover el estrés oxidativo debido falta de capacidad de captar el  $H_2O_2$ . A su vez es importante mencionar que la síntesis de GABA está regulada por  $Ca^{2+}$  a través de la glutamato descarboxilasa (GAD, que es la enzima encargada de pasar de glutamato a GABA) (Bouche y Fromm, 2004). En *Arabidopsis* se ha identificado tanto en semillas secas como durante la germinación y se ha propuesto que juega un papel en promover la longevidad de las semillas (Rajjou y Debeaujon, 2008).

Si la síntesis de GABA se relaciona con el  $Ca^{2+}$  y las anexinas por su parte también están relacionadas con canales de  $Ca^{2+}$  se puede proponer que ambas vías por su parte estén relacionadas por la similitud en la expresión con la



defensa al estrés oxidativo generado como consecuencia del estrés oxidativo, para afirmar esto es necesario realizar estudios funcionales que nos permitan conocer más acerca de del proceso de envejecimiento. (Ogas *et al.*, 1999; Bouche y Fromm, 2004; Clark *et al.*, 2010).

Las proteínas que se presentaron exclusivamente en la condición G50 muestran que están relacionadas con un mecanismo complejo de defensa ante un proceso de estrés oxidativo que se está generando por el aumento de temperatura y humedad (envejecimiento acelerado).

Si mencionamos las cuatro proteínas (77, 82, 105 y 126) que se relacionan en este primer proceso de envejecimiento, cuando todavía no se pierde totalmente la viabilidad (control y T6.2) y se comienzan los sistemas de reparación y/o defensa, la expresión que presentan es constante desde la condición de alta viabilidad por lo que pueden ser proteínas implicadas en el mantenimiento de la viabilidad. De estas proteínas no pudo ser posible su secuenciación por lo que en el futuro sería interesante conocer.

El segundo grupo se refiere a las manchas cuya expresión es variable a medida que se presenta el proceso de envejecimiento, se detectaron 11 proteínas (8, 17, 19, 28, 67, 76, 80, 81, 83, 108 y 118) que se expresaron únicamente durante el envejecimiento (T6.2 y T10). De estas proteínas no se tiene secuenciación pero también sería importante estudiarlas debido a que se presentan solo en el envejecimiento y con una tendencia a disminuir su expresión por lo que pueden estar referidas a sistemas de reparación y/o defensa que se degradan o disminuyen su expresión a medida que progresa el envejecimiento y por tanto no pueden cumplir su función lo que se refleja en la pérdida de la capacidad germinativa.

Hay un grupo de proteínas que se encontró en todas las condiciones pero cuya expresión fue muy variable, de las cuales la mayoría presentan una disminución en su expresión progresiva a medida que avanza el envejecimiento. De estas se identificaron dos secuencias (117 y 135), de las cuales la 117 se detectaron 3

péptidos; la primera es un un facilitador del splicing de intrones del cloroplasto que es una proteína encargada de la modificación por edición de ARN, ya que los genomas de los organelos son ricos en intrones (Kroeger *et al.*, 2009); sin embargo, su función en la semilla seca no es clara ya que regularmente el embrión no presenta cloroplastos diferenciados, los cuales son indispensables en etapas posteriores, una vez que la semilla germina y presenta las primeras hojas verdaderas y pueden así captar la energía lumínica y realizar la fotosíntesis (Buchanan *et al.*, 2000; Weitbrech *et al.*, 2011; Bewley *et al.*, 2013).

Pese a esto en las semillas existen los proplastidos que darán origen a los cloroplastos, así como también a los leucoplastos (involucrados en la síntesis de monoterpenos, compuestos volátiles contenidos en aceites esenciales), etioplastos (un estado intermedio entre el proplasto a cloroplasto, pero no necesariamente puede formar el cloroplasto), y el cromoplastos (son responsables de dar color a frutos, flores y raíces) (Buchanan *et al.*, 2000); por lo que esta proteína que se encarga de la modificación por edición del ARN, puede estar relacionada con la diferenciación de los proplastidos a cloroplastos; por lo que la disminución de esta proteína a medida que progresa el envejecimiento puede afectar dicha diferenciación y por lo tanto los cloroplastos pierde la capacidad de realizar sus funciones y es preciso mencionar que no solo los proplastos se diferencian en cloroplastos, por lo que si las funciones de este conjunto de organelos se afecta muchas funciones implicadas también y con ello se pierde la capacidad de la semilla en llevar un proceso de germinación y desarrollo normal, el cual se ve reflejado en la pérdida de la capacidad germinativa.

El segundo péptido identificado está relacionado con una  $\alpha$ -farneseno sintasa de la vía de síntesis de terpenos, la cual se ha estudiado en manzanas y observamos que las características de la enzima en cuanto a peso molecular con la que obtuvimos para el cedro, no son muy similares, aunque también se ha aislado también en otras especies como pera (Green *et al.*, 2007), pepino (*Cucumis sativus*) (Mercke *et al.*, 2004), pino (*Pinus taeda*) (Phillips *et al.*, 2003) y

abeto (*Picea abies*) (Martin *et al.*, 2004), pero a excepción de la pera no se ha encontrado mucha similitud en su secuencia.

En general los terpenos tienen funciones de defensa directa como toxinas, estos son a menudo liberados como compuestos volátiles, en semillas los compuestos volátiles se asocian con procesos de degradación como la peroxidación de lípidos durante el envejecimiento, uno de los mecanismos más relacionados en estos cambios son los ataques no enzimáticos de los grupos amino de las proteínas y complejos ácido nucleico-proteína para la reducción de azúcares o aldehídos (reacciones de Maillard), las cuales ocasionan la pérdida de viabilidad en semillas (Wettlaufer y Leopold, 1991). Dichas reacciones afectan en su mayoría a la actividad enzimática muy particularmente a enzimas como la glutatión reductasa, ascorbato peroxidasa y catalasa, esto es una causa de la baja capacidad antioxidante y por lo tanto poca tolerancia al daño oxidativo (Colville *et al.*, 2012).

El tercer péptido identificado se refiere a una transferasa de fosfatidilinositol, fosfatidilcolina; esta proteína está relacionada con el metabolismo de los lípidos, los cuales son componentes estructurales de membranas; a su vez son importantes debido a las diversas vías de transducción de señales en la interfaz de membrana citosol, la organización del citoesqueleto, eventos nucleares, permeabilidad y transporte de la membrana; también se ha demostrado que el metabolismo de lípidos está relacionado con la movilización de membranas (Xue *et al.*, 2009; Ghosh y Bankaitis, 2011). En plantas están implicados en el desarrollo del embrión, el cierre de los estomas, y la señalización y traducción de luz y azúcares (Xue *et al.*, 2009; Bankaitis *et al.*, 2010). En el caso de deficiencias en algunas transferasas puede ocasionar abortos en embriones, retrasar la maduración del embrión y reducir la fertilidad de semillas y letalidad embrionaria (Xue *et al.*, 2009).

En general la respuesta a diversas condiciones de estrés es la hidrólisis de fosfolípidos que se lleva a cabo por fosfolipasas; la fosfolipasa C cataliza al fosfatidilinositol para convertirlo en trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG), mientras que la fosfolipasa D cataliza la fosfatidilcolina para convertirlo en ácido

fosfatídico, que funciona como un segundo mensajero para la regulación de quinasas, involucradas en señalización de estrés y desarrollo (Katagiri *et al.*, 2005 Xue *et al.*, 2009).

La segunda secuencia es una proteína (135) del grupo de alta movilidad (HMG), de las cuales se sabe que la HMGB1 participa en la replicación del ADN, la recombinación, la transcripción, y reparación (Tang *et al.*, 2011); en su conformación presentan dos dominios positivos conocidos como caja A y B, dichas cajas funcionan como dominios de unión al ADN, los cuales están dirigidos a sitios particulares del ADN, pero en las plantas las proteínas HMGB difieren de las presentes en los animales ya que las vegetales contienen un sólo inhibidor de la caja HMG, mientras que en animales contienen uno o dos (Webster *et al.*, 1997; Ritt *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2011). El que haya una variación en la cromatina que se encuentre asociada a las HMGB, en las interacciones al ADN y el patrón de expresión, va a depender de la adaptación que tengan la célula con el medio para alterar las funciones nucleares (Grasser, 1995; Lichota y Grasser 2001; Kwak *et al.*, 2007). Se han codificado ADNc de proteínas HMGB en varias plantas como; maíz (Grasser y Feix, 1991), soja (Laux y Goldberg, 1991), guisante (Webster *et al.*, 1997) y el arroz (Wu *et al.*, 2003).

Otro estudio realizado en la expresión en diferentes tipos de HMGB reveló que hay un aumento de expresión en HMGB2, HMGB3 y HMGB4 ante estrés por frío, mientras que hubo una disminución en la expresión de HMGB2 y HMGB3 en estrés por sequía o salinidad (Kwak *et al.*, 2007).

Como se observa en esta categoría las proteínas disminuyen su expresión a medida que progresa el envejecimiento. Las enzimas identificadas tienen funciones muy diversas, pues van desde procesos nucleares hasta procesos de síntesis de compuestos de defensa y estructurales, pero todas responden a un factor de estrés al cual están siendo sometidas las semillas y en este caso en particular esta respuesta se verá disminuida y esto se ve reflejado en la disminución de la viabilidad.

Por otro lado tenemos la proteína 141, la cual es una proteína de expresión variable debido a la localización que presenta, ya que está en la parte inferior del gel y dependiendo el corrimiento puede verse mínimamente como en el caso del T6.2. Son dos proteínas pequeñas smHSP de protección ante los efectos de la elevación de temperatura, se expresan por el aumento de la temperatura, pero dicho aumento dependerá del período de estrés al cual es sometido, aunque también el estrés osmótico y el estrés oxidativo, puede desencadenar su síntesis (Sun *et al.*, 2002). Existen dos familias de smHSP que se encuentran en el citosol (smHSPs de clase I y II), y tres familias distintas en el cloroplasto, el retículo endoplásmico y las mitocondrias (Waters *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2002). Se ha descrito que bajo condiciones normales de crecimiento la mayoría de las smHSPs no pueden ser detectadas pero se produce rápidamente ante respuesta al calor (Sun *et al.*, 2002). En embriones de *Arabidopsis* las smHSPs clase I comienzan a acumularse en la mitad del proceso de maduración y son abundantes en el proceso de maduración y en semillas secas; en guisantes y girasoles aparecen durante la síntesis de reservas y aumenta su abundancia en semillas maduras (Coca *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2002). La sobreexpresión de estas proteínas se ha relacionado a la protección contra el deterioro controlado (por envejecimiento acelerado) en semillas de plantas transgénicas de *Nicotiana tabaco* (Prieto-Dapena *et al.*, 2006).

A su vez, tienen una función como proteínas chaperonas, que se definen como proteínas que se unen y estabilizan una proteína inestable, controlando la unión y liberación, facilitar su translocación a través de membranas u otros procesos, ya sea plegada, con montajes oligoméricos, o facilita la eliminación por degradación; por lo que a altas temperaturas las HSP evitan la acumulación de calor desnaturalizado agregados de proteínas o facilitan la reactivación de proteínas tras el estrés (Waters *et al.*, 1996; Queitsch *et al.*, 2000).

En este caso en particular se observó que la expresión de smHSP disminuye si únicamente se considera el control y el T10 puesto que en el caso del T6.2 por el corrimiento no se puede asegurar que desaparece su expresión, aun así se nota

que si son mecanismos de defensa ante condiciones de estrés estos están siendo deteriorados; sería importante modificar las concentraciones de acrilamida en el gel para poder observar de mejor manera la expresión de estas proteínas de bajo peso molecular y corroborar las observaciones en el tiempo T6.2.

Finalmente, un aspecto que debe considerarse es que si bien el número de proteínas cuya expresión se modificó cuantitativamente pudiera parecer reducido, proteínas que aparentemente se expresan de igual manera en todas las condiciones pueden estar modificadas postraduccionalmente, lo cual no se analizó en el presente trabajo. Las modificaciones postraduccionales se refieren a modificaciones que cambian las propiedades de las proteínas por escisión proteolítica o mediante la adición de grupos que modifican uno o más aminoácidos, los cuales pueden afectar el estado de actividad, localización o interacciones con otras proteínas y por tanto su funcionalidad (Cohen, 2000; Tyers y Jorgensen, 2000; Mann y Jensen 2000). Estos cambios postraduccionales pueden ser, carbonilación, ubiquitinación, metilación, sulfonación, etc.; dichos cambios no pueden ser visualizados directamente con la electroforesis bidimensional, para observarlos es necesario realizar un estudio complementario que permita analizar estos cambios en la secuencia de proteínas. Alternativamente, podría visualizar estos cambios por marcajes metabólicos (Soskic *et al.*, 1999; Mann y Jensen, 2000).

Es importante tener en cuenta que el genoma de la especie *C. odorata* no se encuentra secuenciado, además de que existen muy pocas secuencias proteínicas en las bases de datos, por lo que para realizar la identificación de proteínas, estas deben tener dominios muy conservados para que se tengan buenas coberturas y altas probabilidades de encontrar los péptidos homólogos. En este caso algunas presentan valores de cobertura bajos, lo cual refleja precisamente esta situación, aunque también puede deberse a que son manchas muy pequeñas lo que también influye en la identificación. Si se requiere corroborar que la proteína identificada es la correcta es necesario realizar estudios más profundos para su caracterización y estudios funcionales. Aunque también es posible conocer el tipo de modificaciones

que pueden presentar las proteínas pero considerando las limitaciones mencionadas anteriormente (Stensballe *et al.*, 2001). De todas formas, este trabajo representa un primer acercamiento y sienta las bases para futuros estudios.

## 5. Conclusiones

Para la especie *C. odorata*, el envejecimiento acelerado realizado nos permitió detectar cambios sutiles en el patrón de expresión total de proteínas. A través del análisis proteómico se lograron detectar al menos 15 que cuyo patrón de expresión varía significativamente, por lo que pudieran representar candidatas a posibles marcadores moleculares de un estado vigoroso, así como de la pérdida de la capacidad germinativa.

Debido a la escasa información que se tiene respecto a *C. odorata* se establecieron las condiciones para el envejecimiento acelerado; en el caso particular del lote AA 549/4 (genotipo 50), se determinó que a 42°C y una humedad relativa de 75% por 6.2 y once días, se reduce el porcentaje de germinación al 50 y a menos de 30%, respectivamente. Bajo estas condiciones se evita la proliferación de microorganismos y se puede asegurar que el proceso de envejecimiento ocurre como consecuencia de las condiciones a las que el material está siendo sometido.

Aunque no era un objetivo en este trabajo se buscó relacionar el porcentaje de germinación con la prueba de viabilidad de tetrazolio sugerida por el ISTA (2011). No se encontró una relación entre la tinción y la capacidad germinativa; sin embargo, se evidenció que después del tratamiento de envejecimiento las células de los tejidos permanecen vivas, si bien los niveles de deterioro alcanzados no permiten que culmine la germinación.

En cuanto a los patrones de expresión de proteínas que se presentan en las tres condiciones establecidas (Control, T6.2 o G50 y T10) se apreció que la mayoría de las proteínas están presentes en pesos moleculares menores a 40 KDa y un pH que tiende a valores básicos. Se detectaron cambios significativos en la expresión 15 proteínas, de los cuales solo seis son exclusivas de una condición en particular (dos manchas del control, cuatro del T6.2).



Se identificaron cinco proteínas por EM las cuales a pesar de estar relacionadas a diferentes vías metabólicas o procesos celulares, todas corresponden a proteínas de defensa ante una condición de estrés biótico y/o abiótico. Ya sea regulando la expresión genética (tal es el caso de los remodelados de cromatina, los factores de transcripción o el facilitador del empalme (splaining) de intrones) o en las diferentes vías de respuesta hacia el estrés oxidativo, por lo que refleja que es un factor importante en la pérdida de viabilidad.

Respecto a la identificación de potenciales marcadores moleculares de un estado vigoroso de la semilla, se encontró que se expresaban las proteínas de estrés universal (UPS) y la O-metiltransferasa (OMTs) ya que son proteínas que desaparecen una vez que los porcentajes de germinación decaen.

Como marcadores de envejecimiento podrían considerarse las proteínas asociadas a estrés, como las anexinas. En el caso de las proteínas de expresión variable, a pesar de ver una tendencia a la disminución es necesario conocer más acerca de esta variación para considerarse un buen marcador.

En el presente trabajo se logró conocer las variantes en la expresión del patrón de proteínas bajo distintas condiciones de envejecimiento en semillas de cedro. Sin embargo, la aplicación de este conocimiento para la selección de semillas o condiciones de almacenamiento, requerirá continuar las investigaciones para así encontrar el mejor marcador del proceso de pérdida de viabilidad en esta especie.

El envejecimiento es un proceso complejo, que involucran diversas vías de señalización, metabólicas, etc. Debido a que este es el primer trabajo que busca profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrado en *C. odorata*. El análisis proteómico, con ayuda de la espectrometría de masas, permitió un acercamiento de los procesos implicados en la pérdida de longevidad de las semillas.

La información generada puede ayudar en el futuro a comprender cuales son las vías implicadas en el envejecimiento, y así obtener un marcador molecular específico del proceso de envejecimiento. Esta información podría ser útil para la

comprensión de este proceso en semillas de otras especies de la familia, tropicales o recalcitrantes.

## 6. Perspectivas

Es necesario profundizar en la información que hay respecto al el envejecimiento para terminar de comprender los procesos involucrados, a su vez es necesario ampliar las especies en las que se trabaja, particularmente en el aspecto forestal, ya que generalmente está limitada a especies de coníferas y hay muy poca información de especies tropicales, siendo que el área tropical en el planeta es extensa.

Estas limitaciones dificultan el estudio de los procesos no solo de envejecimiento sino también de germinación, crecimiento, etc., por lo que sería importante que se comenzara a realizar más investigación de estos procesos y compararlos con lo que ya se conoce hasta ahora en otras especies.

En cuanto al análisis proteómico debe realizarse pruebas que permitan conocer las modificaciones postraduccionales ocurridas en las proteínas durante el envejecimiento (carbonilación, fotorilación, metilación, glucosilación, etc.).

Caracterizar a mayor detalle y en distintas condiciones la expresión de las proteínas identificadas como posibles marcadores a través de un PCR en tiempo real y anticuerpos, para observar su variación a medida que avanza el envejecimiento.

Realizar la comparación del envejecimiento natural y el envejecimiento artificial y encontrar si hay una relación en los cambios presentados por el tipo de envejecimiento.

Buscar un método de almacenamiento que considere los procesos implicados en la pérdida de vigor de las semillas para así aumentar la longevidad de los lotes.

## 7. Literatura citada

**Aalfs, J.D., Kingston, R.E. (2000).** What does “chromatin remodeling” mean? *Trends in biochemical sciences*, 25 (11), 548-555.

**Agrawal, G. K., Thelen, J. J. (2009).** A high-resolution two dimensional Gel-and Pro-Q DPS-based proteomics workflow for phosphoprotein identification and quantitative profiling. In *Phospho-Proteomics* (pp. 3-19). Humana Press.

**Alberts, B., Bray, D. (2006).** Introducción a la biología celular. (268-279). Ed. Médica Panamericana.

**Arc, E., Ogé, L., Grappin, P., Rajjou, L. (2011).** Plant seed: A relevant model to study aging processes. In A. Oigun, *The Field of biological aging: past, present and future.* (pp.87-102). Kerala, India: Transworld Research Network.

**Asakura, Y., Barkan A. (2006).** Arabidopsis orthologs of Maize chloroplast splicing factors promote splicing of orthologous and species-specific group II introns. *Plant Physiology*, 142, 1656–1663.

**Asakura, Y, Barkan A. (2007).** A CRM domain protein functions dually in group I and group II intron splicing in land plant chloroplasts. *Plant Cell*, 19 (12), 3864–3875.

**Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., Come, D. (1996).** Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated ageing. *Physiological plantarum*, 97, 104-110.

**Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F. (2008).** From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes rendus biologiques*, 331 (10), 806-814.

**Balbuena, T. S., Dias, L. L., Martins, M. L., Chiquieri, T. B., Santa-Catarina, C., Floh, E. I., Silveira, V. (2011).** Challenges in proteome analyses of tropical plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23 (2), 91-104.

**Bankaitis, V. A., Mousley, C. J., Schaaf, G. (2010).** The Sec14 superfamily and mechanisms for crosstalk between lipid metabolism and lipid signaling. *Trends in biochemical sciences*, 35 (3), 150-160.

**Barkan, A. (2004).** Intron splicing in plant organelles. (pp. 281–308). In H Daniell, C Chase, eds, *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

**Barrance, A. (2003).** Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas. J. Cordero, y D. Boshier (Eds.). *Biblioteca Conmemorativa Orton, IICA/CATIE*, 447-453.

**Barvkar, V. T., Pardeshi, V. C., Kale, S. M., Kadoo, N. Y., Giri, A. P., Gupta, V. S. (2012).** Proteome profiling of flax (*Linum usitatissimum*) seed: characterization of functional metabolic pathways operating during seed development. *Journal of proteome research*, 11 (12), 6264-6276.

**Benito Matías, L. F., Herrero Sierra, N., Jiménez, I., Peñuelas Rubira, J. L. (2004).** Aplicación de métodos colorimétricos para la determinación de la viabilidad en semillas de pinus pinea: test de tetrazolio e índigo carmín. *Sociedad Española de Ciencias Forestales*, 17, 23-28.

