

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN**

**Estudios fisiológicos y bioquímicos relacionados con la conservación de germoplasma vegetal de *Phaseolus vulgaris* L, *Glycine max* L y *Zea mays* L en nitrógeno líquido.**

**Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.**

**Katherine Melissa Arguedas Murillo**

**CARTAGO, 2014**



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN**

**Estudios fisiológicos y bioquímicos relacionados con la conservación de  
germoplasma vegetal de *Phaseolus vulgaris* L, *Glycine max* L y *Zea mays* L en  
nitrógeno líquido.**

**Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.**

**Katherine Melissa Arguedas Murillo**

**CARTAGO, 2014**

**TEC** | Tecnológico  
de Costa Rica



# **Estudios fisiológicos y bioquímicos relacionados con la conservación de germoplasma vegetal de *Phaseolus vulgaris* L, *Glycine max* L y *Zea mays* L en Nitrógeno líquido.**

**Katherine Melissa Arguedas Murillo**

## **RESUMEN**

La presente investigación tuvo como objetivo estudiar el efecto del almacenamiento de semillas de frijol, soya y maíz en Nitrógeno líquido, mediante 7 pruebas bioquímicas y fisiológicas. Después del almacenamiento en LN durante diferentes períodos de tiempo (0, 7, 14, 21, 28 días), las semillas fueron recuperadas del LN, 30 % se destinaron para pruebas fisiológicas y 70% se compararon bioquímicamente. Se analizó la germinación, pérdida de electrolitos, niveles de clorofila (a, b, total), compuestos fenólicos (libres, ligados a la pared celular, total), malondialdehído, otros aldehídos, proteínas totales, actividad peroxidasa y actividad específica de peroxidasas. La viabilidad de las semillas no fue alterada por la crioconservación. A nivel bioquímico se encontraron variaciones estadísticamente significativas, para frijol en pérdida de electrolitos, en los niveles de pigmentos de clorofila, compuestos fenólicos, proteínas totales; en soya en pérdida de electrolitos, en los niveles de pigmentos de clorofila, malondialdehídos, compuestos fenólicos y actividad peroxidasa; para maíz en los niveles de pigmentos de clorofila, fenoles libres y actividad peroxidasa. En conclusión se ha demostrado que la inmersión en LN de semillas de frijol, soya y maíz presentaron cambios bioquímicos a los 7, 14, 21 y 28 días después de su recuperación del Nitrógeno Líquido. Se recomienda continuar estos estudios para entender los cambios bioquímicos observados.

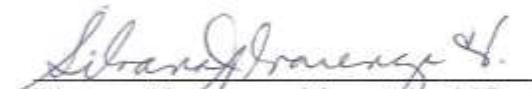
**Estudios fisiológicos y bioquímicos relacionados con la conservación de  
germoplasma vegetal de *Phaseolus vulgaris* L, *Glycine max* L y *Zea mays* L en  
Nitrógeno líquido.**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

**Miembros del Tribunal**



Ana Abdelnour Esquivel, PhD  
Profesora Asesora ITCR



Silvana Alvarenga Venutolo, MSc  
Profesora Asesora ITCR



Giovanni Garro Monge, MSc  
Lector

## **DEDICATORIA**

A mi madre por transmitirme su confianza y seguridad.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al personal del Centro Bioplantas, por su apoyo durante la ejecución de esta práctica.

A mis tutores Dr. Marcos Edel Martínez Montero por su orientación y al Dr. José Carlos Lorenzo Feijoo por sus recomendaciones y por la ayuda brindada, muy especialmente a la Dra. Aurora Pérez por su desinteresada ayuda y sus valiosos aportes y sugerencias.

A los funcionarios de Bioplantas, por el apoyo logístico para la ejecución del proyecto, especialmente a Julia, Alitza, Mayelin y Orleans por su apoyo incondicional en las labores de laboratorio.

Al Instituto Tecnológico de Costa Rica, por el apoyo financiero.

Esencialmente a la Dra. Ana Abdelnour Esquivel, profesora consejera, por sus aportes y sugerencias, por haber tenido tanta paciencia conmigo al perdonarme mis caprichos, así como su incondicionalidad.