- Berjak, P., Parmenter, N. (1997).** Progress in understanding and manipulation of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds. En R. Ellis, M. Block, A. Murdoch, & H. Hong, *Basic and applied aspects of seed biology* (págs. 689-703). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., Tan, A. S. (2005).** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 11, 127-152.
- Bewley, D. J., Black, M. (1994).** Seeds. Physiology of development and germination. (2 Ed.). New York, USA: Plenum Press. (pp. 1-33), XV.
- Bewley, J. D., Bradford, K., Hilhorst, H., Nonogaki, H. (2013).** Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. (3 Ed.). USA: Springer.
- Bonner, F., Vozzo, J. (1988).** Storing recalcitrant tropical forest trees. Seminario-Taller sobre investigación en semillas tropicales forestales. Bogotá, Colombia: CATIE.
- Borges, E., Castro, J., Borges, R. (1990).** Avaliação fisiológica de sementes de cedro submetidas ao envelhecimento precoce. *Revista Brasileira de Sementes, Brasília*, 12(1), 56-62.
- Bouché, N., Fait, A., Bouchez, D., Møller, S. G., Fromm, H. (2003).** Mitochondrial succinyl-semialdehyde dehydrogenase of the  $\gamma$ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (11), 6843-6848.
- Bouche, N., Fromm, H. (2004).** GABA in plants: just a metabolite? *Trends in plant science*, 9 (3), 110-115.
- Bozo, L., Fernández, M., López, M., Reyes, R., Suárez, P. (2007).** Biomarcadores de contaminación química en comunidades microbianas. Interciencia: *Revista de ciencia y tecnología de América*, 32 (1), 8-14.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Buchanan, B.B., Wilhelm, G., Russell, L. J. (2000).** Biochemistry and molecular biology of plants. (pp. 37-49). 3ra ed., American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, EUA.
- Burns, R. M., & Honkala, B. H. (1965).** Silvics of North American. In Hardwoods. Volumen 2. Washinton. United States Department of Agriculture. 250-255
- Bustin, M. (2001).** Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends in biochemical sciences*, 26 (3), 152-153.
- Carpenter, W. J., Ostmark, E. R., Cornell, J. A. (1995).** Evaluation of temperature and moisture content during storage on the germination of flowering annual seed. *HortScience*, 30 (5), 1003-1006.
- Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., Panis, B. (2005).** Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 5 (10), 2497-2507.
- Catusse, J., Meinhard, J., Job, C., Strub, J.-M., Fischer, U., Pestsova, E., Westhoff, P., Van Dorsselaer, A., Job, D. (2011).** Proteomics reveals potential biomarkers of seed vigor in sugarbeet. *Proteomics*, 11 (9), 1569-1580.

**Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE ). (1996).** Mejoramiento genético, selección y manejo de fuentes semilleras y de semillas forestales. Turrialba, Costa Rica.

**Chatelain, E., Hundertmark, M., Leprince, O., GALL, S. L., Satour, P., Deligny-Penninck, S., Buitink, J. (2012).** Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. *Plant, cell & environment*, 35 (8), 1440-1455.

**Chatterjee, M., Gupta, S., Bhar, A., Das, S. (2012).** Optimization of an efficient protein extraction protocol compatible with two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry from recalcitrant phenolic rich roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International journal of proteomics*, (2012), 1-10.

**Cheah, D. R. D. J. Osborne. (1978).** DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. *Nature*, 272, 593-597.

**Chen, M., Chory, J., Fankhauser, C. (2004).** Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics*, 38, 87-117.

**Chin, H. F. (1994).** Seedbanks: conserving the past for the future. *Seed Science and Technology*, 22 (2), 285,400.

**Chin, H. F., Roberts, E. H. (1980).** Recalcitrant crop seeds. (pp. 152) Kuala Lumpur: Tropical Press.

**Christie, J. M. (2007).** Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 21-45.

**Cintron, B. B. (1990).** Cedro Hembra, Spanish-Cedar, Volumen 2: Hardwoods. Retrieved from Silvics of North America: [http://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/silvics\\_manual/volume\\_2/cedrela/ordota.htm](http://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/silvics_manual/volume_2/cedrela/ordota.htm)

**Clark, G., Konopka-Postupolska, D., Hennig, J., Roux, S. (2010).** Is annexin 1 a multifunctional protein during stress responses?. *Plant signaling & behavior*, 5 (3), 303-307.

**Clapier, C. R., Cairns, B. R. (2009).** The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry*, 78, 273-304.

**Coca, M. A., Almoguera, C., Thomas, T. L., Jordano, J. (1996).** Differential regulation of small heat-shock genes in plants: analysis of a water-stress-inducible and developmentally activated sunflower promoter. *Plant molecular biology*, 31 (4), 863-876.

**Cohen, P. (2000).** The regulation of protein functions by multisite phosphorylation a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 596-601.

**Colville, L., Bradley, E. L., Lloyd, A. S., Pritchard, H. W., Castle, L., Kranner, I. (2012).** Volatile fingerprints of seeds of four species indicate the involvement of alcoholic fermentation, lipid peroxidation, and Maillard reactions in seed deterioration during ageing and desiccation stress. *Journal of experimental botany*, 63 (18), 6519-6530.

**Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (1998).** La diversidad biológica de México: Estudio de país. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F.

**Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2013).** Re: Cedrela odorata. Recuperado de: [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/36-melia2m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/36-melia2m.pdf)

**Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). (2007).** Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre. La Haya, Países Bajos.

**Czabator, F. J. (1962)** Germination value; an index combining speed and completeness of pine seed germination. *Forest Science*, 8, 386-396.

**Domínguez, F., Cejudo, F. J. (2014).** Programmed cell death (PCD): an essential process of cereal seed development and germination. *Frontiers in plant science*, 5, 1-11.

**Dozal, D. (2012).** Determinación de variaciones en el proteoma salival en pacientes pediátricos con rhabdomyosarcoma mediante electroforesis bidimensional. Tesis de maestría. Facultad de Odontología, UNAM. México

**Ellis, R. H., Roberts, E. H. (1981).** The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Science and Technology*, 9, 373-409.

**El-Maarouf-Bouteau, H., Mazuy, C., Corbineau, F., Bailly, C. (2011).** DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. *Journal of experimental botany*, err198, 1-9.

**Espejel, F., Roa, J. C. (2008).** Surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI): tecnología proteómica y su aplicación en oncología. *Medicina Clínica*, 131 (8), 312-317

**Filho, M. (1999).** Testes de vigor: importância e utilização. In: Krzyzanowski, F.C., Vieira, R.D. & França, J.B. (Eds.). Vigor de sementes: conceitos e testes (1.1-1.21). Londrina: Abrates.

**Gallo, C., Enrico, J. M., Cravioto, R., Arango, M. (2012).** Variabilidad de la viabilidad y vigor de lotes de semillas de soja con presencia de simientes verdes pertenecientes a cultivares de distintos grupos de maduración producidos en dos fechas de siembra. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 38(2), 133-140.

**Ghosh, R., Bankaitis, V. A. (2011).** Phosphatidylinositol transfer proteins: negotiating the regulatory interface between lipid metabolism and lipid signaling in diverse cellular processes. *Biofactors*, 37(4), 290-308.

**Giraldo, G., Méndez, M., Bosco Franco, J. (2000).** Manual para el manejo pre y poscosecha de semilla producida de manera artesanal y bajo el esquema de pequeñas empresas de semillas PES. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*. Honduras. pp 51.

**Glotzer M., Murray A.W., Kirschner M.W. (1991).** Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 349, 132-138.

**Gold, K., Hay, F. (2003).** Equilibrating seeds to specific moisture levels. Technical Information Sheet of millennium seed bank, 9.

**Gong, Z., Lee, H., Xiong, L., Jagendorf, A., Stevenson, B., Zhu, J. K. (2002).** RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (17), 11507-11512.

- Gorantla, M., Babu, P., Lachagari, V., Feltus, F., Paterson, A., Reddy, AR. (2005).** Functional genomics of drought stress response in rice: transcript mapping of annotated unigenes of an indica rice (*Oryza sativa* L. cv. Nagina 22). *International Journal of Current Science*, 89, 496–514.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W. (2000).** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 1037-1053.
- Grasser, K. D. (1995).** Plant chromosomal high mobility group (HMG) proteins. *The Plant Journal*, 7 (2), 185-192.
- Grasser, K. D., Feix, G. (1991).** Isolation and characterization of maize cDNAs encoding a high mobility group protein displaying a HMG-box. *Nucleic acids research*, 19 (10), 2573-2577.
- Green, S., Friel, E. N., Matich, A., Beuning, L. L., Cooney, J. M., Rowan, D. D., MacRae, E. (2007).** Unusual features of a recombinant apple alpha-farnesene synthase. *Phytochemistry* 68, 176–188
- Hajduch, M., Casteel, J. E., Hurrelmeyer, K. E., Song, Z., Agrawal, G. K., Thelen, J. J. (2006).** Proteomic analysis of seed filling in *Brassica napus*. Developmental characterization of metabolic isozymes using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*, 141(1), 32-46.
- Harrington, J. F. (1960).** Drying, storing, and packaging seeds to maintain germination and vigour. *Proc. Miss. Short Course for Seedmen*, 1959.
- He, Q. Y., Chiu, J. F. (2003).** Proteomics in biomarker discovery and drug development. *Journal of cellular biochemistry*, 89 (5), 868-886.
- Honoré, B., Ostergaard, M., Vorum, H. (2004).** Functional genomics studied by proteomics. *BioEssays*, 26 (8), 901-915.
- Hu, D., Ma, G., Wang, Q., Yao, J., Wang, Y., Pritchard, H. W., Wang, X. (2012).** Spatial and temporal nature of reactive oxygen species production and programmed cell death in elm (*Ulmus pumila* L.) seeds during controlled deterioration. *Plant, cell & environment*, 35(11), 2045-2059.
- Huang, J., Cardoza, Y. J., Schmelz, E. A., Raina, R., Engelberth, J., Tumlinson, J. H. (2003).** Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta*, 217 (5), 767-775.
- Hundertmark, M., Buitink, J., Leprince, O., Hincha, D. K. (2011).** The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Seed Science Research*, 21 (03), 165-173.
- Ibrahim, R. K., Bruneau, A., Bantignies, B. (1998).** Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant molecular biology*, 36 (1), 1-10.
- Inoue, K., Sewalt, V. J., Ballance, G. M., Ni, W., Stürzer, C., Dixon, R. A. (1998).** Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification. *Plant physiology*, 117 (3), 761-770.
- Iriondo Alegría, J. M. (2001).** Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). *Investigación Agropecuaria: Producción y Protección Vegetal*, 16 (1), 5-24.



**Isokpehi, R. D., Simmons, S. S., Cohly, H. H., Ekunwe, S. I., Begonia, G. B., Ayensu, W. K. (2011).** Identification of drought-responsive universal stress proteins in viridiplantae. *Bioinformatics and biology insights*, 5, 41-58.

**ISTA (International Seed Testing Association). (2011).** International rules for seed testing: edition 2011/. Basserdorf, Switzerland: International Seed Testing Association.

**Jain, N., Koopar, R., Saxena, S. (2006).** Effect of accelerated ageing on radish (*Raphanus sativus* L.). *Asian Journal of Plant Sciences*, 461-464.

**Jay, J. T., Jan, A. M. (2012).** The proteomic future: where mass spectrometry should be taking us. *Biochemical Journal*, 444(2), 169-181.

**Jensen, O.N. (2000).** Modification-specific proteomics: strategies for systematic studies of post-translationally modified proteins. in *Proteomics: A Trends Guide* (eds. Blackstock, W & Mann, M.) 36-42 (Elsevier Science, London).

**Jianhua, Z., McDonald, M. B. (1997).** The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. *Seed science and technology*, 25 (1), 123-131.

**Jungblut, P. R., Holzhutter, H. G., Apweiler, R., Schluter, H. (2008).** The speciation of the proteome. *Chemistry Central Journal*, 2(16), 1-10.

**Kalemba, E. M., Pukacka, S. (2014).** Carbonylated proteins accumulated as vitality decreases during long-term storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Trees*, 28(2), 503-515.

**Katagiri, T., Ishiyama, K., Kato, T., Tabata, S., Kobayashi, M., Shinozaki, K. (2005).** An important role of phosphatidic acid in ABA signaling during germination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 43 (1), 107-117.

**Kehrer, J. P. (2000).** Reductive stress. In G. Fink, *Encyclopedia of stress* (Vol. 3). USA: Academic Press.

**Khan, M. F., Bennett, M. J., Jumper, C. C., Percy, A. J., Silva, L. P., Schriemer, D. C. (2011).** Proteomics by mass spectrometry. Go big or go home?. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 55(4), 832-841.

**Kim, J. S., Kim, K. A., Oh, T. R., Park, C. M., Kang, H. (2008).** Functional characterization of DEAD-box RNA helicases in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant and cell physiology*, 49 (10), 1563-1571.

**Kim, S. T., Wang, Y., Kang, S. Y., Kim, S. G., Rakwal, R., Kim, Y. C., Kang, K. Y. (2009).** Developing rice embryo proteomics reveals essential role for embryonic proteins in regulation of seed germination. *Journal of proteome research*, 8 (7), 3598-3605.

**Kingston, R.E., Narlikar, G.J. (1999).** ATP dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes & development*, 13 (18), 2339-2352.

**Klose, J. (2009).** From 2-D electrophoresis to proteomics. *Electrophoresis*, 30 (S1), S142-S149.

**Konopka-Postupolska, D., Clark, G., Goch, G., Debski, J., Floras, K., Cantero, A., Fijolek, B., Roux, S., Hennig J. (2009).** The role of Annexin 1 in drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 150, 1394-1410.

- Kranner, I., Birtic, S., Anderson, K. M., Pritchard, H. W. (2006).** Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death?. *Free Radical Biology and Medicine*, 40 (12), 2155-2165.
- Krishna, R. G., Wold, F. (1993).** Post-translational modifications of proteins. In *Methods in Protein Sequence Analysis* (pp. 167-172). Springer US.
- Kroeger, T.S., Watkins K. P., Klaas G. F. Wijk J. van, Barkan A. (2009).** A plant specific RNA binding domain revealed through analysis of chloroplast group II intron splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (11), 4537–4542.
- Kwak, K. J., Kim, J. Y., Kim, Y. O., Kang, H. (2007).** Characterization of transgenic Arabidopsis plants overexpressing high mobility group B proteins under high salinity, drought or cold stress. *Plant and cell physiology*, 48 (2), 221-231.
- Lam, K. C., Ibrahim, R. K., Behdad, B., Dayanandan, S. (2007).** Structure, function, and evolution of plant O-methyltransferases. *Genome*, 50 (11), 1001-1013.
- Laux, T., Goldberg, R. B. (1991).** A plant DNA binding protein shares highly conserved sequence motifs with HMG-box proteins. *Nucleic acids research*, 19 (17), 4769-4769.
- Leprince, O., Vertucci, C. W., Hendry, G. A., Atherton, N. M. (1995).** The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature. *Physiologia Plantarum*, 94 (2), 233-240.
- Li, Z., Srivastava, P. (2004).** Heat-Shock Proteins. *Current Protocols in Immunology*. 58, 1-6.
- Lichota, J., Grasser, K. D. (2001).** Differential chromatin association and nucleosome binding of the maize HMGA, HMGB, and SSRP1 proteins. *Biochemistry*, 40 (26), 7860-7867.
- Lingaraj, T., Donovan, J., Li, Z., Li, P., Doucette, A., Harrison, S., Zhang, W. (2008).** A high-throughput liposome substrate assay with automated lipid extraction process for PI 3-kinase. *Journal of biomolecular screening*, 13, 906–911
- Lowenson, J. D., Clarke, S. (1992).** Recognition of D-aspartyl residues in polypeptides by the erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (9), 5985-5995.
- Ludewig, F., Hüser, A., Fromm, H., Beauclair, L., Bouché, N., Grebe, M. (2008).** Mutants of GABA transaminase (POP2) suppress the severe phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase (ssadh) mutants in Arabidopsis. *PLoS One*, 3 (10), e3383.
- Madruga de Tunes, L., Cardoso Pedroso, D., Banidelli, P., Ciciliano Tavares, L., De Araújo, C. R., Barros, A. C. S. A., Muniz, M. F. B. (2011).** Accelerated again of ryegrass seeds submitted to saturated salt solution. *Ciencia Rural*, 41 (1), 33-37.
- Mann, M., Jensen, O. N. (2003).** Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology*, 21 (3), 255-261.
- Maqbool, A., Zahur, M., Husnain, T., Riazuddin, S. (2009).** GUSP1 and GUSP2, two drought-responsive genes in *Gossypium arboreum* have homology to universal stress proteins. *Plant molecular biology reporter*, 27 (1), 109-114.

**Márquez Guzmán, J., Collazo Ortega, M., Martínez Gordillo, M., Orozco Segovia, A., Vázquez Santana, S. (2013).** Biología de angiospermas. México: UNAM, Facultad de Ciencias: Coordinación de la Investigación Científica.

**Martin, D. M., Fäldt, J., Bohlmann, J. (2004).** Functional characterization of nine Norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant Physiology*, 135 (4), 1908-1927.

**Maury, S., Geoffroy, P., Legrand, M., (1999).** Tobacco O-methyl transferases involved in phenylpropanoid metabolism: the different CCoAOMT and COMT classes have distinct substrate specificities and expression patterns. *Plant Physiology*, 121, 215–224.

**McDonald, M. B. (1999).** Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and technology*, 27 (1), 177-237.

**Melo, V., Cuamatzi O. (2008).** Bioquímica de los Procesos Metabólicos. (pp. 406). (Ed). Reverté.

**Méndez E., C., Sánchez M., V. (2012).** Descriptores morfológicos de *Cedrela odorata* L. para México. D.F., México: Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

**Mercke, P., Kappers, I. F., Verstappen, F. W., Vorst, O., Dicke, M., Bouwmeester, H. J. (2004).** Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants. *Plant Physiology*, 135(4), 2012-2024.

**Miernyk, J. A. (2014).** Seed proteomics. *Methods in Molecular Biology*, 1072, 361-377.

**Miernyk, J. A., Hajduch, M. (2011).** Seed proteomics. *Journal Proteomics*, 74 (1), 389-400.

**Miller, K. R., Reid, W. V., Mittermeier, R. A., Werner, T. B. (1990).** Conserving the world's biological diversity. (pp. 193)Gland: International Union for conservation of nature and natural resources.

**Moreno, M. E. (1984).** Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. (3Eds.). UNAM.

**Mudgett, M. B., Lowenson, J. D. Clarke, S. (1997).** Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in plants (phylogenetic distribution and the accumulation of substrate proteins in aged barley seeds). *Plant physiology*, 115 (4), 1481-1489.

**Murata, N., Sato, N. Takahashi, N. (1984)** Very-long-chain saturated fatty acids in phosphatidylserine from higher plant tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 795, 147–150.

**Nonogaki, H., Bassell, G. W., Bewley, D. J. (2010).** Germination - Still a mystery. *Plant Science*, 179 (6), 574-581.

**Noodén, L. D., Leopold, A. C. (1988).** Senescence and Aging in Plants. San Diego, California, USA: Elsevier.

**Nyström, T., Neidhardt, F.C. (1992).** Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 6, 3187–3198.

**Nyström, T., Neidhardt, F.C. (1993).** Isolation and properties of a mutant of *Escherichia coli* with an insertional inactivation of the *uspA* gene, which encodes a universal stress protein. *Journal of bacteriology*, 175, 3949–3956.

**Nyström, T., Neidhardt, F. C. (1994).** Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Molecular Microbiology*, 11 (3), 537-544.

**Nyström, T., Neidhardt, F.C. (1996).** Effects of overproducing the universal stress protein UspA, in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 178, 927-930.

**Nyström, T., Neidhardt, F.C. (1996).** Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Molecular Microbiology*. 11, 537-544.

**O'Farrell, P. (1975).** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250 (10), 4007-4021.

**Ogas, J., Kaufmann, S., Henderson, J., Somerville, C. (1999).** PICKLE is a CHD3 chromatin remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (24), 13839-13844.

**Ogé, L., Bourdais, G., Bove, J., Collet, B., Godin, B., Granier, F., Grappin, P. (2008).** Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase1 is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 20 (11), 3022-3037.

**Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., Anthony, S. (2009).** Agroforestry Database: a tree reference and selection guide. Retrieved 2014, from <http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>.

**Pammenter, N. W., Berjak, P. (1999).** A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research*, 9 (1), 13-37.

**Parrish, D. J., Leopold, C. (1978).** On the mechanism of aging in soybean seeds. *Plant Physiology*, 61 (3), 365-368.

**Patiño, F., De la Garza, P., Villagómez, A., Talavera, A., Camacho, M. (1983).** Guía para la recolección y manejo de semillas forestales. (63) . D.F., México: Instituto Nacional de Investigación Forestal.

**Patiño, V. F. 1997.** Genetic resources of *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata* in the neotropics: Priorities for coordinated actions. *Forest Genetic Resources*. No. 25. FAO, Roma. 12 p.

**Paula, R. (2004).** Alteraciones bioquímicas en semillas envejecidas de girasol (*H. annuus* L.) relacionadas con la viabilidad, funcionalidad de membranas y cambios asociados con la capacidad antioxidante. Tesis doctoral, departamento de bioquímica y biología molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutenses de Madrid, Madrid.

**Pechous, S. W., Whitaker, B. D. (2004).** Cloning and functional expression of an (E, E)- $\alpha$ -farnesene synthase cDNA from peel tissue of apple fruit. *Planta*, 219 (1), 84-94.

**Pedroso, D. C., Tunes, L. M., Barbieri, A. P., Barros, A. C. S. A., Muniz, M. F. B., Menezes, V. O. (2010).** Envelhecimento acelerado em sementes de trigo. *Ciência Rural*, 40 (11), 2389-2392.

**Pence, V. (1999).** The Application of Biotechnology for the Conservation of Endangered Plants. In: Benson, E. (Ed.). *Plant Conservation Biotechnology* (227-250). London: Taylor & Francis.

**Pennington, T.D. Sarukhán, J. (2005).** Árboles tropicales de México: Manual de identificación de las principales especies. (3ª Ed.). México: Fondo de cultura económica.

**Pernía, B., De Sousa, A., Reyes, R., Castrillo, M. (2008).** Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 33(2), 112-119.

**Phillips, M. A., Wildung, M. R., Williams, D. C., Hyatt, D. C., Croteau, R. (2003).** cDNA isolation, functional expression, and characterization of (1)-apinene synthase and (2)-a-pinene synthase from loblolly pine (*Pinus taeda*): stereocontrol in pinene biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 411, 267–276.

**Pichardo González, J. M., Ayala Garay, Ó. J., González Hernández, V. A., Flores Ortiz, C. M., Carrillo Salazar, J. A., Peña Lomelí, A., Robledo, P. A., Garcia, de los S. G. (2010).** Calidad fisiológica, ácidos grasos y respiración en semillas de tomate de cáscara deterioradas artificialmente. *Revista fitotecnia mexicana*, 33(3), 231-238.

**Pillay, D. T. N. (1977).** Protein synthesis in aging soybean cotyledons loss in translational capacity. *Biochemical and biophysical research communications*, 79(3), 796-804.

**Prieto-Dapena, P., Castaño, R., Almoguera, C., Jordano, J. (2006).** Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiology*, 142 (3), 1102-1112.

**Pukacka, S., Ratajczak, E. (2005).** Production and scavenging of reactive oxygen species in *Fagus sylvatica* seeds during storage at varied temperature and humidity. *Journal of Plant Physiology*, 162 (8), 873-885.

**Queitsch, C., Hong, S. W., Vierling, E., Lindquist, S. (2000).** Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 12 (4), 479-492.

**Rabilloud, T. (2002).** Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2 (1), 3-10.

**Rabilloud, T. (2009).** Membrane proteins and proteomics: love is possible, but so difficult. *Electrophoresis*, 30 (S1), S174-S180.

**Rajjou, L., Debeaujon, I. (2008).** Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies*, 331 (10), 796-805.

**Rajjou, L., Lovigny, Y., Groot, S. P., Belghazi, M., Job, C., Job, D. (2008).** Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiology*, 148 (1), 620-641.

**Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., Job, D. (2012).** Seed, germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 507-533.

**Rao N. K., Roberts, E. H., Ellis, R. H. (1987).** The influence of pre and post-storage hydration treatments on chromosomal aberrations, seedling abnormalities, and viability of lettuce seeds. *Annals of Botany*, 60, 97–108.

**Rao, N.K., J. Hanson, M.E. Dulloo, K. Ghosh, D. Novell M. Larinde. (2007).** Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioversity International, Roma, Italia.

**Reid, W. V., Miller, K. R. (1989).** Keeping options alive. The scientific basis for conserving biodiversity. USA, Washington, DC.: World Resources Institute.

**Reissner, K. J., Aswad, D. W. (2003).** Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals?. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60 (7), 1281-1295.

**Reyes, J. C., Hennig, L., Gruissem, W. (2002).** Chromatin-remodeling and memory factors. New regulators of plant development. *Plant Physiology*, 130 (3), 1090-1101.

**Ritt, C., Grimm, R., Fernández, S., Alonso, J. C., Grasser, K. D. (1998).** Four differently chromatin-associated maize HMG domain proteins modulate DNA structure and act as architectural elements in nucleoprotein complexes. *Plant journal*, 14 (5), 623-632.

**Roqueiro, G., Facorro, G. B., Huarte, M. G., De Celis, E. R., García, F., Maldonado, S., Maroder, H. (2010).** Effects of photooxidation on membrane integrity in *Salix nigra* seeds. *Annals of Botany*, 66 (1), 37-46.

**Rose, J. K., Bashir, S., Giovannoni, J. J., Jahn, M. M., Saravanan, R. S. (2004).** Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *The plant journal*, 39 (5), 715-733.

**Rosa, M., Von Harder, M., Cigliano, R. A., Schlögelhofer, P., Scheid, O. M. (2013).** The Arabidopsis SWR1 chromatin-remodeling complex is important for DNA repair, somatic recombination, and meiosis. *The Plant Cell*, 25 (6), 1990-2001.

**Rossetton, C. A., Filho, M. J. (1995).** Comparison between accelerated aging and controlled deterioration methods to evaluate seed physiological quality of soybean. *Scientia Agricola*, 52 (1), 123-131.

**Rupasinghe, H. V., Paliyath, G., Murr, D. P. (2000).** Sesquiterpene  $\alpha$ -farnesene synthase: partial purification, characterization, and activity in relation to superficial scald development in apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125 (1), 111-119.

**Salazar, R., Roker, D., Schmidt, L. (2000).** *Cedrela odorata* L. (Seed leaflet). Retrieved Marzo 20, 2014, from <http://sl.ku.dk/rapporter/seed-leaflets/filer/cedrela-odorata-20.pdf>.

**Salinas, A. R., Yoldjian, A. M., Dietrich, M. L., Craviotto, R. M., Bisaro, V. (2002).** Glycinin b-conglycinin and  $\alpha$ -amylase behaviour in artificially deteriorated and not deteriorated soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37 (8), 1175-1181.

**Samarah, N. H., Al-Kofani, S. (2008).** Relationship of seed quality tests to field emergence of artificial aged barley seeds in the semiarid mediterranean region. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4 (3), 217-230.

**Sánchez Monsalvo, V., Salazar García, G. J., Vargas Hernández, J., López Upton, J., Jasso Mata, J. (2003).** Parámetros genéticos y respuesta a la selección en características del crecimiento de *Cedrela odorata* L. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26 (1), 19-27.

**Santos, J. F., Sanches, M. F. G., Barbosa, M., Leao, E. F., Vieira, R. D. (2012).** Optimising tetrazolium test procedures to evaluate the physiological potential of peanut seeds. *Seed Science and Technology*, 40(2), 215-228

**Sauter, M., Rzewuski, G., Marwedel, T., Lorbiecke, R. (2002).** The novel ethylene-regulated gene OsUsp1 from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. *Journal of experimental botany*, 53 (379), 2325-2331

**Schuster, A. M., Davies, E., (1983).** Ribonucleic acid and protein metabolism in pea epicotyls: II. Response to wounding in aged tissue. *Plant Physiology*, (73) 3, 817–821.

**Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2010).** Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. NOM-059-SEMARNAT-2010. México, D.F., 30 de diciembre de 2010

**Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2014).** Precio Medio de Productos Maderables y No Maderables. Anuario Estadístico de la Producción Forestal 2013.

**Sheoran, I. S., Olson, D. J., Ross, A. R., Sawhney, V. K. (2005).** Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. *Proteomics*, 5 (14), 3752-3764.

**Shibata, M., Medeiros Coelho, C. M., De Oliveira, L. M., Guidolin, A. F. (2011).** Methodological standardization for determination of seed storage protein of *Handroanthus albus* (Chamiso). *Revista de Ciencias Agroveterinarias*, 10 (2), 151-157.

**Shibata, M., Medeiros Coelho, C., Magda de Oliveira, L., Garcia, C. (2012).** Accelerated aging of ipe seeds under controlled conditions of storage. *Revista Brasileira de Sementes*, 34 (2), 247-254.

**Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007).** Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58, 221–227.

**Sierra, J. O. (2005).** Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros. (2 ed.). Colombia: Universidad de Antioquia.

**Sies, H. (1997).** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82 (2), 291-295.

**Sistema de Informacion para la Reforestacion (SIRE). (2012).** Re: *Cedrela odorata*. Paquetes Tecnológicos. Recuperado de: <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/898Cedrela%20odorata.pdf>

**Smith, M. T., Berjak, P. (1995).** Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In J. Kigel, & G. Galili, *Seed Development and Germination* (pp. 701-746). New York, USA: Marcel Dekker, Inc. .

**Soskic, V., Görlach, M., Poznanovic, S., Boehmer, F. D., Godovac-Zimmermann, J. (1999).** Functional proteomics analysis of signal transduction pathways of the platelet-derived growth factor  $\beta$  receptor. *Biochemistry*, 38 (6), 1757-1764.

**Stensballe, A., Andersen, S. Jensen, O.N. (2001).** Characterization of phosphoproteins from electrophoretic gels by nanoscale Fe(rn) affinity chromatography with off-line mass spectrometry analysis. *Proteomics*, 1 (2), 207-222.

**Sullivan, J. A., Deng, X. W. (2003).** From seed to seed: the role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Developmental biology*, 260 (2), 289-297.

**Sun, W., Bernard, C., Van De Cotte, B., Van Montagu, M., Verbruggen, N. (2001).** At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression. *The Plant Journal*, 27(5), 407-415.

**Sun, W., Van Montagu, M., Verbruggen, N. (2002).** Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochemical et Biophysica Act (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1577 (1), 1-9.

**Tang, D., Kang, R., Zeh III, H. J., Lotze, M. T. (2011).** High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxidants & redox signaling*, 14 (7), 1315-1335.

**Tommasi, F., Paciolla, C., Arrigoni, O. (1999).** The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. *Physiologia Plantarum*, 105 (2), 193-198.

**Tsugita, A., Kamo, M. (1999).** 2-D electrophoresis of plant proteins. *Methods in Molecular Biology*, 112, 95-97.

**Tuteja, N. (2003).** Plant DNA helicases: the long unwinding road\*. *Journal of experimental botany*, 54 (391), 2201-2214.

**Tyers, M., Jorgensen, P. (2000).** Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10, 54-64

**Umate, P., Tuteja, R., Tuteja, N. (2010).** Genome-wide analysis of helicase gene family from rice and Arabidopsis: a comparison with yeast and human. *Plant molecular biology*, 73 (4-5), 449-465.

**Urnov, F.D., Wolffe, A.P. (2001).** Chromatin remodeling and transcriptional activation: the cast (in order of appearance). *Oncogene*, 20, 2991-3006.

**Vázquez-Yanes, C., Orozco, A., Rojas, M., Sánchez, M. E., Cervantes, V. (1997).** La reproducción de las plantas: semillas y meristemas. D.F. México: Fondo de Cultura Económica.

**Vázquez-Yanes, C., A. I. Batis M., M. I. Alcocer S., M. Gual D., Sánchez D. (1999).** Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Reporte técnico del proyecto J084. CONABIO - Instituto de Ecología, UNAM.

**Ventura, L., Dona, M., Macovei, A., Carbonera, D., Buttafava, A., Mondoni, A., Rossi, G., Balestrazzi, A. (2012).** Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 196-206.

**Wang, Y., Duby, G., Purnelle, B., Boutry, M. (2000).** Tobacco VDL gene encodes a plastid DEAD box RNA helicase and is involved in chloroplast differentiation and plant morphogenesis. *The Plant Cell*, 12 (11), 2129-2142.

**Waters, E. R., Lee, G. J., Vierling, E. (1996).** Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 47 (3), 325-338.

**Watkinson, J., Sioson, A, Vasquez-Robinet, C, Shukla, M, Kumar, D, Ellis, M, Heath, LS, Ramakrishnan, N, Chevone, B, Watson, LT, Can Zyl, L., Egertsdotter, U., Sederoff, R., Grene, R.(2003).** Photosynthetic acclimation is reflected in specific patterns of gene expression in drought-stressed loblolly pine. *Plant Physiology*, 133, 1702-1716.



**Webster, C. I., Packman, L. C., Pwee, K. H., Gray, J. C. (1997).** High mobility group proteins HMG-1 and HMG-I/Y bind to a positive regulatory region of the pea plastocyanin gene promoter. *The Plant Journal*, 11(4), 703-715.

**Weitbrecht, K., Muller, K., Leubner-Metzger, G. (2011).** First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 62 (10), 3289-3309.

**Werner, E. T., Lopes, J. C., Gomes Junior, D., Lubner, J., Teixeira do Amaral, J. A. (2013).** Accelerated aging test to evaluate the quality of crambe (*Crambe abyssinica* Host-Brassicaceae) seed physiology. *IDESIA*, 31 (1), 35-43.

**Wettlaufer, S. H., Leopold, A. C. (1991).** Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. *Plant Physiology*, 97 (1), 165-169.

**Wilkins, M.R., Gooley, A. A. (1997).** Protein Identification in Proteome Projects. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag.

**Wu, Q., Zhang, W., Pwee, K. H., Kumar, P. P. (2003).** Cloning and characterization of rice HMGB1 gene. *Gene*, 312, 103-109.

**Wu, X., Liu, H., Wang, W., Chen, S., Hu, X., Li, C. (2011).** Proteomic analysis of seed viability in maize. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 181-191.

**Xin, X., Lin, X. H., Zhou, Y. C., Chen, X. L., Liu, X., Lu, X. X. (2011).** Proteome analysis of maize seeds: the effect to artificial ageing. *Physiologia Plantarum*, 143 (2), 126-138.

**Xue, H., Chen, X., Mei, Y. (2009).** Function and regulation of phospholipid signalling in plants. *Biochemical Journal*, 421, 145-156.

**Yacoubi, R., Job, C., Belghazi, M., Chaibi, W., Job, D. (2011).** Toward characterizing seed vigor in alfalfa through proteomic analysis of germination and priming. *Journal of proteome research*, 10 (9), 3891-3903.

**Yao, Z., Liu, L., Gao, F., Rampitsch, C., Reinecke, D. M., Ozga, J. A., Ayele, B. T. (2012).** Developmental and seed aging mediated regulation of antioxidative genes and differential expression of proteins during pre-and post-germinative phases in pea. *Journal of plant physiology*, 169 (15), 1477-1488.

## Apéndices

### Envejecimiento acelerado

#### **Cloruro de litio al 95%**

8 g de cloruro de litio grado biología molecular

200 mL de agua bidestilada

Se prepararon 2 L de solución

#### **Cloruro de litio al 75%**

47 g de cloruro de litio grado biología molecular

200 mL de agua bidestilada

Se prepararon 2 L de solución

### Prueba del tetrazolio

#### **Solución 1**

9.078 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1 L

#### **Solución 2**

11.876 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  EN 1 L

#### **Solución de tetrazolio al 1%; pH 7.0**

40 mL de solución 1

60 mL de solución 2

1 g de sal de tetrazolio

## Extracción de proteínas

### **Amortiguador IEF**

Urea 8 M

Tiourea 2 M

CHAPS 4%

Tritón X-100 2%

DTT 50 mM

### **Amortiguador de extracción de proteínas**

TRIS-HCl 100 mM, pH 8.8

EDTA 10 mM, pH 8.5

Sacarosa 900 mM

$\beta$ -mercaptoetanol 0.4%

### **Inhibidores de fosfatasas**

Agregar en el momento de la preparación

Vanadato de sodio 0.5 mM

Fluoruro de sodio NaF 5 mM

Glicerofosfato di sódica 15 mM

### **Fenol equilibrado a pH 8.8**

Fenol 500 g

700 ml TRIS-HCl 1M, pH 8.8

Hacer lavados (de 3 a 5) con TRIS-HCl 100 mM, pH 8.8

### **Acetato de amonio/metanol**

Acetato de amonio 100 mM

Metanol 100%

**Acetona al 80%**

80 mL de acetona grado biología molecular

20 mL de agua bidestilada.

**Etanol al 70%**

70 mL de etanol grado biología molecular

30 mL de agua bidestilada.

**Soluciones y Buffers para SDS-PAGE****Amortiguador I: Acrilamida (29.2:0.8)**

29.2 g Acrilamida

0.8 g Bisacrilamida

**Amortiguador II**

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

SDS 20 %

**Amortiguador III**

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

SDS 20 %

### Geles de 6x 8 cm

#### Gel separador (12%)

1.75 mL H<sub>2</sub>O bidestilada

1.25 mL amortiguador II

2 mL Acrilamida

3.125 µL TEMED

31.25 µL APS 10%

#### Gel concentrador

1.25 mL H<sub>2</sub>O bidestilada

555 µL amortiguador III

375 µL Acrilamida

2.5 µL TEMED

25 µL APS 10%

### Geles 16x 18 cm

#### Gel separador (12%)

12.25 mL H<sub>2</sub>O bidestilada

8.75 mL amortiguador II

14 mL Acrilamida

22.15 µL TEMED

0.221 µL APS 10%

#### Gel concentrador

2.0 mL H<sub>2</sub>O bidestilada

0.890 µL amortiguador III

600 µL Acrilamida

9.5 µL TEMED

95 µL APS 10%

### Amortiguador de corrida 10X

Tris 30.32 g

Glicina 144 g

SDS 10 g

Se disolvió en agua bidestilada y se aforó a un litro.

**Amortiguador de equilibrio SDS**

TRIS-HCl 50 mM, pH 8.8

Urea 6 M

Glicerol 30%

SDS 4%

**Solución reductora**

DDT al 2% en amortiguador de equilibrio SDS

**Solución de alquilación**

Iodoacetamida al 2.5% en amortiguador de equilibrio SDS

**Solución de agarosa para sellado**

Agarosa 125 mg en amortiguador de corrida 1X

**Amortiguador de carga 6X**

Tris-HCl, 60 mM, pH 6.8

SDS 2%

Glicerol 10%

Azul de bromofenol 0.01%

**Coomassie coloidal G-250**

800 mL Etanol absoluto

3.2 g Azul brillante G-250

64 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

320 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>

## ANEXOS

### Anexo I

#### Determinación del G50

Es una prueba usada en los bancos de germoplasma para estimar la vida media de un lote que se pretende conservar. Para este fin se transforman los valores del porcentaje de germinación a valores PROBIT, que son una desviación estándar de la distribución normal de semillas muertas en tiempo. Esta transformación se llevó a cabo considerando los valores de germinación del envejecimiento acelerado.

Tabla 7. Transformación de los datos a valores PROBIT

| Muestras       | % de G | PROBIT |
|----------------|--------|--------|
| <b>Control</b> | 91.3   | 6.4    |
| <b>1</b>       | 87.5   | 6.2    |
| <b>2</b>       | 87.5   | 6.2    |
| <b>3</b>       | 83.75  | 6.0    |
| <b>4</b>       | 80.0   | 5.8    |
| <b>5</b>       | 81.3   | 5.9    |
| <b>6</b>       | 45.0   | 4.9    |
| <b>7</b>       | 32.5   | 4.5    |
| <b>8</b>       | 43.2   | 4.8    |
| <b>9</b>       | 11.6   | 3.8    |
| <b>10</b>      | 22.2   | 4.2    |
| <b>11</b>      | 0.0    | 0.0    |

Estos valores transformados se grafican para obtener la ecuación de la recta y poder determinar el valor G50.

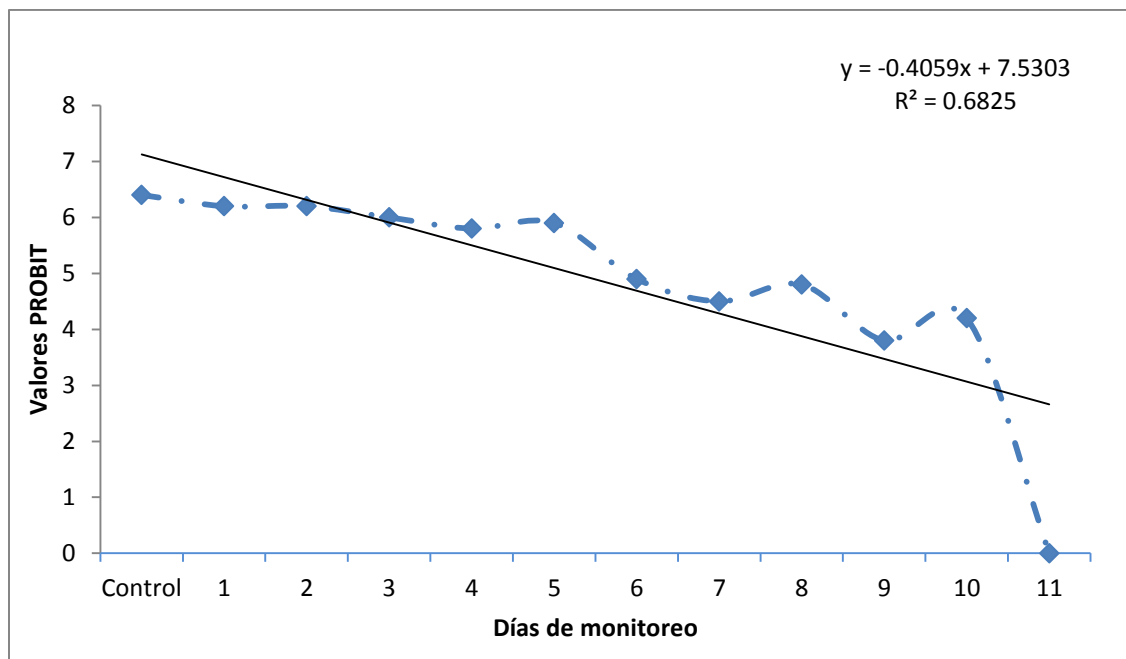


Figura 15. Valores del PROBIT gráficos para obtener la ecuación de la recta.

La ecuación de la recta fue:

$$Y = -0.4059x + 7.5303$$

Despejando y sustituyendo valores para conocer los días necesarios para el envejecimiento.

$$G50 = \frac{5 - 7.5303}{0.4059}$$

$$G50 = 6.2$$

Por lo tanto el valor estimado en el que la germinación será del 50% es de 6.2 días.



## Anexo II

### Prueba de viabilidad del tetrazolio

Es una prueba topográfica en la cual las semillas son colocadas en una solución de sal de cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio, el cual es un indicador de varios procesos de reducción que ocurren en las células vivas presentes en los tejidos de las semillas (ISTA, 2011).

Esta reacción lleva a cabo una reacción de óxido-reducción, en la cual participan las enzimas deshidrogenasa puesto que se liberan protones hidrógeno liberados en el proceso de respiración, los cuales al entrar en contacto con la sal de tetrazolio se reduce a formazan (Giraldo, et. al., 2000). El formazan es una sustancia estable que tiñe el tejido vivo de coloración rojiza.

Es una prueba de gran utilidad en el control de calidad, que estima la viabilidad, el vigor, los daños por calor, daños físicos. Requiere una inversión mínima de equipo y es relativamente rápida (ISTA, 2011; Giraldo, et. al., 2000).

Es una prueba de gran utilidad en el control de calidad, es una prueba relativamente rápida y requiere una inversión mínima de equipo. La prueba de tetrazolio, puede estimar la viabilidad, el vigor, los daños por calor, daños físicos durante la trilla, y puede utilizarse para solucionar problemas urgentes (Benito, et. al., 2004).