A los miembros del Tribunal evaluador, por su guía y sus valiosas observaciones.

A las Dra, Lourdes Yabor y Dra. Martha Hernández quienes tanto colaboraron en este proyecto.

A Orleans, Robert, Karel, Katia, Dairo, Gerald.

A mis familiares, a mis amigos en especial a mis Padres.

A todos los que he olvidado mencionar, y ofrecieron su cooperación.

A todos los que me ayudaron a llegar a la meta...

...sin ustedes nada hubiese sido posible.

Sencillamente gracias!!!

## INDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
RESUMEN.....	i
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE GENERAL.....	v
INDICE DE CUADROS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE ANEXOS.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECIFICOS.....	5
Objetivo General.....	5
Objetivos específicos.....	5
MATERIALES Y METODOS.....	6
Procedimientos generales.....	6
Germinación.....	6
Pérdida de electrolitos.....	7
Clorofila.....	7
Malonaldehído y otros aldehídos.....	7
Fenoles ligados a la pared celular, libres y totales.....	8
Proteínas totales.....	8
Actividad peroxidasas y actividad específica de peroxidasas.....	9
RESULTADOS.....	10
Germinación.....	14
Pérdida de electrolitos.....	15
Clorofila.....	16
Malondialdehído y otros aldehídos.....	19
Fenoles ligados a la pared celular, libres y totales.....	21
Proteínas totales.....	23
Actividad peroxidasa y actividad específica de peroxidasas.....	24

DISCUSION DE RESULTADOS .....	26
Germinación .....	27
Pérdida de electrolitos .....	27
Clorofila .....	28
Malondialdehído y otros aldehídos .....	28
Fenoles ligados a la pared celular, libres y totales.....	29
Proteínas totales.....	29
Actividad peroxidasas y actividad específica de peroxidasas .....	30
CONCLUSIONES.....	31
RECOMENDACIONES.....	32
BIBLIOGRAFIA .....	33
ANEXOS .....	37

## INDICE DE CUADROS

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Efecto de inmersión de las semillas <i>Phaseolus vulgaris</i> L. en Nitrógeno Líquido durante diferentes periodos de tiempo. Los indicadores fueron medidos inmediatamente post crioconservación.	11
2	Efecto de inmersión de las semillas <i>Glycine max</i> L. en Nitrógeno Líquido durante diferentes periodos de tiempo. Los indicadores fueron medidos inmediatamente post crioconservación.	12
3	Efecto de inmersión de las semillas <i>Zea mays</i> L. en Nitrógeno Líquido durante diferentes periodos de tiempo. Los indicadores fueron medidos inmediatamente post crioconservación.	13
4	Coficiente Global de variación en el efecto de inmersión de las semillas <i>Phaseolus vulgaris</i> L; <i>Glycine max</i> L. y <i>Zea mays</i> L en Nitrógeno Líquido durante diferentes periodos de tiempo.	14

## INDICE DE FIGURAS

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Porcentaje de germinación al quinto día post crioconservación de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.	15
2	Porcentaje de pérdida de electrolitos de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.	16
3	Concentración total de clorofila ( $\mu\text{g/g}$ masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.	17
4	Concentración de clorofila a ( $\mu\text{g/g}$ masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.	18
5	Concentración de clorofila b ( $\mu\text{g/g}$ masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.	18
6	Concentración MDA ( $\mu\text{g/g}$ masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.	20
7	Concentración de otros aldehídos ( $\mu\text{g/g}$ masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.	20
8	Concentración total de fenoles ( $\mu\text{g/g}$ masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.	21
9	Concentración fenoles libres ( $\mu\text{g/g}$ masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.	22
10	Concentración fenoles ligados a la pared celular ( $\mu\text{g/g}$ masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.	22
11	Concentración de proteínas totales ( $\text{mg/g}$ masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.	23
12	Actividad peroxidasa ( $\text{U/mg}$ masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.	24
13	Actividad específica de peroxidasa ( $\text{U/mg}$ masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.	25

## INDICE DE ANEXOS

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Ecuación de pérdida de electrolitos	37
2	Calculo de concentración de clorofilas	37
3	Calculo de concentración de MDA y otros aldehídos	37
4	Cálculo del contenido de fenoles ligados, libres y totales.	38
5	Curva de patrón de Bradford	39
6	Calculo de actividad peroxidasas y actividad específica de peroxidasas	39

## INTRODUCCIÓN

En la biotecnología vegetal, la técnica de conservación de material vegetal en Nitrógeno Líquido (LN) ha sido ampliamente estudiada, y los esfuerzos se han dirigido a optimizar y comprender mejor los protocolos desarrollados, buscando la mayor eficiencia en la crioconservación. De esta forma se asegura la disponibilidad de variabilidad genética de las especies y la preservación de la biodiversidad vegetal (Rivero *et al.*, 2009). Sin embargo, no se conoce con detalle el efecto del LN en los procesos bioquímicos del germoplasma.

Inicialmente, el crio almacenamiento de semillas en LN fue desarrollado para la conservación de los recursos genéticos de las especies de importancia agrícola. Permite el almacenamiento de germoplasma de largo y corto plazo a bajo costo. Se cree que el LN reduce los índices metabólicos a tal nivel que todos los procesos bioquímicos se reducen de manera significativa y deterioro biológico prácticamente se detiene (Walters *et al.*, 2010).

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* L, *Glicine max* L y el grano de *Zea mays* se clasifican como ortodoxas. Demostraron en su comportamiento de almacenamiento ser tolerantes a la exposición al LN. Según Engelmann, 2004 la crioconservación es la única técnica actualmente disponible que asegura la conservación a largo plazo del germoplasma vegetal. A esta temperatura (-196 °C), las divisiones celulares y los procesos metabólicos se encuentran detenidos, por lo que el material vegetal puede ser almacenado sin alteración por un período de tiempo teóricamente ilimitado (González-Arno & Engelmann, 2006). Actualmente se responde a la creencia ideología de que los recursos fitogenéticos crioconservados pueden mantener su viabilidad infinitamente (Benson, 2008). Sin embargo, se busca obtener evidencias que soporten esta afirmación o por el contrario, que durante el periodo de exposición en LN si existen cambios significativos en los procesos bioquímicos.

En el centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila en Cuba, se desarrolló un proyecto de investigación sobre el efecto del LN en procesos bioquímicos y

fisiológicos de semillas de *P. vulgaris* y *Z. mays*. Actualmente hay publicaciones limitadas sobre la comprensión de los efectos bioquímicos producidos por la exposición al LN y de los cambios fisiológicos que se producen después del almacenamiento LN de estas semillas. Se tiene la hipótesis que la crioconservación no detiene totalmente los procesos bioquímicos de las semillas (Cejas et al., 2012).

Se recomienda estudiar, mediante indicadores bioquímicos y fisiológicos el efecto del Nitrógeno Líquido en la disminución de los procesos bioquímicos, evaluar el porcentaje de germinación, la pérdida de electrolitos, el contenido de Clorofila, mediciones del contenido de MDA y otros aldehídos, la concentración de fenoles, proteínas totales y la actividad de peroxidasas para determinar la detención de procesos bioquímicos de las semillas de *Phaseolus vulgaris* L. *Zea mays* L. y *Glycine max* L.

De los antecedentes descritos y a partir de la hipótesis: “Existe actividad bioquímica durante la crioconservación de *Phaseolus vulgaris* L, *Glycine max* L y *Zea mays* L”, el presente proyecto estudió el efecto del almacenamiento en LN a corto plazo, en el germoplasma de las semillas mencionadas. Después del almacenamiento en nitrógeno líquido durante diferentes períodos de tiempo (0, 7, 14, 21, 28 días), las semillas fueron descongeladas y se procedió a evaluar los indicadores mencionados, ya que están relacionadas con una amplia gama de importantes vías bioquímicas y fisiológicas tales como, las de respuesta al estrés.