#### Metodología:

Las semillas secas (control, G 50% y G menos 15%) fueron sumergidas en agua destilada por 24 horas. Transcurrido ese tiempo se les realizó un corte transversal con bisturí para separar las cubiertas y el tejido de reserva y se extrajo el embrión completo. Completada la separación se colocaron en un tubo de ensayo y se colocó solución de 2, 3, 5 cloruro de trifetil tetrazolio (Merck) al 1%, que cubriera en su totalidad las semillas. Se trataron durante 1.5 h en incubación de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  y en oscuridad. Después de la incubación se dejaron enfriar y se observaron en el microscopio estereoscópico (Carl Zeiss).

Para la interpretación de los resultados se considera tejido viable si más de tres partes del tejido presentan coloración rosa intenso, en caso de presentar una coloración demasiado intensa indica que el tejido está muerto. Si los puntos de unión entre el eje embrionario y el cotiledón están de color rojo claro o blanco indica que la semilla no podrá germinar ya que el tejido no es viable. En el caso de los círculos verdes presentes en las imágenes muestran aquellos lugares que se consideran como tejido muerto debido a la falta de coloración.

NOTA: Los círculos verdes en las imágenes de los embriones y cubiertas teñidos son las zonas de interés (unión de cotiledón con eje embrionario, punta del eje embrionario o cubierta) que no presentan una coloración rojiza o se encuentran sobre teñidos y por lo tanto hacen supones que los embriones son inviables a pesar de tener otras zonas teñidas.

Control

Figura 16. Semillas y cubiertas teñidas con sal de tetrazolio (control).

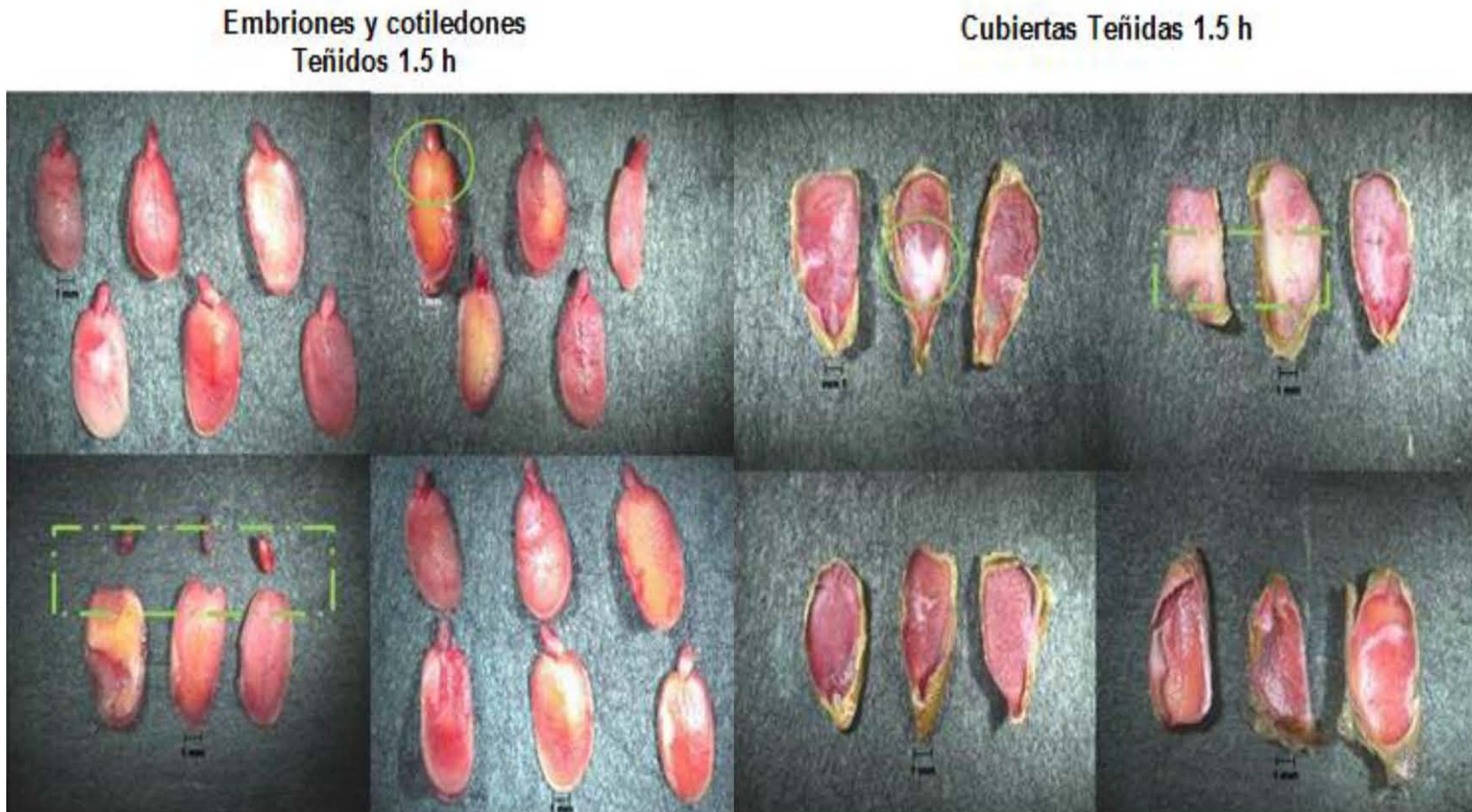
**Embriones y cotiledones**  
**Teñidos 1.5 h**

**Cubiertas teñidas 1.5 h**



T 6.2

Figura 17. Semillas y cubiertas teñidas con sal de tetrazolio (T6.2).



T 10

Figura 18. Semillas y cubiertas teñidas con sal de tetrazolio (T10).

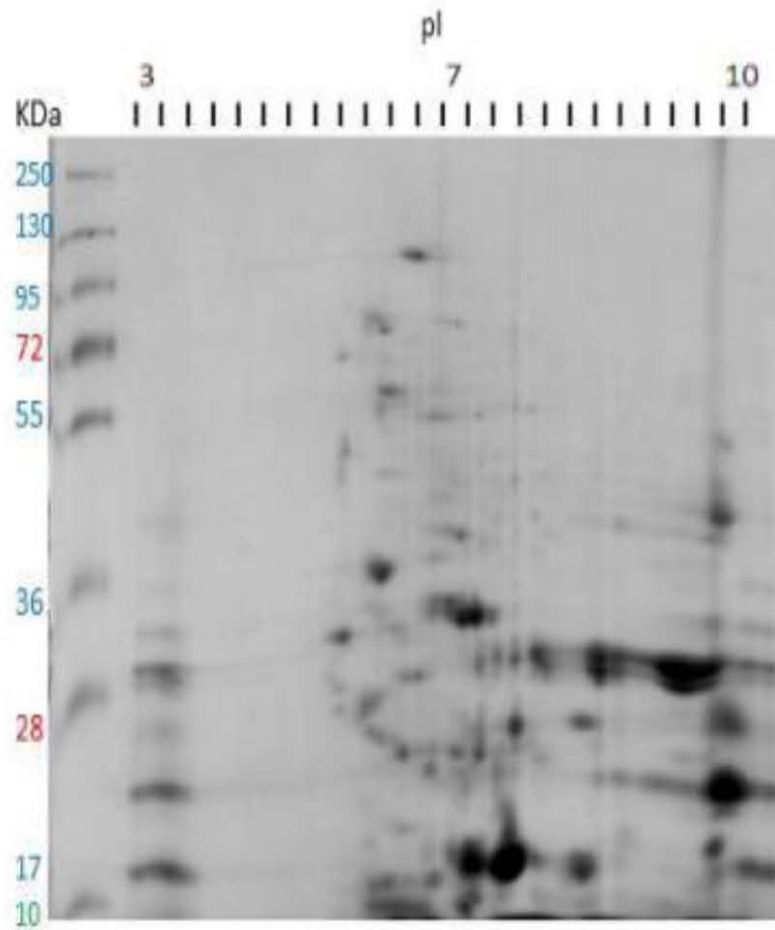
Embriones y cotiledones  
Teñidos 1.5 h

Cubiertas teñidas 1.5 h

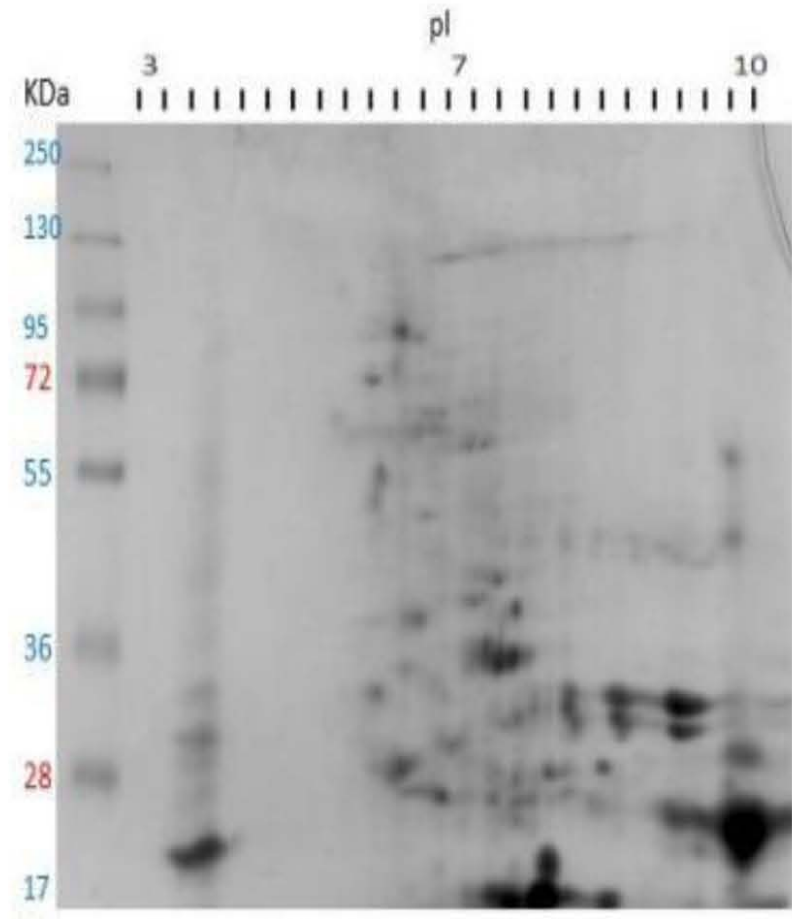


### Anexo III

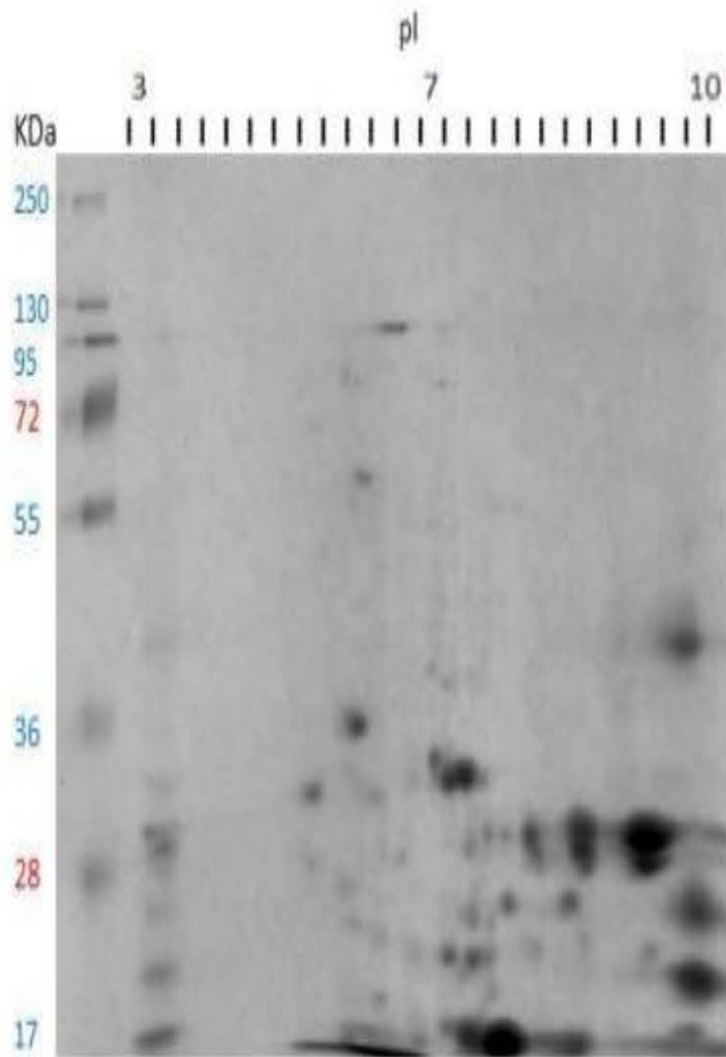
Figura 19. Imágenes usadas para el análisis de la condición control o T0 con el software LUDESI REDFIN 3 (cuatro replicas).



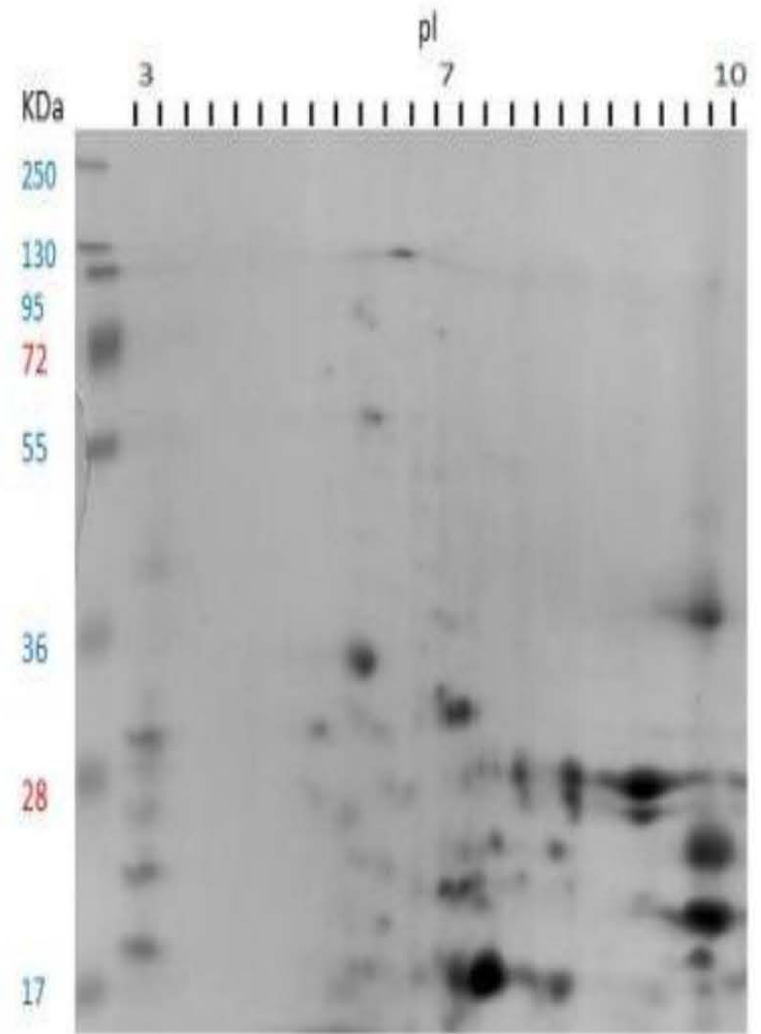
Primera réplica



Segunda réplica

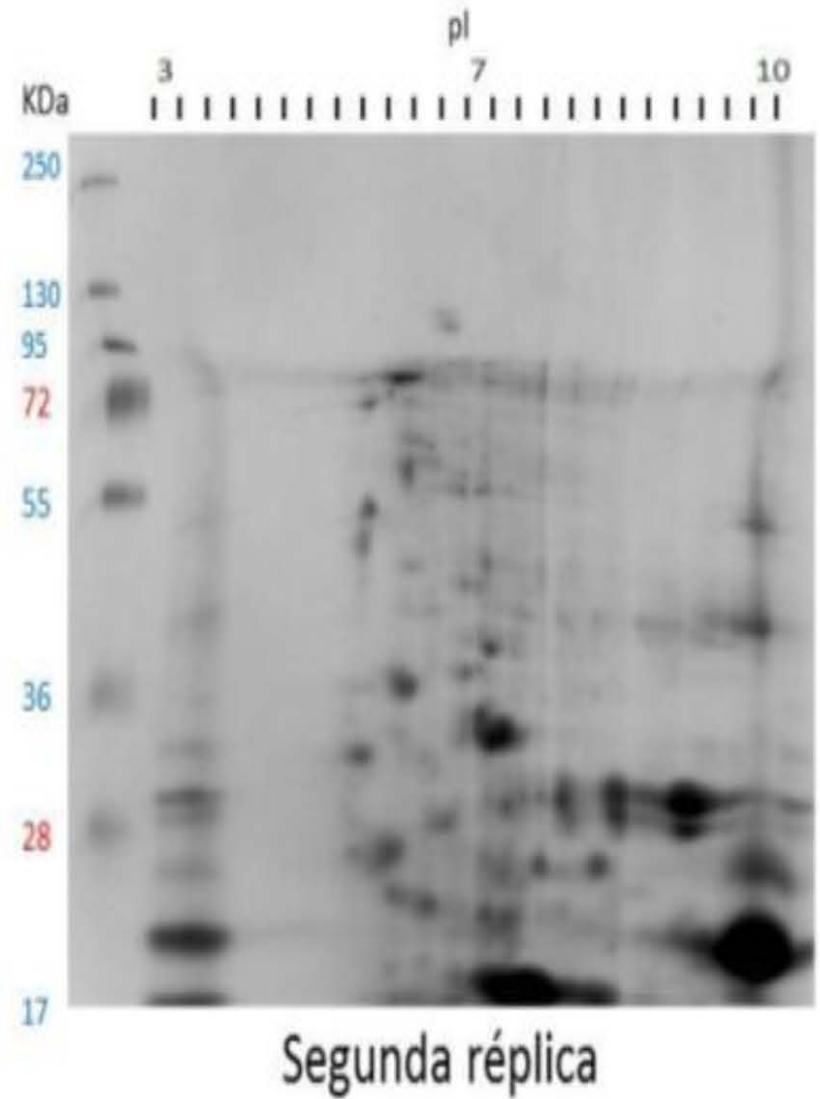
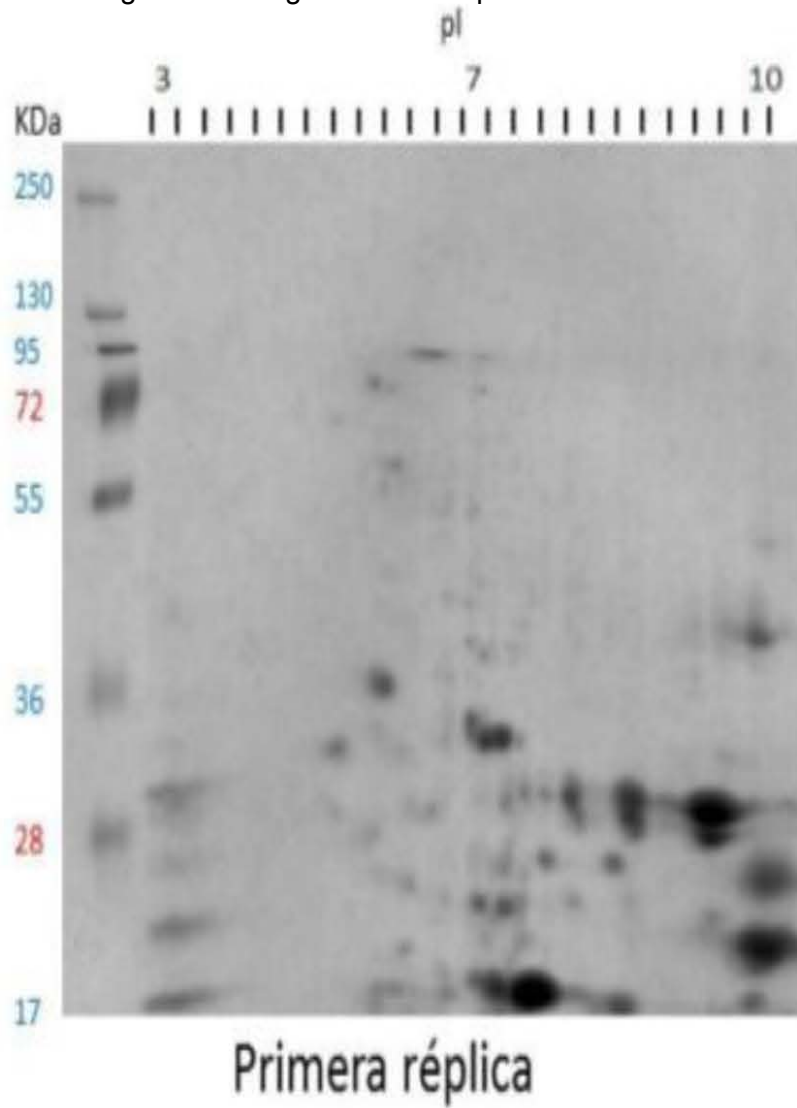