Por lo tanto, en el presente trabajo se trató de confirmar la presencia de actividad metabólica durante la crioconservación en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. *Zea mays* L. y *Glycine max* L. Se efectuaron pruebas fisiológicas como el porcentaje de germinación y el porcentaje de pérdida de electrolitos de las semillas post crioconservación. Además, se calculó y determinó el efecto post crioconservación en los indicadores bioquímicos: clorofila, aldehídos, niveles de fenoles y actividad proteica.

## REVISIÓN DE LITERATURA

Los cereales y las leguminosas constituye gran parte de la dieta humana y animal, en Latinoamérica el consumo de maíz y frijoles son culturalmente preferidos, la soya ha abierto su mercado de consumo poco a poco, consecuentemente ninguno de estos cultivos deja de ser menos importante.

Según la FAO (2012) se estima que en Costa Rica se cultivan anualmente 21600 hectáreas de frijol, 7600 hectáreas de maíz. En Cuba 125000 hectáreas de frijol y 145000 hectáreas de maíz y en ambos países la soya se importa.

El frijol pertenece a la familia de las Fabáceas, formando parte del patrón alimentario; es la principal fuente de proteína, hierro y fibra en la dieta de los costarricenses. Es un alimento muy apreciado principalmente su grano entero (MAG, 2007); de allí la importancia de preservar la integridad de la semilla.

La soya también pertenece a la familia de las Fabáceas, es una gran fuente de proteína, la leche y el aceite son algunos de sus derivados (MAG, sf).

El maíz pertenece a la familia de las Poáceas, *Zea mays* es la única especie cultivada de las Maydeas. El maíz tiene usos múltiples y variados. Es el único cereal que puede ser usado como alimento en distintas etapas del desarrollo de la planta. Entre sus derivados se encuentra la harina, el aceite y bebidas alcohólicas (MAG, 2007).

En las últimas décadas la conservación de los recursos fitogenéticos ha adquirido relevancia, para asegurar disponibilidad de variabilidad genética de especies de importancia socioeconómica actual y potencial, en calidad y cantidad adecuadas (Rivero *et al.*, 2009).

Existe una gran diversidad de métodos para conservar material biológico, entre los cuales la conservación a ultra-bajas temperaturas (crioconservación) presenta grandes ventajas sobre las colecciones tradicionales en campo y las colecciones *in vitro*. Las colecciones de campo son propensas a plagas, enfermedades y condiciones climáticas adversas. Por otro lado, el mantenimiento de colecciones *in vitro* establecidas requieren

de grandes espacios y mano de obra calificada (Rivero *et al.*, 2009). La crioconservación requiere un mínimo mantenimiento, un espacio reducido y no existen riesgos de inestabilidad genética (González-Arno & Engelmann, 2006).

Con respecto a la comprensión de los efectos bioquímicos de la exposición LN y de los cambios fisiológicos que ocurren después de un almacenamiento de semillas LN existen pocos estudios (Uragami *et al.*, 1993; Lakhanpaul *et al.*, 1996; Harding 2004; Engelmann y Ramanatha 2012; Zevallos *et al.*, 2013a; Zevallos *et al.*, 2013b).

Zevallos *et al.*, (2013b), exploró el efecto de la crioconservación en tomate silvestre (*Solanum lycopersicum* Mill.) En periodos de tiempo de 0 a 28 días estudió el porcentaje de germinación y los niveles de compuestos fenólicos en hoja, tallo y raíz. Con respecto a la germinación se obtuvo un 60% sin cambios fenotípicos observados en las plántulas. En general, se percibió una disminución significativa de compuestos fenólicos con respecto al control en las muestras de raíces y tallo; sin embargo para el muestreo de 28 días en LN se notó un aumento.

Cejas *et al.*, (2012) publicó los efectos del almacenamiento a corto plazo en LN en las primeras etapas de la germinación de *Phaseolus vulgaris* (0, 7 y 14 días). Estudió los porcentajes de germinación, los niveles de pigmentos de clorofila (a, b, total), malondialdehído, otros aldehídos, fenoles (ligados a la pared celular, libres y total) y total de proteínas. No se observaron cambios fenotípicos en plántulas. A nivel bioquímico sí se registraron variaciones. Entre ellos un aumento significativo de los niveles de otros aldehídos, malondialdehído en los brotes en el día 7; y una reducción significativa en los contenidos fenólicos en las raíces en el día 7.

## **OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECIFICOS**

### ***Objetivo General***

Estudiar el efecto del almacenamiento de semillas de *Phaseolus vulgaris L.*, *Zea mays L.* y *Glycine max L.* en nitrógeno líquido mediante 7 pruebas bioquímicas y fisiológicas postcrioconservación.

### ***Objetivos específicos***

- Confirmar la presencia de actividad metabólica durante la crioconservación en semillas de *Phaseolus vulgaris L.*, *Zea mays L.* y *Glycine max L.*
- Evaluar pruebas fisiológicas como el porcentaje de germinación y el porcentaje de pérdida de electrolitos de semillas de *Phaseolus vulgaris L.*, *Zea mays L.* y *Glycine max L.*
- Calcular y determinar el efecto de postcrioconservación en los indicadores bioquímicos: clorofila, aldehídos, niveles de fenoles y actividad proteica.

## MATERIALES Y METODOS

### Procedimientos generales.

Las investigaciones se realizaron en el Centro de Bioplantitas de la Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. Como material vegetal se utilizaron semillas de *Phaseolus vulgaris* L. (cv. *Milagro villaclareño*) procedentes de Villa Clara; *Glycine max* L (INFAT V-9) y *Zea mays* (Tuzón) procedentes de Ciego de Ávila, Cuba. Las semillas se mantuvieron almacenadas desde su recolección hasta uso experimental en contenedores herméticos en la oscuridad a 4°C. Para los ensayos se utilizaron semillas con 12% de contenido de humedad, las que colocaron en crio-viales de 5 ml, un promedio de 15 semillas por vial sin criopresevantes y fueron sumergidas en LN durante 7, 14, 21 y 28 días.

Las semillas control (-LN) fueron germinadas y analizadas directamente. El descongelamiento de las semillas se realizó a temperatura ambiente (27±1°C y 85% HR) durante 20 min. Se separaron 30 semillas de cada tratamiento para evaluar la germinación y la pérdida de electrolitos las semillas restantes fueron trituradas un molino eléctrico hasta obtener harina (tamiz de 1,5 mm) para realizar las pruebas bioquímicas correspondientes.

Para el análisis estadístico se empleó el utilitario SPSS, versión 17.0 para Windows. Se usaron pruebas paramétricas (ANOVA, Tukey  $p>0,05$ ). También se calcularon los coeficientes de variación global (OVGs). El diseño experimental que se utilizó se describe en cada experimento. Las figuras en el acápite de Resultados incluyen la información de las pruebas estadísticas que se realizaron en cada caso.

### Germinación

Para evaluar la germinación de las semillas se realizaron 3 réplicas con 5 semillas por tratamiento. Se colocaron las semillas sobre papel filtro en una placa Petri (Ø: 100 mm)

con 15 ml de agua destilada durante 5 días en oscuridad a una temperatura  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  y 85% HR. Se calculó el porcentaje de germinación por réplica.

### **Pérdida de electrolitos**

El porcentaje de pérdida de electrolitos se determinó según el método de Martínez-Montero *et al.*, (2002). Se realizaron 3 réplicas con 5 semillas por tratamiento, colocadas en un tubo de ensayo con 20 ml de agua destilada. Se midió la conductividad inicial del agua, a las 24 horas, luego se hirvieron las semillas durante una hora en baño maría, posteriormente se midió la conductividad del agua a temperatura ambiente. Se calculó el porcentaje de pérdida de electrolitos con la fórmula del anexo 1.