Tercera réplica

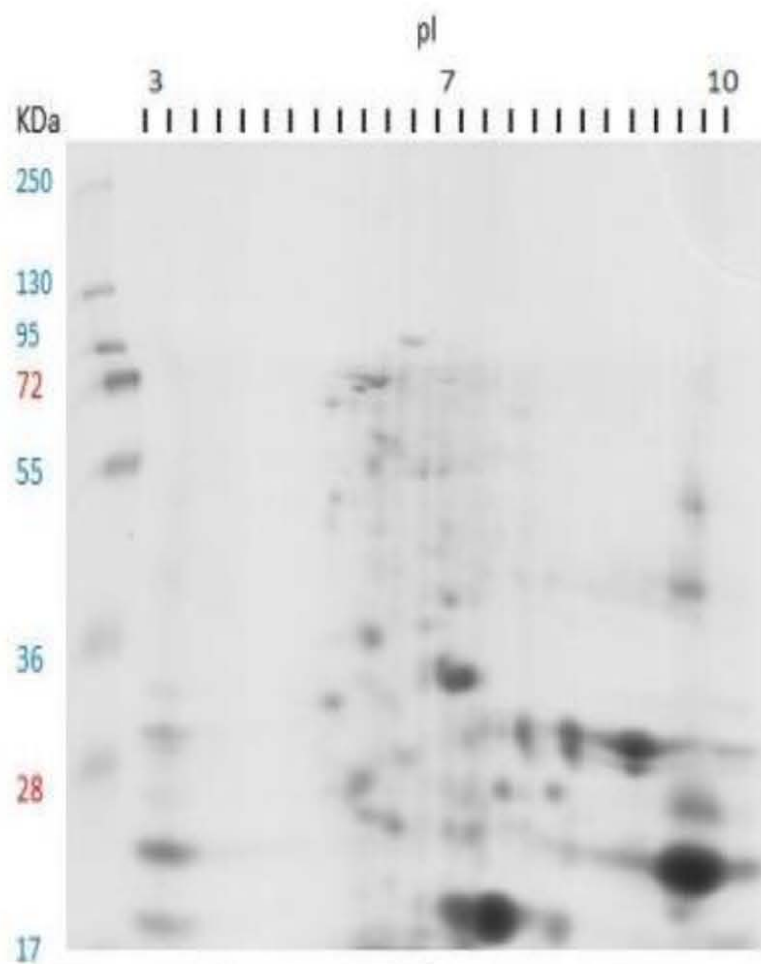


Cuarta réplica

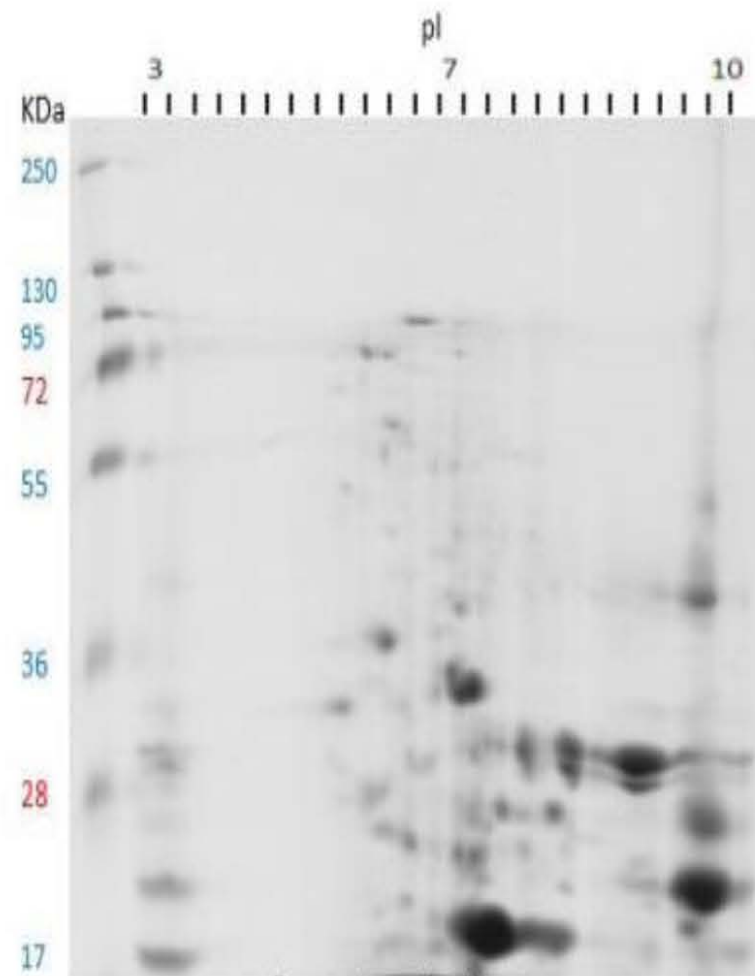
Figura 20. Imágenes usadas para el análisis de la condición control o T6.2 con el software LUDESI REDFIN 3 (cuatro replicas).





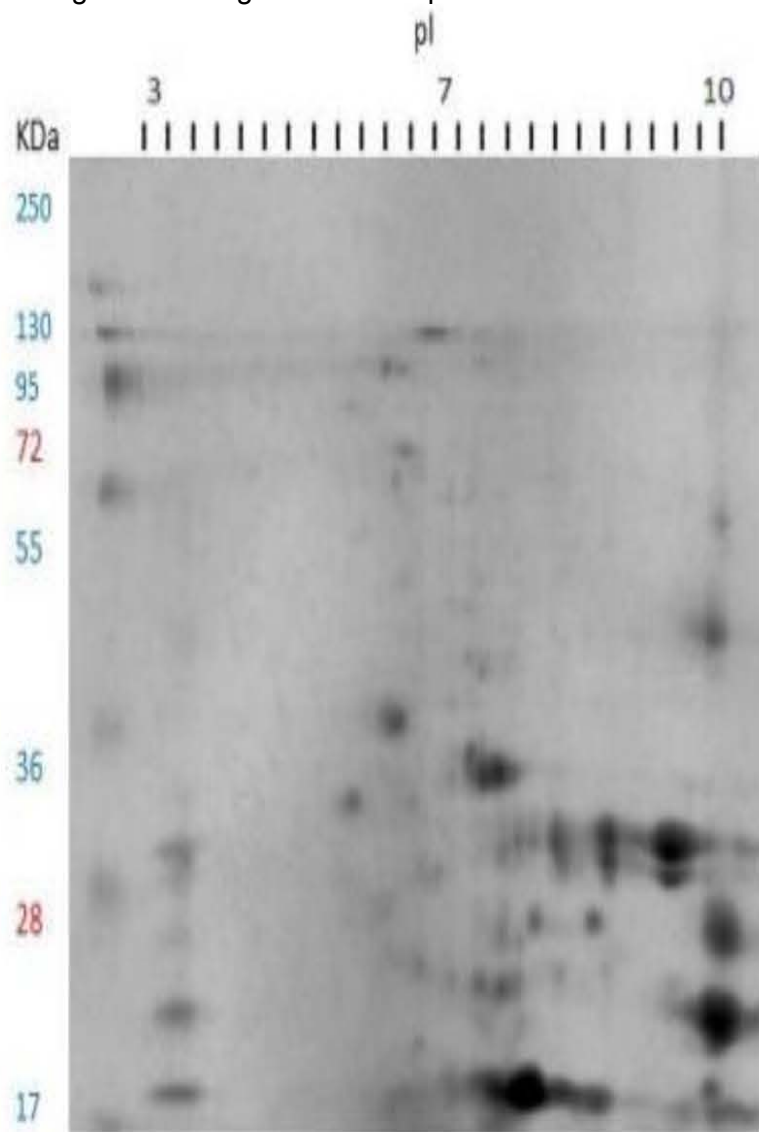


Tercera réplica

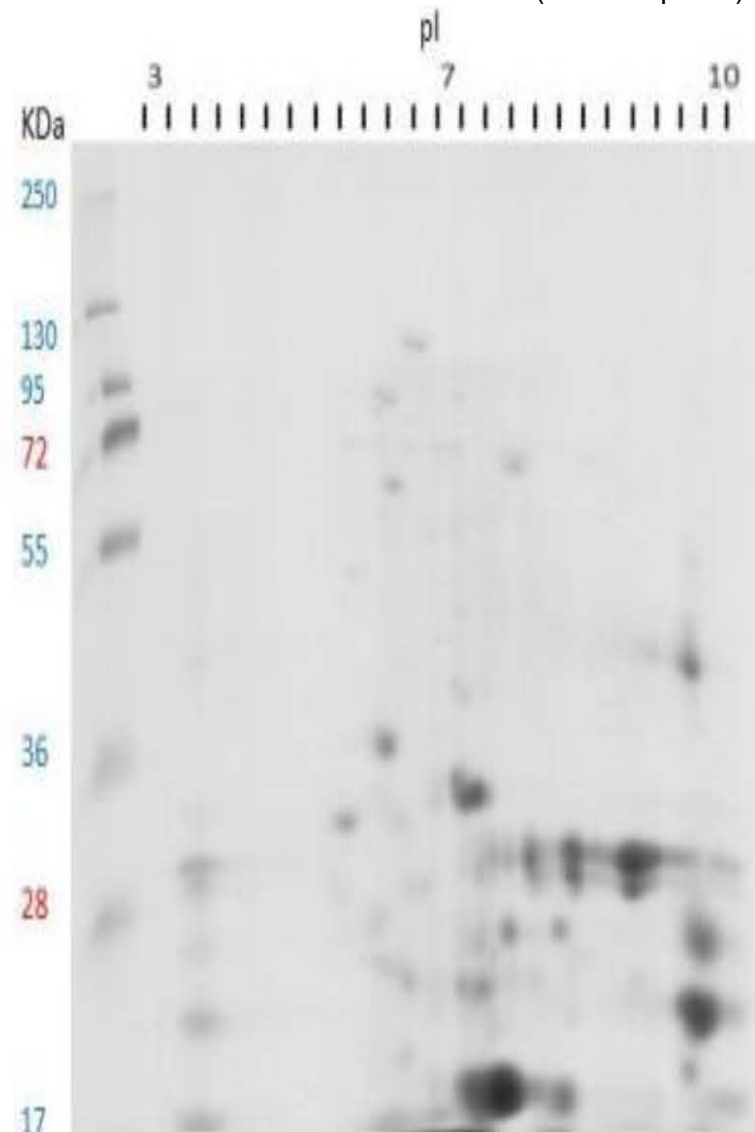


Cuarta réplica

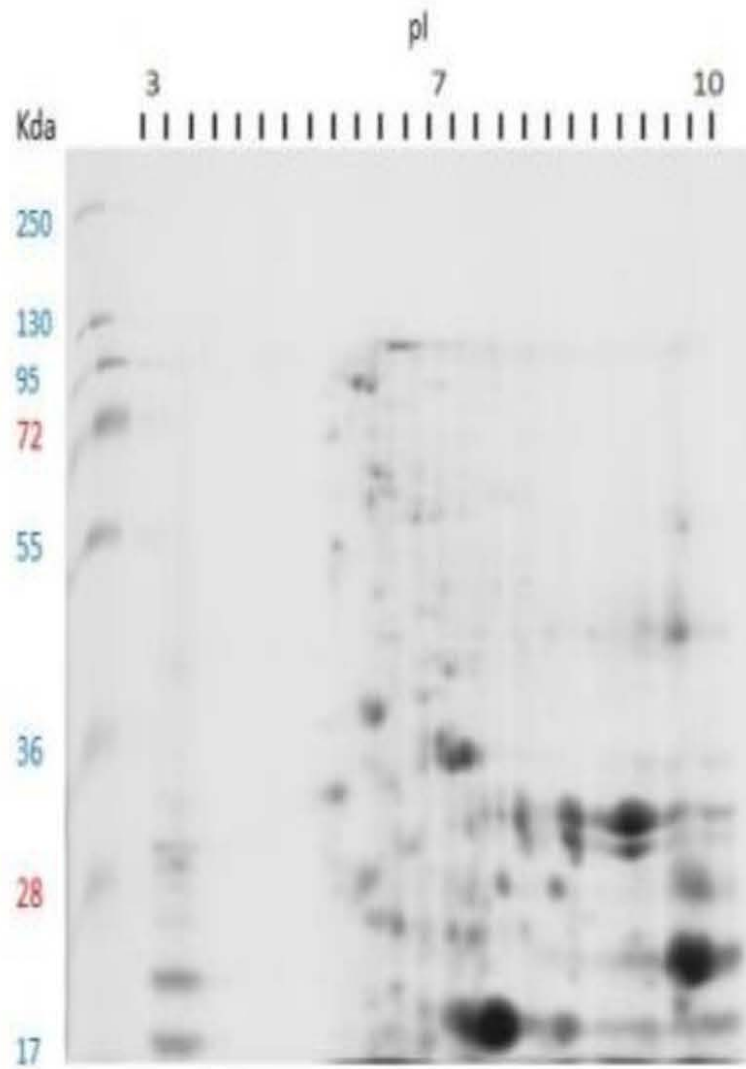
Figura 21. Imágenes usadas para el análisis de la condición control o T10 con el software LUDESI REDFIN 3 (cuatro replicas)



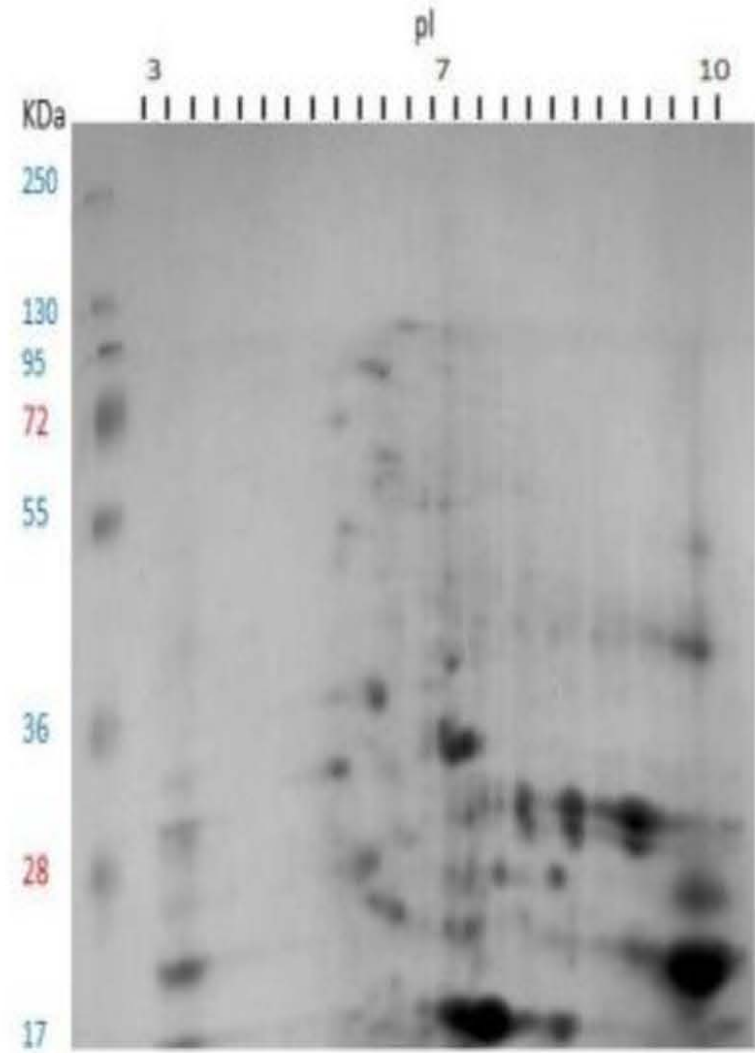
Primera réplica



Segunda réplica



Tercera réplica



Cuarta réplica

## Experiment overview

|            |                                      |
|------------|--------------------------------------|
| Experiment | ANALISIS 4replicas de cada condicion |
| Comparison | COMPRACION                           |
| Groups     | control, T6.2, T10                   |

## Experiment statistics

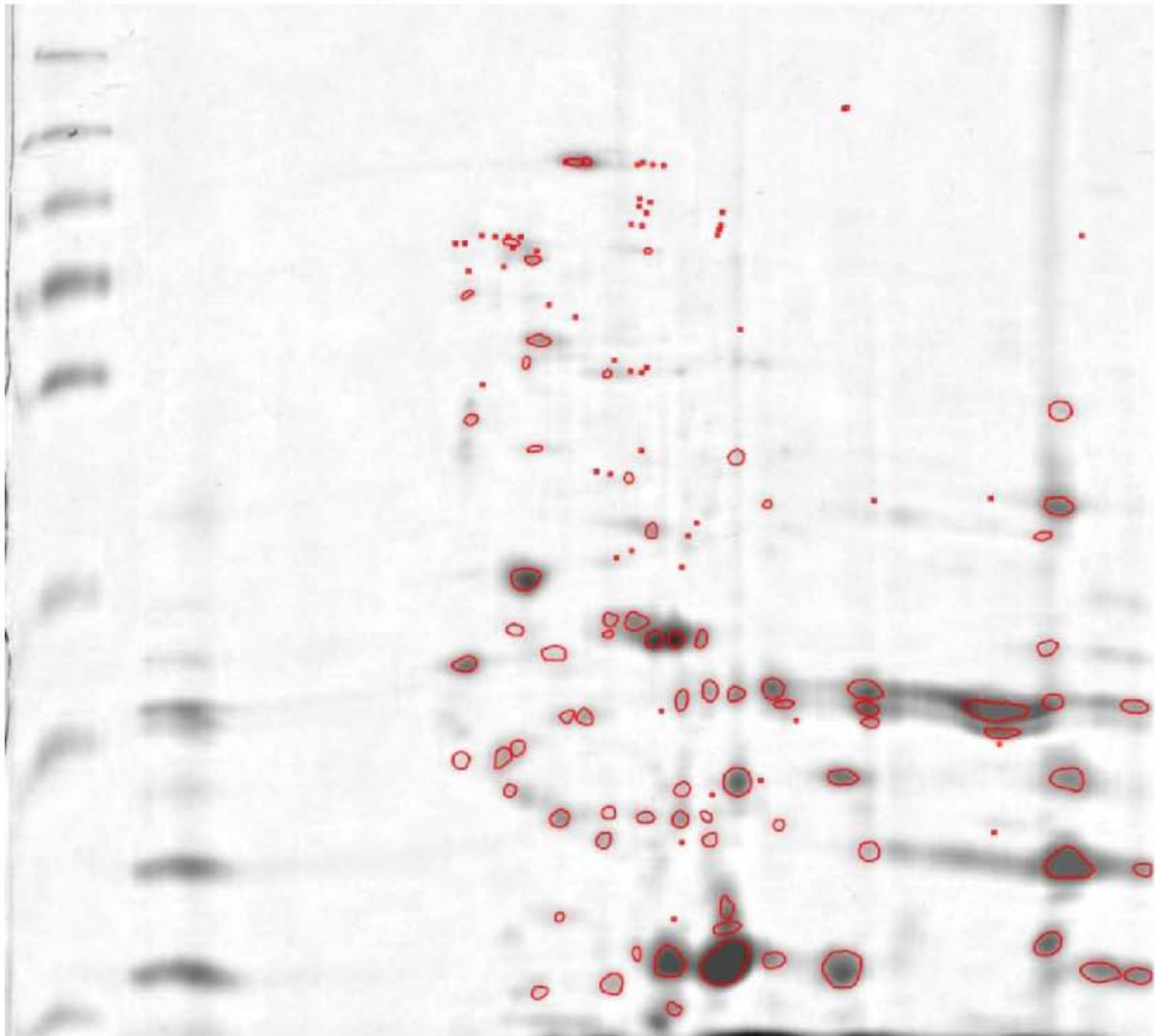
|                       |                |
|-----------------------|----------------|
| Statistical test      | Anova & Mann-W |
| Applied filters       | -              |
| Number filtered spots | 130            |

## Group color legend















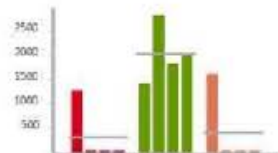















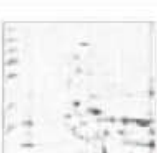


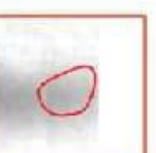






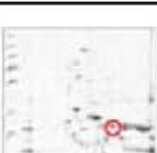
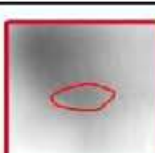

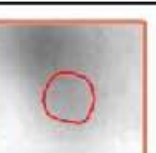

|  |  |   |
|--|--|---|
|  control |  T6.2 |  T10 |
|--|--|---|

## Protein overview

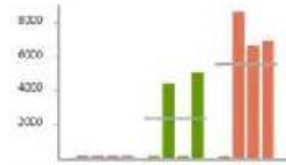
Overview gel name: CEDRO T0 CONTROL 05JUL13 N



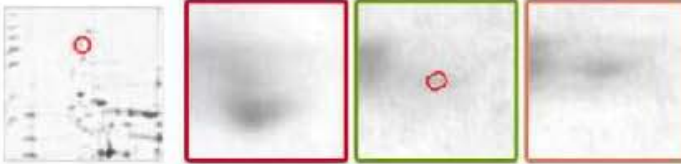
Filtered spots

|          |          |   |   |   |   |   |                        |
|----------|----------|---|---|---|---|---|------------------------|
| ID       | 137      |    |    |    |    |    | ★                      |
| Anova    | 0.0059   |   |   |   |   |   |                        |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |                        |
| Presence | 83 %     |   |   |   |   |   |                        |
| Fold     | 6.14     |   |   |   |   |   |                        |
| Volume   | 8130     |   |   |   |   |   |                        |
| ID       | 118      |    |    |    |    |    | ★                      |
| Anova    | 0.0061   |   |   |   |   |   |                        |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |                        |
| Presence | 58 %     |   |   |   |   |   |                        |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |                        |
| Volume   | 1367     |   |   |   |   |   |                        |
| ID       | 81       |    |    |    |    |    |                        |
| Anova    | 0.0108   |   |   |   |   |   |                        |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |                        |
| Presence | 50 %     |   |   |   |   |   |                        |
| Fold     | 6.32     |   |   |   |   |   |                        |
| Volume   | 916      |   |   |   |   |   |                        |
| ID       | 8        |    |    |    |    |    | mancha complicada<br>★ |
| Anova    | 0.0165   |   |   |   |   |   |                        |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |                        |
| Presence | 66 %     |   |   |   |   |   |                        |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |                        |
| Volume   | 2483     |   |   |   |   |   |                        |
| ID       | 117      |  |  |  |  |  | ★                      |
| Anova    | 0.0324   |   |   |   |   |   |                        |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |                        |
| Presence | 100 %    |   |   |   |   |   |                        |
| Fold     | 2.44     |   |   |   |   |   |                        |
| Volume   | 17335    |   |   |   |   |   |                        |
| ID       | 135      |  |  |  |  |  | ★                      |
| Anova    | 0.0420   |   |   |   |   |   |                        |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |                        |
| Presence | 100 %    |   |   |   |   |   |                        |
| Fold     | 2.10     |   |   |   |   |   |                        |
| Volume   | 49831    |   |   |   |   |   |                        |
| ID       | 129      |  |  |  |  |  | ★                      |
| Anova    | 0.0425   |   |   |   |   |   |                        |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |                        |
| Presence | 58 %     |   |   |   |   |   |                        |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |                        |
| Volume   | 9371     |   |   |   |   |   |                        |
| ID       | 83       |  |  |  |  |  | ★                      |
| Anova    | 0.0438   |   |   |   |   |   |                        |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |                        |
| Presence | 50 %     |   |   |   |   |   |                        |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |                        |
| Volume   | 1065     |   |   |   |   |   |                        |
| ID       | 111      |  |  |  |  |  |                        |
| Anova    | 0.0491   |   |   |   |   |   |                        |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |                        |
| Presence | 100 %    |   |   |   |   |   |                        |
| Fold     | 1.75     |   |   |   |   |   |                        |
| Volume   | 11821    |   |   |   |   |   |                        |

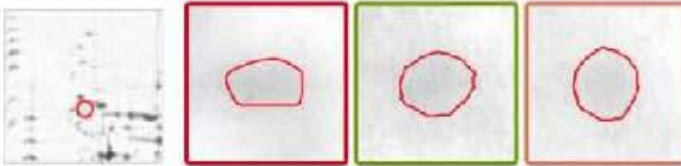
ID 76  
 Anova 0.0503  
 Mann-W -  
 Presence 41 %  
 Fold Infinity  
 Volume 2844



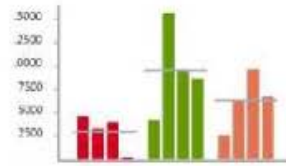
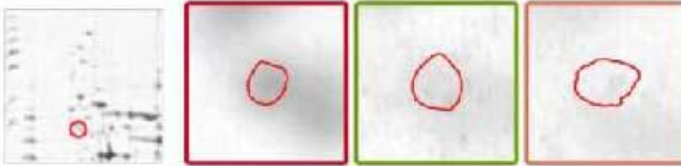
ID 67  
 Anova 0.0524  
 Mann-W -  
 Presence 25 %  
 Fold Infinity  
 Volume 961



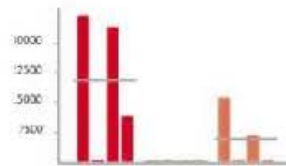
ID 95  
 Anova 0.0565  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.32  
 Volume 7928



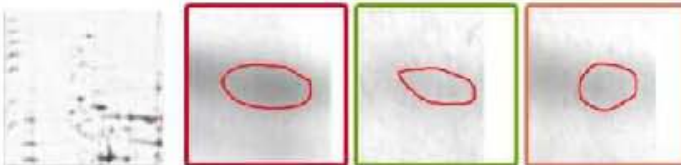
ID 101  
 Anova 0.0665  
 Mann-W -  
 Presence 91 %  
 Fold 3.22  
 Volume 6261



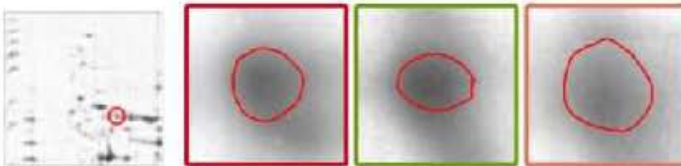
ID 128  
 Anova 0.0710  
 Mann-W -  
 Presence 41 %  
 Fold Infinity  
 Volume 8884



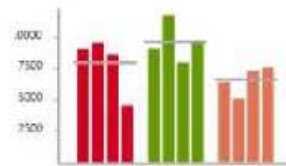
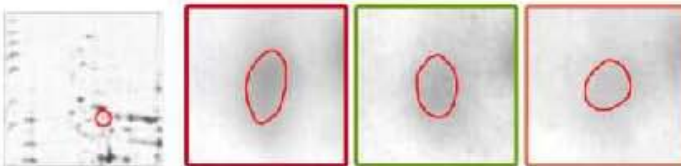
ID 121  
 Anova 0.0741  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.84  
 Volume 8340



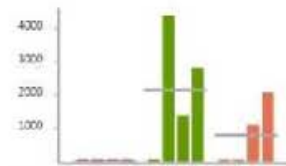
ID 110  
 Anova 0.0900  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.33  
 Volume 34245



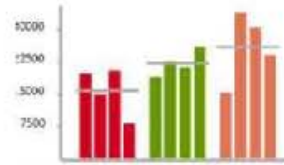
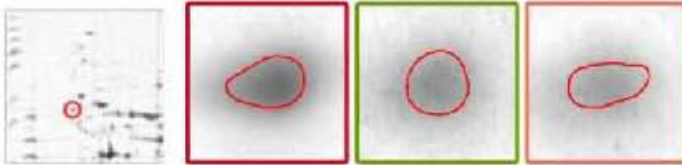
ID 98  
 Anova 0.0933  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.48  
 Volume 8063



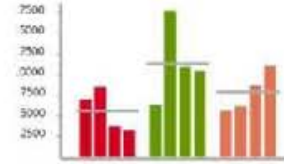
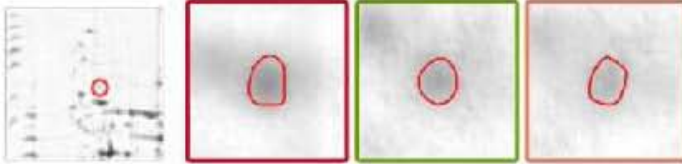
ID 80  
 Anova 0.0944  
 Mann-W -  
 Presence 41 %  
 Fold Infinity  
 Volume 983



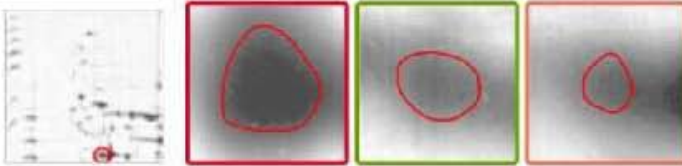
**ID:** 91  
**Anova:** 0.1053  
**Mann-W:** -  
**Presence:** 100 %  
**Fold:** 1.64  
**Volume:** 21355



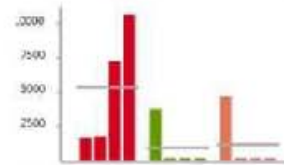
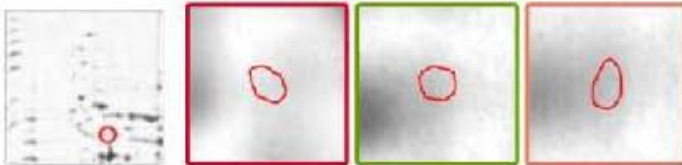
**ID:** 4  
**Anova:** 0.1111  
**Mann-W:** -  
**Presence:** 100 %  
**Fold:** 2.02  
**Volume:** 8296



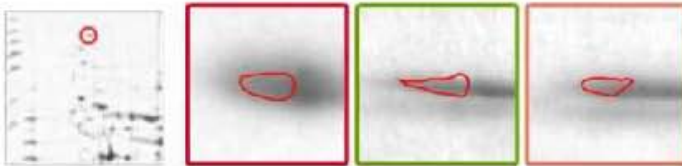
**ID:** 139  
**Anova:** 0.1219  
**Mann-W:** -  
**Presence:** 100 %  
**Fold:** 2.12  
**Volume:** 28626



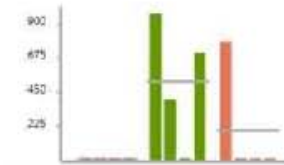
**ID:** 43  
**Anova:** 0.1288  
**Mann-W:** -  
**Presence:** 50 %  
**Fold:** 5.68  
**Volume:** 2482



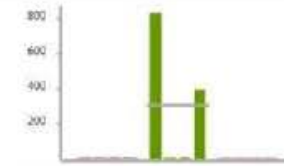
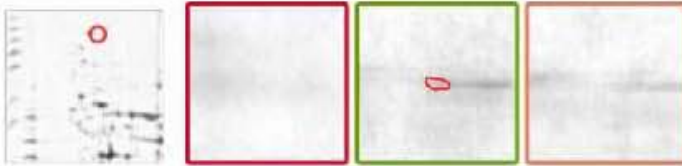
**ID:** 60  
**Anova:** 0.1333  
**Mann-W:** -  
**Presence:** 100 %  
**Fold:** 2.05  
**Volume:** 4332



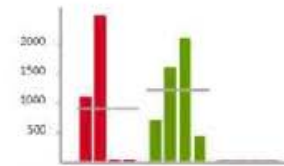
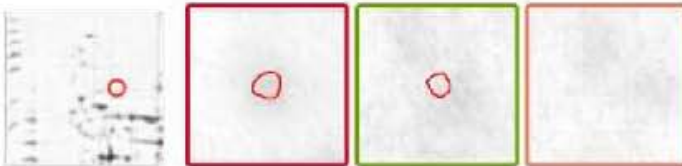
**ID:** 21  
**Anova:** 0.1346  
**Mann-W:** -  
**Presence:** 33 %  
**Fold:** Infinity  
**Volume:** 239



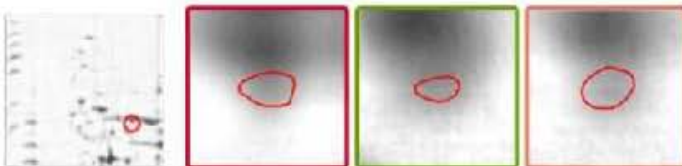
**ID:** 54  
**Anova:** 0.1467  
**Mann-W:** -  
**Presence:** 16 %  
**Fold:** Infinity  
**Volume:** 102



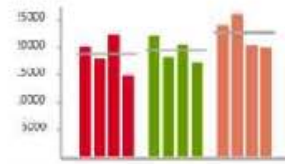
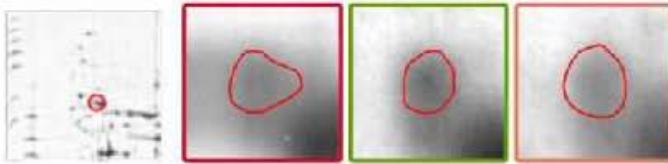
**ID:** 77  
**Anova:** 0.1484  
**Mann-W:** -  
**Presence:** 50 %  
**Fold:** Infinity  
**Volume:** 705



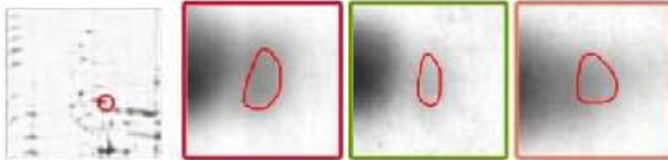
**ID:** 113  
**Anova:** 0.1644  
**Mann-W:** -  
**Presence:** 100 %  
**Fold:** 1.42  
**Volume:** 6909



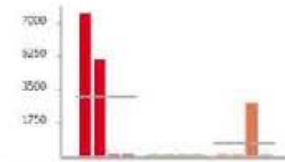
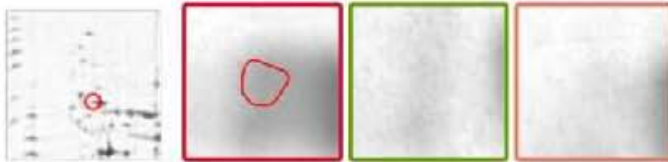
ID 85  
 Anova 0.1728  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.20  
 Volume 20358



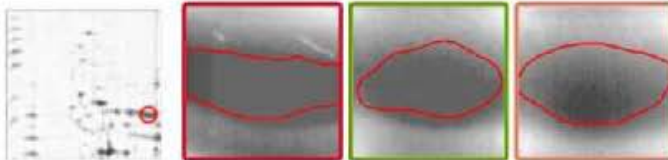
ID 88  
 Anova 0.1851  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.60  
 Volume 6951



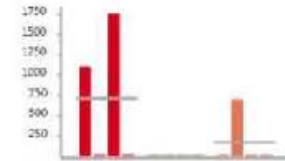
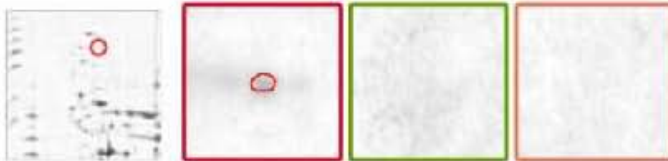
ID 84  
 Anova 0.1878  
 Mann-W -  
 Presence 25 %  
 Fold Infinity  
 Volume 1285



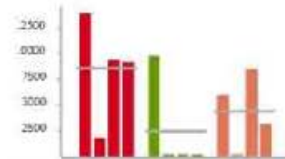
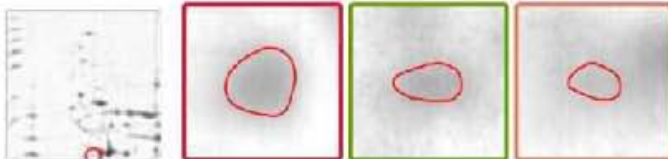
ID 116  
 Anova 0.1923  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.42  
 Volume 91680



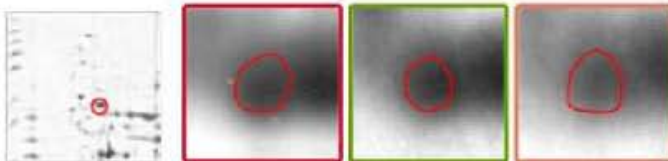
ID 14  
 Anova 0.2051  
 Mann-W -  
 Presence 25 %  
 Fold Infinity  
 Volume 297



ID 141  
 Anova 0.2064  
 Mann-W -  
 Presence 66 %  
 Fold 3.51  
 Volume 5147



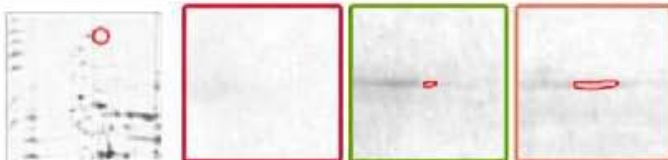
ID 86  
 Anova 0.2075  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.20  
 Volume 27588








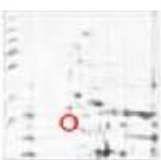



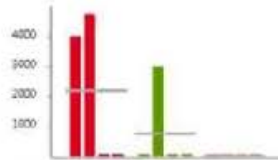




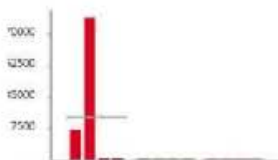

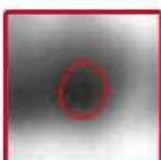














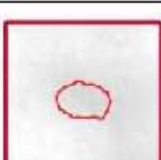
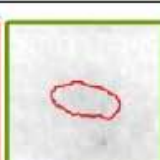
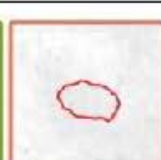

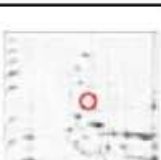

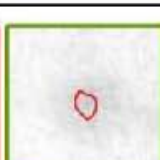
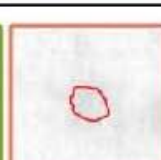





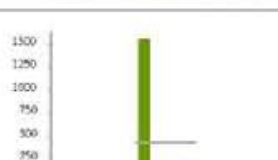
ID 33  
 Anova 0.2195  
 Mann-W -  
 Presence 16 %  
 Fold Infinity  
 Volume 379

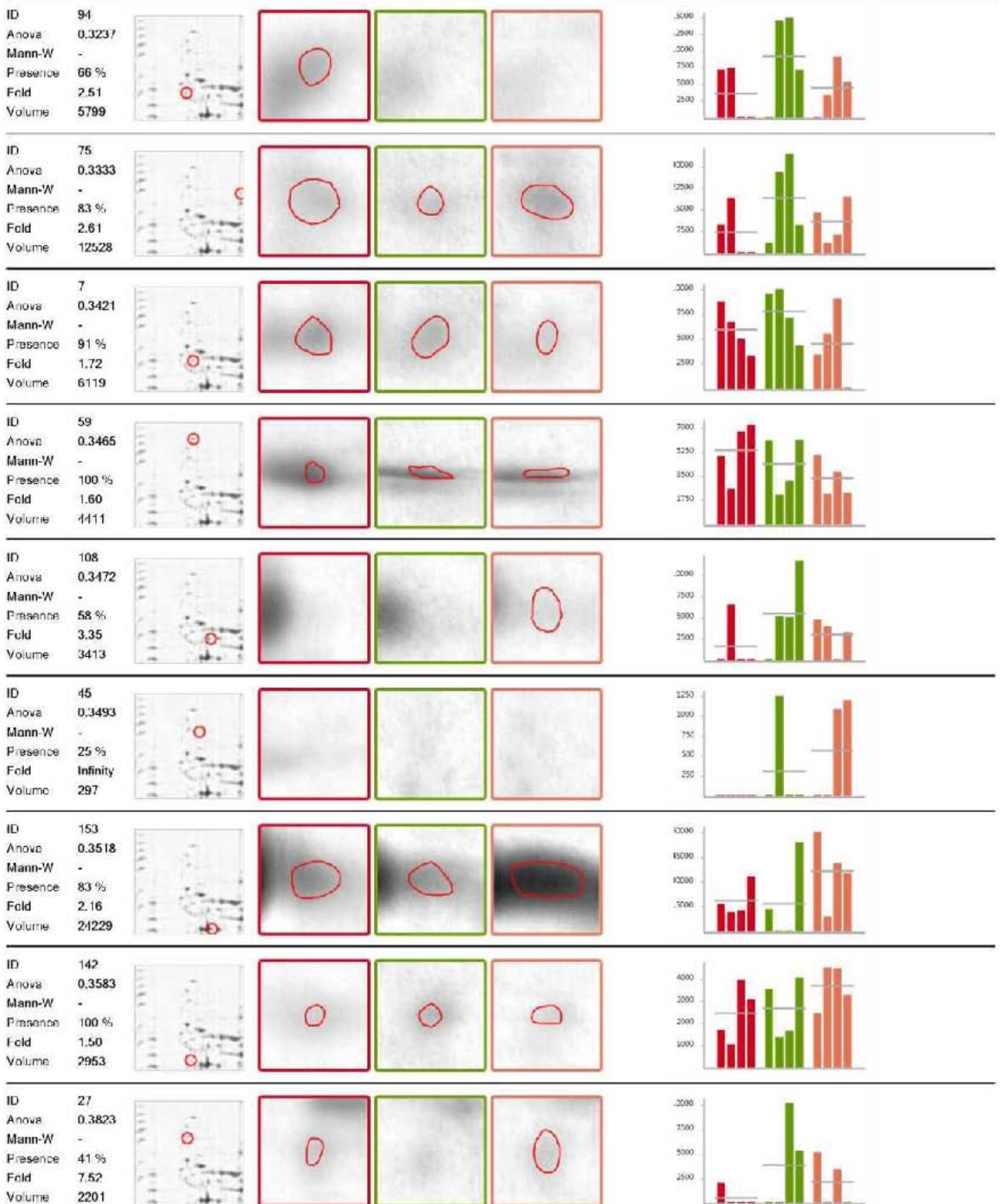



ID 55  
 Anova 0.2297  
 Mann-W -  
 Presence 25 %  
 Fold Infinity  
 Volume 139





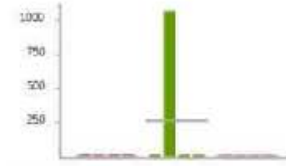
|          |          |   |   |   |   |   |
|----------|----------|---|---|---|---|---|
| ID       | 120      |    |    |    |    |    |
| Anova    | 0.2322   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 100 %    |   |   |   |   |   |
| Fold     | 1.86     |   |   |   |   |   |
| Volume   | 75700    |   |   |   |   |   |
| ID       | 41       |    |    |    |    |    |
| Anova    | 0.2353   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 25 %     |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 985      |   |   |   |   |   |
| ID       | 138      |    |    |    |    |    |
| Anova    | 0.2490   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 16 %     |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 8042     |   |   |   |   |   |
| ID       | 87       |    |    |    |    |    |
| Anova    | 0.2761   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 100 %    |   |   |   |   |   |
| Fold     | 1.26     |   |   |   |   |   |
| Volume   | 34354    |   |   |   |   |   |
| ID       | 143      |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.2789   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 33 %     |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 1005     |   |   |   |   |   |
| ID       | 17       |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.2869   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 33 %     |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 226      |   |   |   |   |   |
| ID       | 96       |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.3191   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 100 %    |   |   |   |   |   |
| Fold     | 1.64     |   |   |   |   |   |
| Volume   | 3209     |   |   |   |   |   |
| ID       | 52       |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.3209   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 33 %     |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 481      |   |   |   |   |   |
| ID       | 35       |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.3223   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 16 %     |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 143      |   |   |   |   |   |



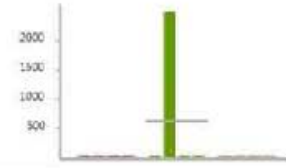
|          |          |   |   |   |   |   |
|----------|----------|---|---|---|---|---|
| ID       | 16       |    |    |    |    |    |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 76       |   |   |   |   |   |
| ID       | 22       |    |    |    |    |    |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 62       |   |   |   |   |   |
| ID       | 23       |    |    |    |    |    |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 55       |   |   |   |   |   |
| ID       | 24       |    |    |    |    |    |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 178      |   |   |   |   |   |
| ID       | 31       |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 66       |   |   |   |   |   |
| ID       | 32       |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | +        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 56       |   |   |   |   |   |
| ID       | 36       |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 92       |   |   |   |   |   |
| ID       | 46       |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 334      |   |   |   |   |   |
| ID       | 47       |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 76       |   |   |   |   |   |

|          |          |   |   |   |   |   |
|----------|----------|---|---|---|---|---|
| ID       | 49       |    |    |    |    |    |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 22       |   |   |   |   |   |
| ID       | 50       |    |    |    |    |    |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 54       |   |   |   |   |   |
| ID       | 51       |    |    |    |    |    |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 542      |   |   |   |   |   |
| ID       | 57       |   |   |   |   |   |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 840      |   |   |   |   |   |
| ID       | 61       |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 80       |   |   |   |   |   |
| ID       | 64       |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 26       |   |   |   |   |   |
| ID       | 65       |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 19       |   |   |   |   |   |
| ID       | 68       |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 988      |   |   |   |   |   |
| ID       | 69       |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.4053   |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -        |   |   |   |   |   |
| Presence | 8 %      |   |   |   |   |   |
| Fold     | Infinity |   |   |   |   |   |
| Volume   | 93       |   |   |   |   |   |