### **Clorofila**

La concentración de clorofila a, b y total se determinó según el método de Porras (1991). Se realizaron 3 réplicas de cada tratamiento, se tomaron 100 mg de harina de cada especie, posteriormente se adicionaron 0,5 mL de acetona al 80% (v:v). Las muestras se centrifugaron 15 minutos a 12 000 rpm. Se colectó el sobrenadante y se evaluó la absorbancia a 647 nm y 664 nm en un espectrofotómetro UV visible Phamacia LKB-Ultrospec III. El cálculo de la concentración de clorofilas se muestra en el Anexo 2.

### **Malonaldehído y otros aldehídos**

La concentración de malondialdehído (MDA) y otros aldehídos se determinó por el procedimiento descrito por Heath y Packer (1968). Se realizaron 3 réplicas de cada tratamiento se tomaron 100 mg de harina de cada especie, posteriormente se mezclaron con 1,4 mL de agua destilada, y se agitaron brevemente. Se adicionaron 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,5% (m/v); en ácido tricloroacético 20% (v/v), y las muestras se incubaron en un baño termostatado a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 25 minutos. Luego se

colocaron en baño de hielo por cinco minutos y se centrifugaron 15 minutos a 12 000 rpm. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 455, 532 y 600 nm en un espectrofotómetro UV visible Phamacia LKB-Ultrospec III. El cálculo del contenido de MDA y otros aldehídos se muestra en el Anexo 3.

### **Fenoles ligados a la pared celular, libres y totales**

La concentración de Fenoles ligados a la pared celular, libres y totales se determinó por el procedimiento descrito por Gurr *et al.*, (1992). Se realizaron 3 réplicas de cada tratamiento, se tomaron 100 mg de harina de cada especie posteriormente se adicionó 0,5 mL de metanol se agitó brevemente y se centrifugó durante 5 minutos a 12 000 rpm. Se recolectó el sobrenadante para la determinación de fenoles libres. Se resuspendió el pellet en 0,25 mL de metanol, se centrifugó 5 minutos a 12 000 rpm, se recolecto el sobrenadante y se repitió este paso. Nuevamente se resuspendió el pellet en 0,25 mL de 2 M NaOH y se incubó en una estufa a 70°C durante 16 horas. Posteriormente se añadió 0,25 mL de HCL a 2 M pH 7 y se centrifugó durante 5 minutos a 120 000 rpm. Este sobrenadante se utilizó para determinar el contenido de fenoles ligados a la pared celular. Se procedió a utilizar el método de Folin para determinar los fenoles libres y ligados a la pared celular. Se realizaron 3 repeticiones, en cada eppendorf de añadió 0,95 mL de agua destilada y 0,05 mL de los sobrenadantes, 0,1 mL de reactivo de Folin y se agitó. Después de 5 minutos de agregó 0,6 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado en NaOH 1 M y se agitó. Se reposo una hora y se midió la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro UV visible Phamacia LKB-Ultrospec III. El cálculo del contenido de fenoles ligado, libres y totales se muestra en el Anexo 4.

### **Proteínas totales**

Los extractos proteicos se prepararon como establece el procedimiento de Jacobs *et al.*, (1999). Se realizaron 3 réplicas de cada tratamiento, se tomaron 1000 mg de harina de cada especie, posteriormente se adicionó una solución amortiguadora Tris-HCl 0,35

mol·L<sup>-1</sup>, pH 8,0, (50% de polivinilpirrolidona (PVP), 20 mmol·L<sup>-1</sup> de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y 15 mmol·L<sup>-1</sup> de cisteína) 1:6 (m/v). La homogeneización se realizó en homogeneizador Ultra-turrax T25. El homogenizado se centrifugó durante 20 minutos (Centrifuga Beckman, Modelo J2-21) a 12 000 rpm a 4°C. Se colectó el sobrenadante.

La concentración de proteínas totales se determinó por el procedimiento descrito por Bradford (1976). Se tomó 0,1 mL del extracto proteico y 1000 mL de reactivo de Bradford, se agitó brevemente. Luego de 5 minutos se midió la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro UV visible (Pharmacia LKB-Ultrospec III) y el contenido de proteínas se expresaron en mg·g<sup>-1</sup> de masa fresca, referidos a una curva patrón de albúmina de suero bovino (Anexo 5).

### **Actividad peroxidasas y actividad específica de peroxidasas**

La actividad guayacol peroxidasa se determinó según el método de Pascual *et al.*, (1983). La mezcla de reacción contenía: 100 µL de extracto proteínas, 650 µL de solución amortiguadora Tris-HCl (0,01 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7), 150 µL de guayacol (100 mmol·L<sup>-1</sup>) y 100 µL de peróxido de hidrógeno. Se evaluó la absorbancia a 470 nm cada 15 segundos durante 60 segundos. El promedio de la variación de la absorbancia en la sección lineal de la curva se tomó en consideración para estimar la actividad peroxidasa. En cada determinación se tuvo en cuenta la reacción espontánea en el tiempo para los sustratos guayacol y peróxido de hidrógeno. El cálculo de la actividad enzimática se muestra en el Anexo 6.

## RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestran los efectos de inmersión de las semillas *Phaseolus vulgaris* en Nitrógeno Líquido durante periodos de 0, 7, 14, 21 y 28 días. Los indicadores con la misma letra no son estadísticamente diferentes durante los 5 periodos de exposición a LN. Los siguientes indicadores de semillas de frijol que no son estadísticamente diferentes son: porcentaje de germinación en 5 días (Figura 1); la actividad de la peroxidasa (Figura 12) y la actividad específica de la peroxidasa (Figura 13). Los restantes 10 indicadores son estadísticamente diferentes (Figura 2 a la 11).

En el Cuadro 2 se muestran los efectos de inmersión de las semillas *Glycine max* en Nitrógeno Líquido durante periodos de 0, 7, 14, 21 y 28 días. Los indicadores con la misma letra no son estadísticamente diferentes durante los 5 periodos de exposición a LN. Los siguientes indicadores de semillas de soya que no son estadísticamente diferentes son: porcentaje de germinación en 5 días (Figura 1); el contenido de otros aldehídos (Figura 7); el contenido total de proteínas (Figura 11) y la actividad específica de la peroxidasa (Figura 13). Los restantes 9 indicadores son estadísticamente diferentes (Figura 1 a la 6; 8 a la 10 y 12).

En el Cuadro 3 se expresan los efectos de inmersión de las semillas *Zea mays* en Nitrógeno Líquido durante periodos de 0, 7, 14, 21 y 28 días. Los indicadores con la misma letra no son estadísticamente diferentes durante los 5 periodos de exposición a LN. Los siguientes indicadores de semillas de maíz que no son estadísticamente diferentes son: porcentaje de germinación en 5 días (Figura 1); el porcentaje de pérdida de electrolitos (Figura 2); el contenido de MDA (Figura 6); el contenido de otros aldehídos (Figura 7); el contenido total de fenoles (Figura 8); el contenido de fenoles ligados a la pared celular (Figura 10); el contenido total de proteínas (Figura 11) y la actividad específica de la peroxidasa (Figura 13). Los restantes 5 indicadores son estadísticamente diferentes (Figura 3 a la 5, 9 y 12).

En el cuadro 4 se muestran los valores de Coeficiente de variación global (CVG) para cada especie y el CVG total. Donde la clasificación de CVG es la siguiente: Desde 3.44 a 38.73% se cataloga como "bajo", desde 38.73 a 74.01% se cataloga como "medio" y

desde 74.01 a 109.30% se cataloga como "alto". Para frijol el indicador con menor variación (CVG de 3.44%) es el contenido total de Proteínas y el mayor (CVG de 82.45%) es porcentaje de pérdida de electrolitos. En soya el indicador más bajo (CVG de 3.53%) es el contenido total de proteínas y el más alto (CVG de 74.59%) la concentración de clorofila b. En maíz el indicador más bajo (CVG de 4.20%) es el contenido total de fenoles y la concentración de clorofila b mostraron una variación media (CVG de 61.27%). Finalmente el CVG de las 3 especies, el porcentaje de germinación mostró la variación más bajo (CVG de 8.83%) y la actividad específica peroxidasa mostró la mayor variación (CVG de 109.3%).