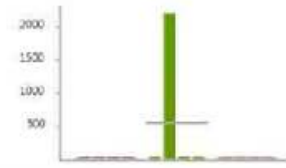
ID 70  
 Anova 0.4053  
 Mann-W -  
 Presence 8 %  
 Fold Infinity  
 Volume 89



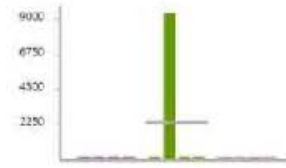
ID 71  
 Anova 0.4053  
 Mann-W -  
 Presence 8 %  
 Fold Infinity  
 Volume 208



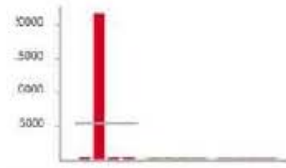
ID 72  
 Anova 0.4053  
 Mann-W -  
 Presence 8 %  
 Fold Infinity  
 Volume 184



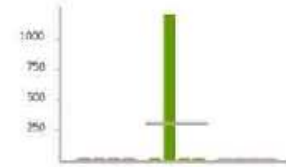
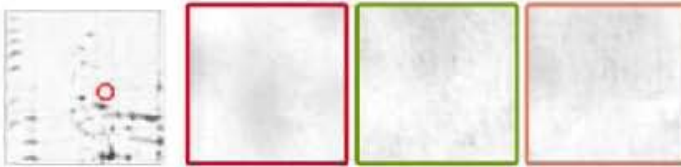
ID 73  
 Anova 0.4053  
 Mann-W -  
 Presence 8 %  
 Fold Infinity  
 Volume 786



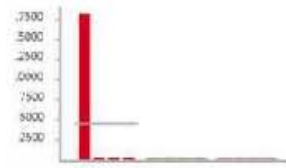
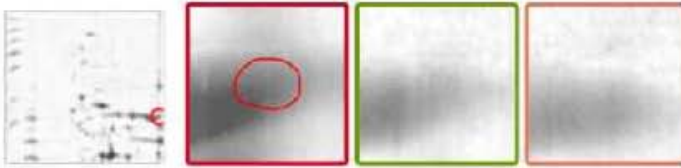
ID 78  
 Anova 0.4053  
 Mann-W -  
 Presence 8 %  
 Fold Infinity  
 Volume 1808



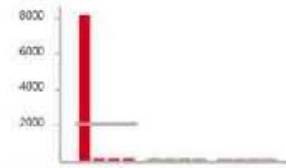
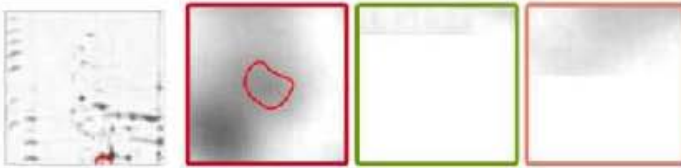
ID 79  
 Anova 0.4053  
 Mann-W -  
 Presence 8 %  
 Fold Infinity  
 Volume 101



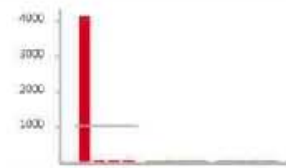
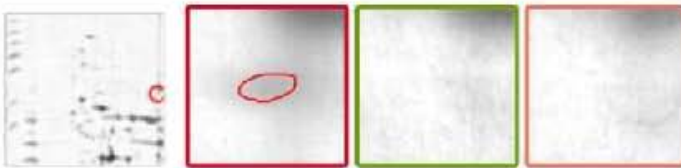
ID 123  
 Anova 0.4053  
 Mann-W -  
 Presence 8 %  
 Fold Infinity  
 Volume 1518



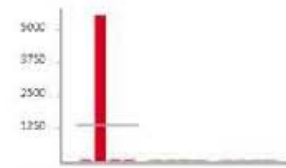
ID 140  
 Anova 0.4053  
 Mann-W -  
 Presence 8 %  
 Fold Infinity  
 Volume 686



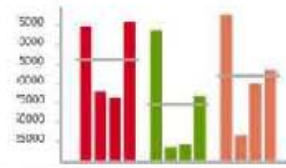
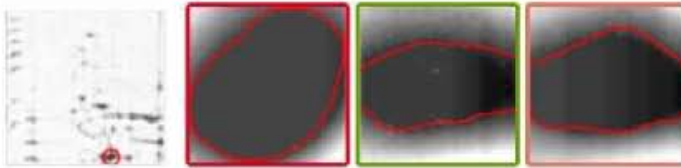
ID 151  
 Anova 0.4053  
 Mann-W -  
 Presence 8 %  
 Fold Infinity  
 Volume 346



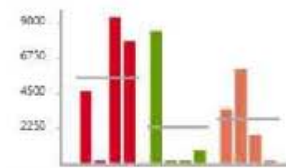
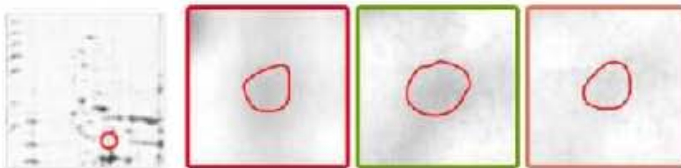
ID 156  
 Anova 0.4053  
 Mann-W -  
 Presence 8 %  
 Fold Infinity  
 Volume 463



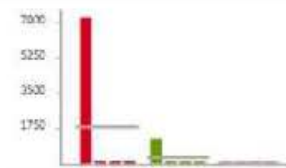
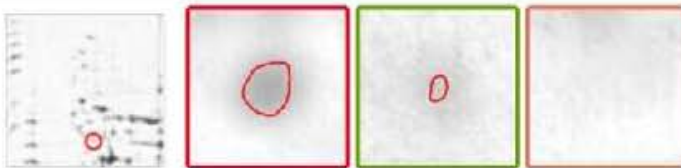
ID 134  
 Anova 0.4507  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.79  
 Volume 104442



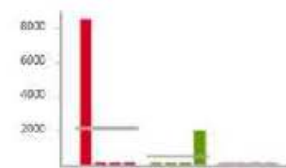
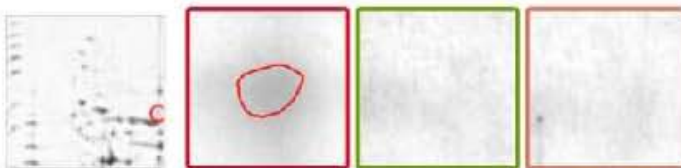
ID 136  
 Anova 0.4644  
 Mann-W -  
 Presence 68 %  
 Fold 2.36  
 Volume 3555



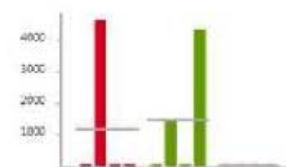
ID 48  
 Anova 0.4656  
 Mann-W -  
 Presence 16 %  
 Fold Infinity  
 Volume 712



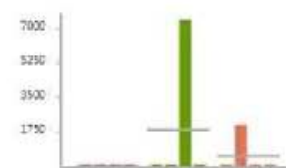
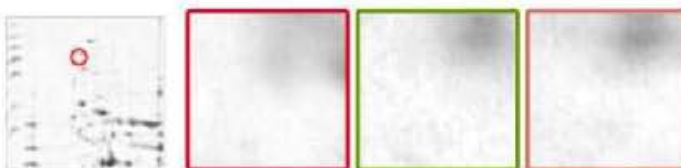
ID 149  
 Anova 0.4893  
 Mann-W -  
 Presence 16 %  
 Fold Infinity  
 Volume 886



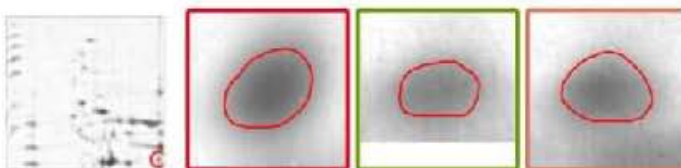
ID 143  
 Anova 0.5017  
 Mann-W -  
 Presence 25 %  
 Fold Infinity  
 Volume 879



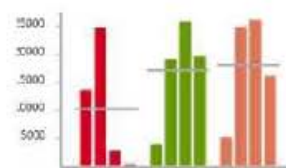
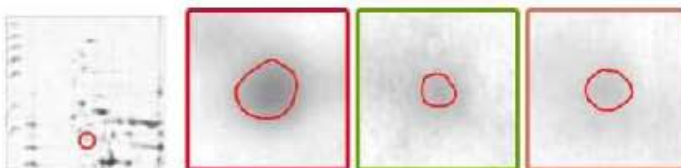
ID 58  
 Anova 0.5059  
 Mann-W -  
 Presence 16 %  
 Fold Infinity  
 Volume 795





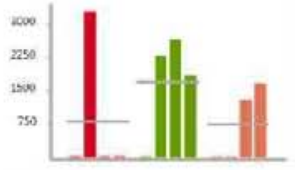
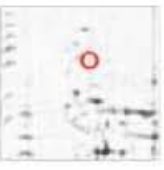



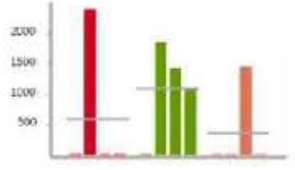
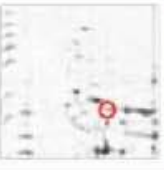

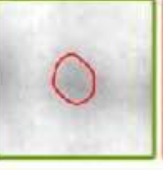
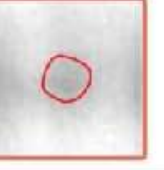




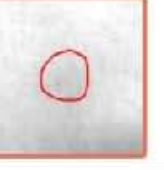
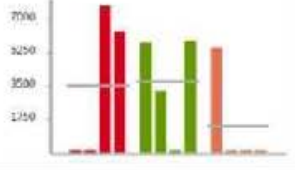
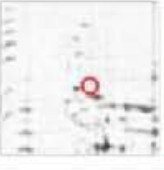



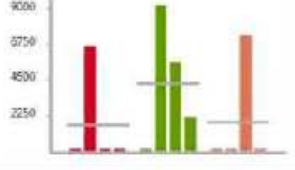




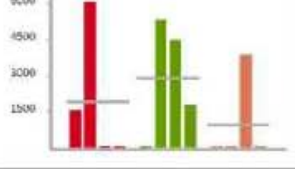




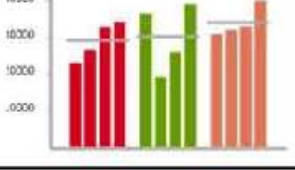
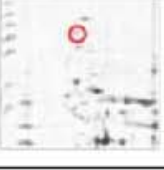



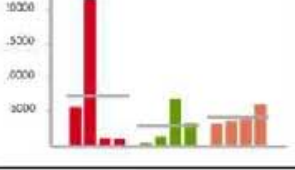
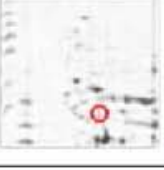
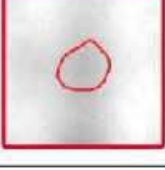

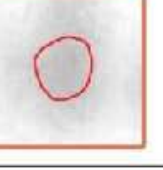



ID 130  
 Anova 0.5089  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.79  
 Volume 22588

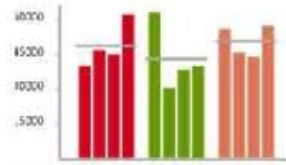
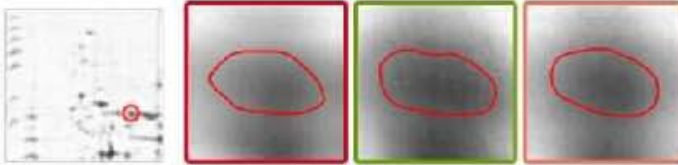


ID 100  
 Anova 0.5138  
 Mann-W -  
 Presence 91 %  
 Fold 1.77  
 Volume 15222

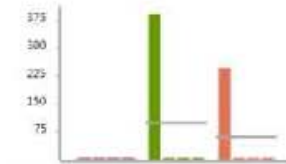


|          |        |   |   |   |   |   |
|----------|--------|---|---|---|---|---|
| ID       | 19     |    |    |    |    |    |
| Anova    | 0.5259 |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -      |   |   |   |   |   |
| Presence | 50 %   |   |   |   |   |   |
| Fold     | 2.28   |   |   |   |   |   |
| Volume   | 1094   |   |   |   |   |   |
| ID       | 155    |    |    |    |    |    |
| Anova    | 0.5467 |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -      |   |   |   |   |   |
| Presence | 41 %   |   |   |   |   |   |
| Fold     | 3.00   |   |   |   |   |   |
| Volume   | 692    |   |   |   |   |   |
| ID       | 92     |    |    |    |    |    |
| Anova    | 0.5494 |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -      |   |   |   |   |   |
| Presence | 100 %  |   |   |   |   |   |
| Fold     | 1.31   |   |   |   |   |   |
| Volume   | 6345   |   |   |   |   |   |
| ID       | 126    |   |   |   |   |   |
| Anova    | 0.5523 |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -      |   |   |   |   |   |
| Presence | 60 %   |   |   |   |   |   |
| Fold     | 2.71   |   |   |   |   |   |
| Volume   | 2892   |   |   |   |   |   |
| ID       | 89     |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.5590 |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -      |   |   |   |   |   |
| Presence | 41 %   |   |   |   |   |   |
| Fold     | 2.56   |   |   |   |   |   |
| Volume   | 2694   |   |   |   |   |   |
| ID       | 82     |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.5603 |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -      |   |   |   |   |   |
| Presence | 50 %   |   |   |   |   |   |
| Fold     | 2.99   |   |   |   |   |   |
| Volume   | 1926   |   |   |   |   |   |
| ID       | 114    |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.5693 |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -      |   |   |   |   |   |
| Presence | 100 %  |   |   |   |   |   |
| Fold     | 1.17   |   |   |   |   |   |
| Volume   | 31136  |   |   |   |   |   |
| ID       | 6      |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.5759 |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -      |   |   |   |   |   |
| Presence | 91 %   |   |   |   |   |   |
| Fold     | 2.58   |   |   |   |   |   |
| Volume   | 4769   |   |   |   |   |   |
| ID       | 97     |  |  |  |  |  |
| Anova    | 0.5864 |   |   |   |   |   |
| Mann-W   | -      |   |   |   |   |   |
| Presence | 100 %  |   |   |   |   |   |
| Fold     | 1.30   |   |   |   |   |   |
| Volume   | 6884   |   |   |   |   |   |

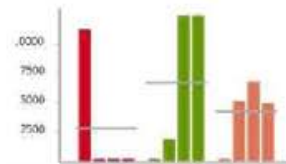
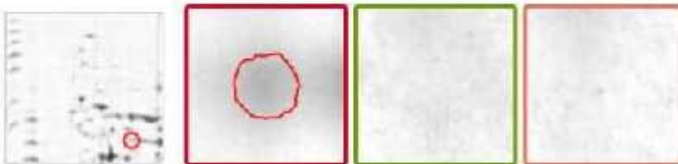
ID 115  
 Anova 0.5903  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.18  
 Volume 47572



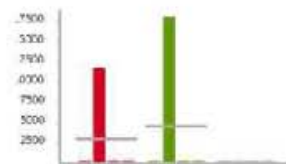
ID 15  
 Anova 0.5956  
 Mann-W -  
 Presence 16 %  
 Fold Infinity  
 Volume 53



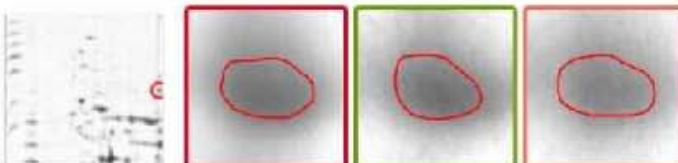
ID 28  
 Anova 0.5990  
 Mann-W -  
 Presence 58 %  
 Fold 2.38  
 Volume 4583



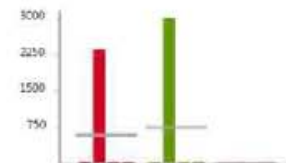
ID 56  
 Anova 0.5991  
 Mann-W -  
 Presence 16 %  
 Fold Infinity  
 Volume 2494



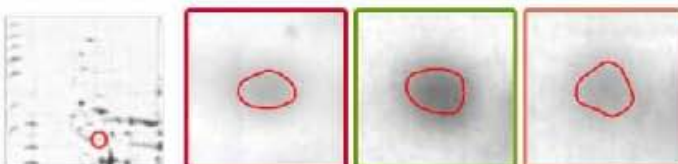
ID 3  
 Anova 0.5992  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.31  
 Volume 35620



ID 42  
 Anova 0.6144  
 Mann-W -  
 Presence 16 %  
 Fold Infinity  
 Volume 447



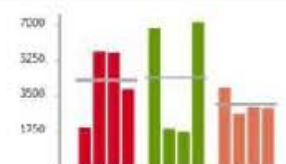
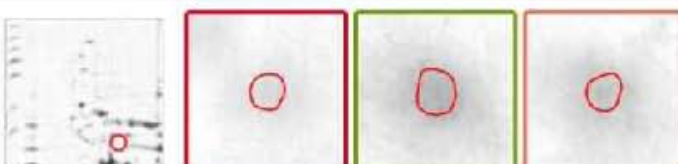
ID 103  
 Anova 0.6153  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.43  
 Volume 11466



ID 29  
 Anova 0.6174  
 Mann-W -  
 Presence 16 %  
 Fold Infinity  
 Volume 347

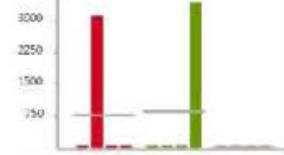
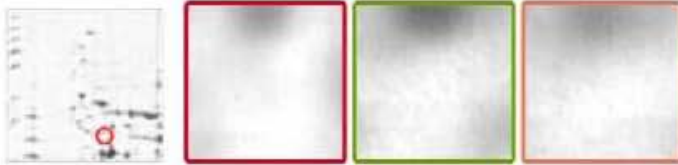


ID 107  
 Anova 0.6187  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.42  
 Volume 3950

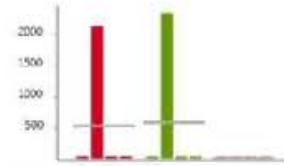




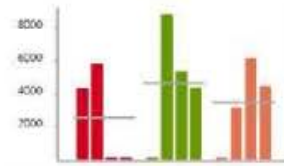
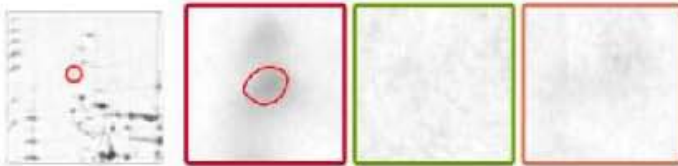
ID 147  
 Anova 0.6210  
 Mann-W -  
 Presence 16 %  
 Fold Infinity  
 Volume 546



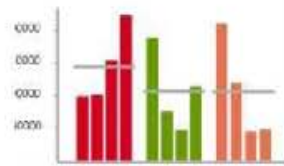
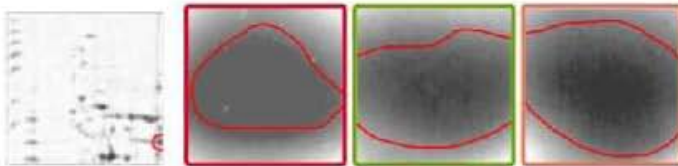
ID 18  
 Anova 0.6212  
 Mann-W -  
 Presence 16 %  
 Fold Infinity  
 Volume 374



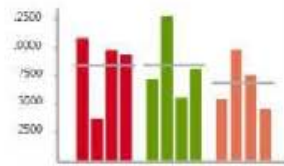
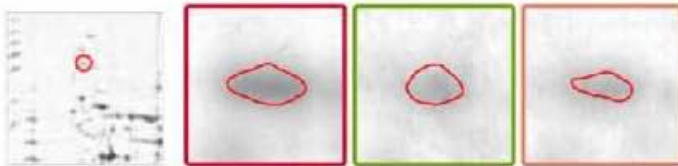
ID 9  
 Anova 0.6458  
 Mann-W -  
 Presence 66 %  
 Fold 1.83  
 Volume 3556



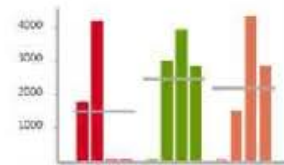
ID 125  
 Anova 0.6618  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.36  
 Volume 119597



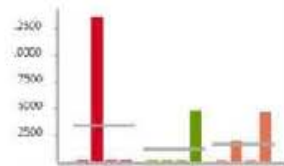
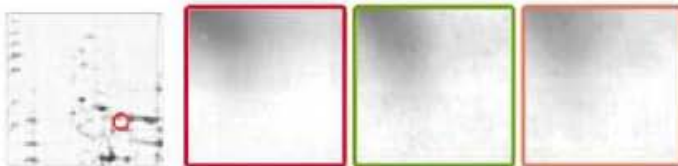
ID 26  
 Anova 0.6842  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.23  
 Volume 7898



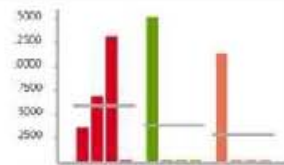
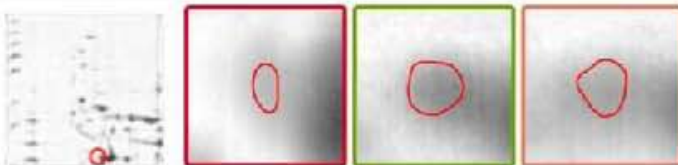
ID 13  
 Anova 0.7604  
 Mann-W -  
 Presence 66 %  
 Fold 1.64  
 Volume 2049



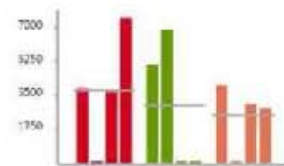
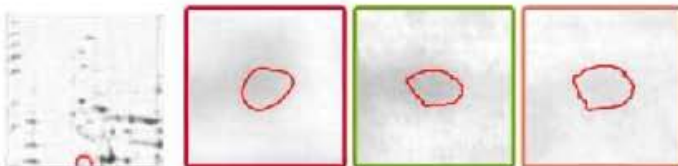
ID 112  
 Anova 0.7618  
 Mann-W -  
 Presence 33 %  
 Fold 2.81  
 Volume 2101



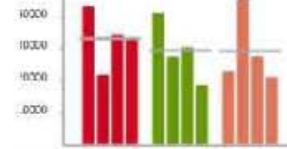
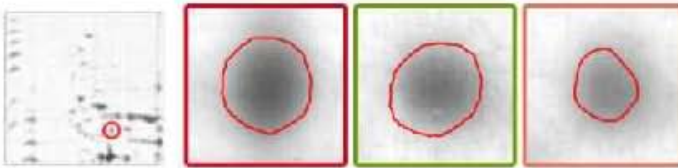
ID 146  
 Anova 0.7888  
 Mann-W -  
 Presence 41 %  
 Fold 2.08  
 Volume 4187



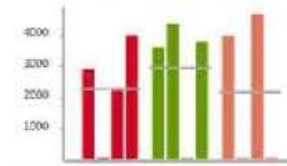
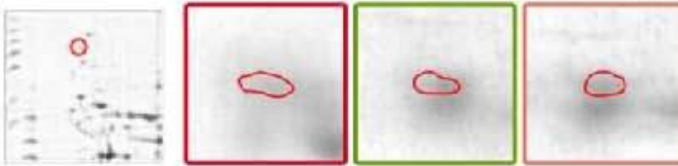
ID 144  
 Anova 0.8219  
 Mann-W -  
 Presence 66 %  
 Fold 1.51  
 Volume 3085



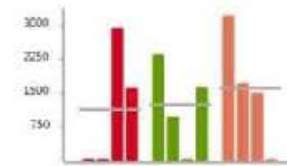
ID 106  
 Anova 0.8239  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.13  
 Volume 30519



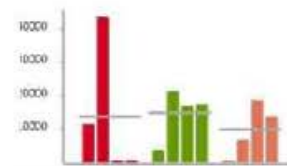
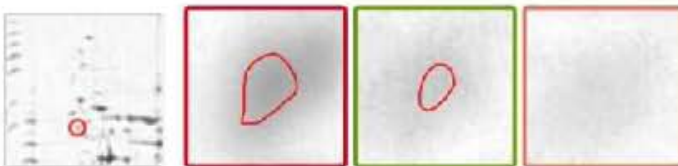
ID 68  
 Anova 0.8523  
 Mann-W -  
 Presence 66 %  
 Fold 1.36  
 Volume 2469



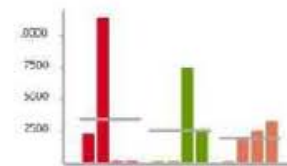
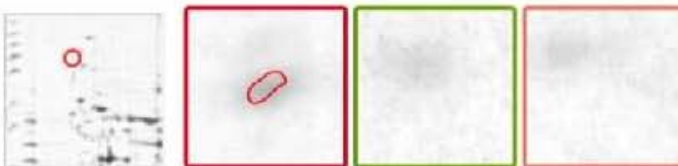
ID 109  
 Anova 0.8569  
 Mann-W -  
 Presence 66 %  
 Fold 1.42  
 Volume 1336



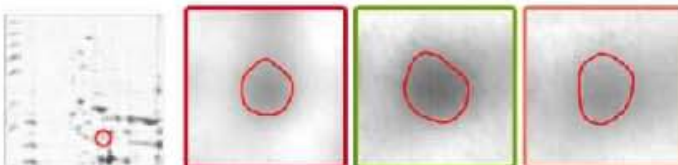
ID 93  
 Anova 0.8599  
 Mann-W -  
 Presence 75 %  
 Fold 1.51  
 Volume 12872



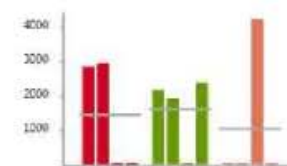
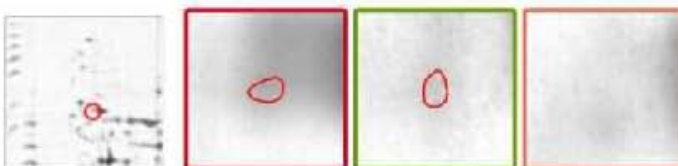
ID 12  
 Anova 0.8617  
 Mann-W -  
 Presence 58 %  
 Fold 1.76  
 Volume 2651



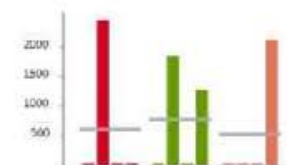
ID 5  
 Anova 0.8837  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.20  
 Volume 16775



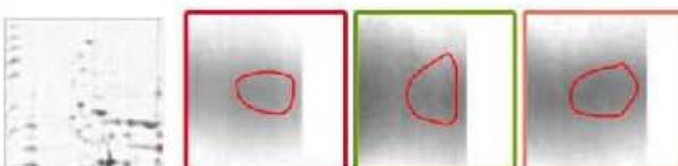
ID 105  
 Anova 0.8883  
 Mann-W -  
 Presence 50 %  
 Fold 1.54  
 Volume 1385

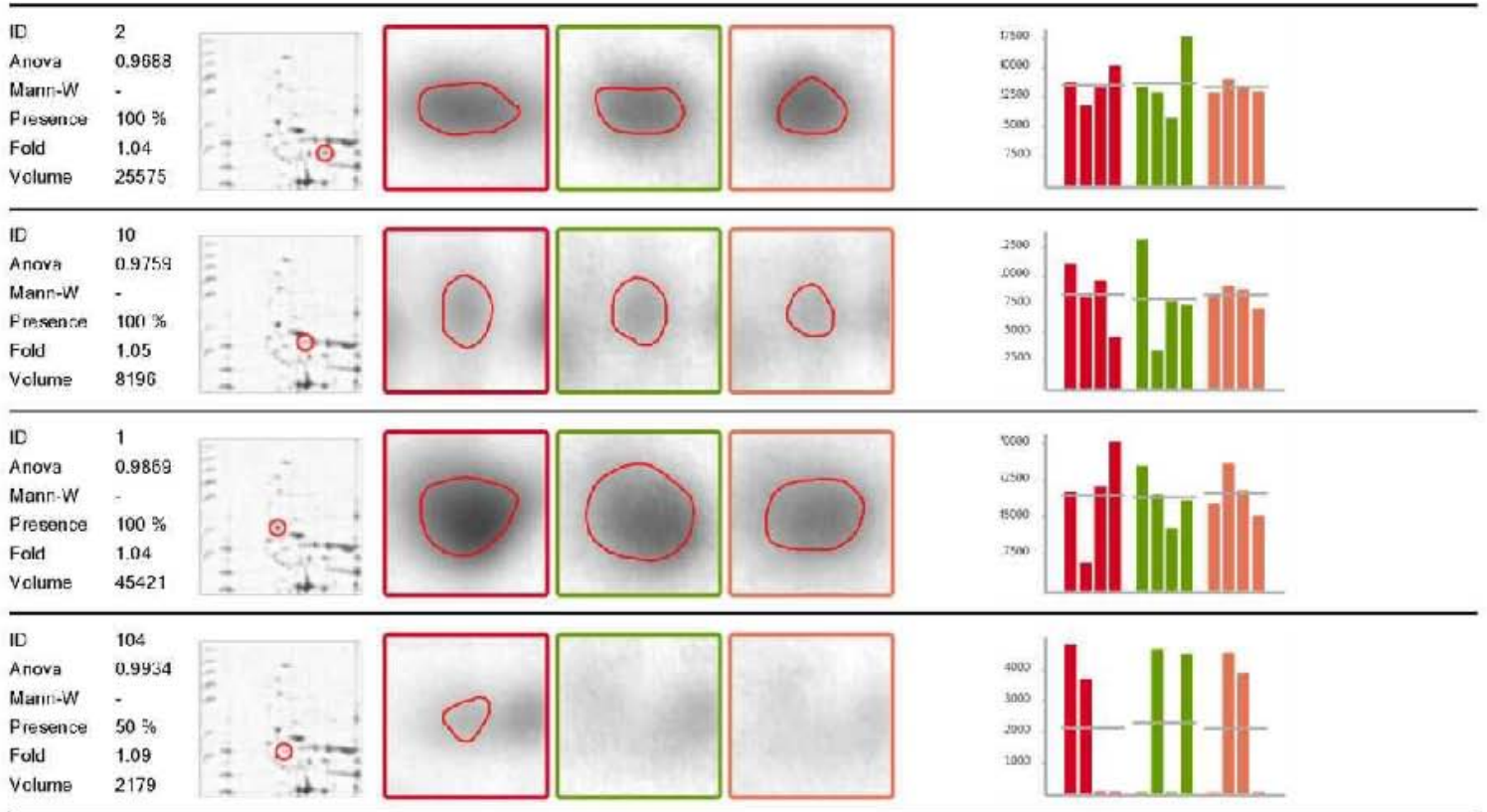


ID 44  
 Anova 0.9463  
 Mann-W -  
 Presence 33 %  
 Fold 1.47  
 Volume 645



ID 124  
 Anova 0.9610  
 Mann-W -  
 Presence 100 %  
 Fold 1.11  
 Volume 19681





## ANEXO IV

Tabla 8. Tabla con los promedios de los resultados procesados de las 76 manchas que cumplieron con los criterios de selección.

| ID | ANOVA  | control             | T6.2                | T10                 |
|----|--------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 1  | 0.9869 | 45283.64 ± 23662.26 | 44547.71 ± 12128.42 | 46431.82 ± 10576.29 |
| 2  | 0.9688 | 25565.92 ± 4124.53  | 26080.62 ± 8671.67  | 25079.32 ± 1519.56  |
| 3  | 0.5992 | 31592.79 ± 10399.99 | 33723.38 ± 10391.04 | 41543.50 ± 19778.45 |
| 4  | 0.1111 | 5619.66 ± 2574.71   | 11369.92 ± 4749.87  | 7897.12 ± 2516.99   |
| 5  | 0.8837 | 18491.82 ± 11544.18 | 15470.23 ± 8587.96  | 16362.55 ± 4870.98  |
| 6  | 0.5759 | 7332.47 ± 9917.93   | 3795.34 ± 2869.50   | 4129.20 ± 1284.42   |
| 7  | 0.3421 | 5975.73 ± 2335.37   | 7832.68 ± 2614.95   | 6066.77 ± 2832.85   |
| 8  | 0.0165 | 0.00 ± 0.00         | 3525.74 ± 2061.83   | 3924.23 ± 2022.82   |
| 9  | 0.6458 | 5093.46 ± 1038.37   | 6200.44 ± 2318.12   | 4627.64 ± 1498.20   |
| 10 | 0.9759 | 8340.30 ± 2770.40   | 7935.80 ± 4065.39   | 8311.58 ± 868.96    |
| 12 | 0.8617 | 6898.81 ± 6498.31   | 5082.69 ± 3439.95   | 2617.27 ± 680.62    |
| 13 | 0.7604 | 2997.83 ± 1729.75   | 3278.43 ± 590.28    | 2917.25 ± 1431.68   |
| 17 | 0.2869 | 0.00 ± 0.00         | 904.10 ± 417.95     | 450.48 ± 287.85     |
| 19 | 0.5259 | 0.00 ± 0.00         | 2275.15 ± 408.95    | 1499.23 ± 256.80    |
| 21 | 0.0200 | 0.00 ± 0.00         | 694.41 ± 283.92     | 0.00 ± 0.00         |
| 26 | 0.6842 | 8418.10 ± 3191.25   | 8433.27 ± 3106.36   | 6842.77 ± 2340.79   |
| 28 | 0.5990 | 0.00 ± 0.00         | 8928.68 ± 6113.81   | 5648.05 ± 1025.78   |
| 43 | 0.0233 | 5341.75 ± 4409.74   | 0.00 ± 0.00         | 0.00 ± 0.00         |
| 59 | 0.3465 | 5421.18 ± 2100.03   | 4426.48 ± 2037.57   | 3386.26 ± 1354.26   |
| 60 | 0.1333 | 6007.57 ± 2268.75   | 4051.46 ± 2216.50   | 2937.47 ± 1158.36   |
| 67 | 0.0524 | 0.00 ± 0.00         | 3844.43 ± 2535.77   | 0.00 ± 0.00         |
| 68 | 0.8523 | 3044.06 ± 889.67    | 3937.62 ± 397.00    | 4342.44 ± 502.71    |
| 75 | 0.3333 | 14697.35 ± 6554.84  | 19209.18 ± 14693.24 | 11025.82 ± 7291.38  |
| 76 | 0.0503 | 0.00 ± 0.00         | 4724.76 ± 462.04    | 7424.29 ± 1086.80   |
| 77 | 0.1484 | 1797.70 ± 980.96    | 1215.52 ± 781.21    | 0.00 ± 0.00         |
| 80 | 0.0944 | 0.00 ± 0.00         | 2865.59 ± 1501.95   | 1596.74 ± 687.77    |
| 81 | 0.0108 | 0.00 ± 0.00         | 2023.13 ± 593.33    | 0.00 ± 0.00         |
| 82 | 0.5603 | 3829.84 ± 3197.59   | 3859.96 ± 1847.27   | 0.00 ± 0.00         |
| 83 | 0.0438 | 0.00 ± 0.00         | 2434.97 ± 297.95    | 1825.58 ± 198.74    |
| 85 | 0.1728 | 18833.88 ± 3185.07  | 19554.42 ± 2147.98  | 22685.34 ± 2944.26  |
| 86 | 0.2075 | 26547.22 ± 4097.37  | 25585.34 ± 4780.12  | 30624.46 ± 2447.86  |
| 87 | 0.2761 | 31557.10 ± 8748.86  | 33353.96 ± 7162.66  | 39649.46 ± 4196.33  |
| 88 | 0.1851 | 7918.63 ± 3557.87   | 4978.43 ± 937.63    | 7956.02 ± 1890.66   |
| 89 | 0.0458 | 0.00 ± 0.00         | 5700.81 ± 3546.76   | 0.00 ± 0.00         |
| 91 | 0.1053 | 15873.97 ± 5693.01  | 22203.53 ± 2856.91  | 25988.53 ± 8169.56  |
| 92 | 0.5494 | 7087.01 ± 3093.67   | 5407.35 ± 1484.21   | 6540.31 ± 1405.51   |
| 93 | 0.8599 | 27629.82 ± 22615.85 | 14926.05 ± 7655.13  | 13168.49 ± 5951.63  |
| 94 | 0.3237 | 7350.05 ± 175.88    | 12279.59 ± 4390.07  | 6014.84 ± 2926.00   |
| 95 | 0.0565 | 6852.79 ± 1271.77   | 7854.03 ± 974.19    | 9078.62 ± 1068.15   |

|     |        |                      |                      |                      |
|-----|--------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 96  | 0.3191 | 4039.66 ± 2054.48    | 3127.41 ± 1037.31    | 2459.17 ± 715.26     |
| 97  | 0.5864 | 7351.95 ± 3470.46    | 5785.96 ± 1479.99    | 7515.44 ± 2252.13    |
| 98  | 0.0933 | 7983.09 ± 2303.72    | 9666.20 ± 1586.96    | 6598.61 ± 1115.01    |
| 100 | 0.5138 | 13709.61 ± 10997.86  | 17233.25 ± 9342.28   | 18149.63 ± 9725.91   |
| 101 | 0.0665 | 3938.02 ± 646.93     | 9523.18 ± 4714.86    | 6307.02 ± 2904.84    |
| 103 | 0.6153 | 13902.21 ± 9119.89   | 9741.42 ± 4929.15    | 10752.95 ± 1645.08   |
| 105 | 0.8883 | 2923.43 ± 76.14      | 2175.33 ± 236.95     | 0.00 ± 0.00          |
| 106 | 0.8239 | 33057.85 ± 8751.39   | 29302.15 ± 9307.93   | 29198.40 ± 11394.61  |
| 107 | 0.6187 | 4304.74 ± 1791.74    | 4433.19 ± 3006.61    | 3111.95 ± 568.30     |
| 108 | 0.3472 | 0.00 ± 0.00          | 7376.65 ± 3840.44    | 4073.04 ± 765.94     |
| 109 | 0.8569 | 2284.33 ± 938.78     | 1663.38 ± 697.71     | 2159.52 ± 942.06     |
| 110 | 0.0900 | 29952.62 ± 5775.16   | 32944.45 ± 5866.77   | 39838.69 ± 5394.35   |
| 111 | 0.0491 | 10253.03 ± 5509.78   | 9172.76 ± 1795.53    | 16035.96 ± 2119.50   |
| 113 | 0.1644 | 7666.32 ± 1701.82    | 5394.66 ± 2066.65    | 7667.09 ± 1458.63    |
| 114 | 0.5693 | 29201.83 ± 5312.24   | 30170.99 ± 9207.04   | 34033.91 ± 4203.03   |
| 115 | 0.5903 | 48756.09 ± 9610.53   | 43142.13 ± 14123.13  | 50816.85 ± 6835.77   |
| 116 | 0.1923 | 112981.39 ± 42382.41 | 79415.95 ± 7572.53   | 82642.28 ± 14581.09  |
| 117 | 0.0324 | 25686.99 ± 9555.64   | 15809.11 ± 6350.27   | 10508.29 ± 2625.11   |
| 118 | 0.0061 | 0.00 ± 0.00          | 1883.92 ± 372.44     | 2687.76 ± 1144.67    |
| 120 | 0.2322 | 73120.26 ± 50538.86  | 53926.23 ± 18811.97  | 100054.66 ± 29979.85 |
| 121 | 0.0741 | 11815.30 ± 4156.93   | 6425.29 ± 791.87     | 6778.70 ± 3612.29    |
| 124 | 0.9610 | 18819.57 ± 18059.26  | 20904.75 ± 4400.44   | 19317.58 ± 3209.45   |
| 125 | 0.6618 | 144931.37 ± 58707.17 | 107173.89 ± 61594.85 | 106685.12 ± 78239.00 |
| 126 | 0.5523 | 7078.75 ± 967.17     | 5003.34 ± 1492.73    | 0.00 ± 0.00          |
| 128 | 0.0710 | 27739.32 ± 14001.52  | 0.00 ± 0.00          | 11695.85 ± 6706.47   |
| 129 | 0.0425 | 15248.09 ± 7154.91   | 0.00 ± 0.00          | 16677.49 ± 9916.17   |
| 130 | 0.5089 | 30552.07 ± 22779.81  | 17045.35 ± 10788.75  | 20165.09 ± 13709.87  |
| 134 | 0.4507 | 130814.36 ± 52296.12 | 72934.01 ± 70468.78  | 109577.47 ± 64018.63 |
| 135 | 0.0420 | 70271.83 ± 20074.95  | 33474.15 ± 15431.91  | 45745.86 ± 16549.82  |
| 136 | 0.4644 | 7316.18 ± 2444.16    | 4655.81 ± 5455.74    | 3799.60 ± 2135.56    |
| 137 | 0.0059 | 16943.54 ± 6267.66   | 4687.94 ± 4051.30    | 5516.53 ± 4950.17    |
| 139 | 0.1219 | 43712.07 ± 21147.92  | 20637.44 ± 12202.89  | 21528.05 ± 12970.50  |
| 141 | 0.0246 | 8583.47 ± 4999.50    | 0.00 ± 0.00          | 5884.46 ± 2684.05    |
| 142 | 0.3583 | 2466.61 ± 1321.39    | 2682.24 ± 1347.65    | 3710.59 ± 1018.94    |
| 144 | 0.8219 | 5028.31 ± 2157.88    | 5987.26 ± 1277.59    | 3320.31 ± 611.79     |
| 146 | 0.0448 | 7885.15 ± 4859.79    | 0.00 ± 0.00          | 0.00 ± 0.00          |
| 153 | 0.3518 | 18889.19 ± 10016.00  | 34071.10 ± 28746.80  | 36763.59 ± 21175.92  |
| 155 | 0.0113 | 0.00 ± 0.00          | 1472.41 ± 374.34     | 0.00 ± 0.00          |

## Anexo V

Contenido de humedad inicial de las semillas del lote 50.

De acuerdo con el ISTA (2011) el contenido de humedad se expresa como el peso del agua contenida como un porcentaje del peso total de la semilla antes del secado (porcentaje de peso húmedo).

Se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso fresco}} \times 100$$

La importancia del contenido de humedad (CH) para mantener vivas las semillas almacenadas radica en brindarle control a las operaciones de secado preparándolo para el almacenamiento y comprobando la estabilidad del contenido de humedad. (FAO, 2014)

Metodología:

Pesar 5 g de semilla, una vez realizado, se coloca en la estufa para su secado a una temperatura de 103° C. durante un periodo de 18 horas, al término del tiempo se vuelve a pesar para obtener el peso seco, en base a esto se realiza la operación, obteniendo el contenido de humedad (ISTA, 2011).

De este proceso se realizó una réplica, donde la desviación estándar no demostró ser mayor a un 5.0%

Tabla 9. Porcentajes de humedad relativa del lote 50 usado en el estudio.

| Muestras | Muestra pesada | Muestra seca | Peso caja | Semilla seca | % humedad |
|----------|----------------|--------------|-----------|--------------|-----------|
| 50A      | 5.0079         | 97.98        | 93.35     | 4.63         | 7.6       |
| 50B      | 5.0137         | 75.13        | 70.52     | 4.61         | 8.0       |
| Promedio |                |              |           | 4.62         | 7.8       |