**Cuadro 1:** Efecto de inmersión de las semillas *Phaseolus vulgaris* L. en Nitrógeno Líquido durante diferentes periodos de tiempo. Los indicadores fueron medidos inmediatamente post crioconservación.

	Exposición a nitrógeno líquido (días)				
	0	7	14	21	28
Porcentaje de Germinación en 5 días	93.33	93.33	93.33	86.67	86.67
	a	a	a	a	a
Porcentaje de pérdida de electrolitos *	0.49	2.99	25.68	26.78	29.15
	b	b	a	a	a
Concentración total de clorofila ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca)	10.51	11.26	21.02	7.36	5.01
	b	b	a	b	b
Concentración clorofila a ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	5.81	7.14	10.16	3.90	3.31
	ab	ab	a	b	b
Concentración clorofila b ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	4.70	4.13	10.87	3.46	1.69
	b	b	a	b	b
Contenido de Malondialdehído ( $\mu\text{M g}^{-1}$ masa fresca) *	185.73	190.96	136.69	169.74	119.26
	a	a	a	a	a
Contenido de otros aldehídos ( $\mu\text{M g}^{-1}$ masa fresca)	5.40	5.05	3.97	5.14	4.15
	a	a	a	a	a
Contenido de fenoles totales ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	7570.02	7643.32	7818.65	8209.60	9561.87
	b	b	b	b	a
Contenido de fenoles libres ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	326.71	347.75	332.54	614.90	88.38
	b	b	b	a	c
Contenido de fenoles ligados a la pared ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca)	7243.31	7295.57	7486.11	7594.70	9473.48
	b	b	b	b	a
Contenido de proteínas totales ( $\text{mg g}^{-1}$ masa fresca) *	29.45	29.34	28.74	31.07	30.89
	ab	ab	b	a	a
Actividad peroxidasa ( $\text{U mg}^{-1}$ masa fresca) *	52.91	68.47	81.35	74.21	67.91
	a	a	a	a	a
Actividad específica de peroxidasa ( $\text{U mg}^{-1}$ masa fresca) *	1.80	2.32	2.83	2.39	2.20
	a	a	a	a	a

\* resultados con la misma letra no son estadísticamente diferente (ANOVA, Tukey,  $p > 0.05$ )

**Cuadro 2:** Efecto de inmersión de las semillas *Glycine max* L. en Nitrógeno Líquido durante diferentes periodos de tiempo. Los indicadores fueron medidos inmediatamente post crioconservación.

	Exposición a nitrógeno líquido (días)				
	0	7	14	21	28
Porcentaje de Germinación en 5 días *	93.33	93.33	80.00	93.33	73.33
	a	a	a	a	a
Porcentaje de pérdida de electrolitos *	0.65	2.63	2.36	3.63	4.37
	b	ab	ab	a	a
Concentración total de clorofila ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	7.29	7.72	10.89	3.68	20.49
	bc	bc	b	c	a
Concentración clorofila a ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	1.60	5.85	4.08	1.58	8.04
	c	ab	bc	c	a
Concentración clorofila b ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	5.69	1.87	6.81	2.10	12.45
	b	c	b	c	a
Contenido de Malondialdehído ( $\mu\text{M g}^{-1}$ masa fresca) *	58.22	169.88	103.36	102.27	136.01
	c	a	bc	bc	ab
Contenido de otros aldehídos ( $\mu\text{M g}^{-1}$ masa fresca) *	3.95	3.67	3.89	3.63	3.93
	a	a	a	a	a
Contenido de fenoles totales ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	9982.84	10870.40	11798.41	13283.78	11916.74
	b	b	ab	a	ab
Contenido de fenoles libres ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	793.52	813.97	608.98	940.32	534.11
	b	b	c	a	c
Contenido de fenoles ligados a la pared ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	9189.32	10056.43	11189.43	12343.46	11382.64
	c	bc	ab	a	ab
Contenido de proteínas totales ( $\text{mg g}^{-1}$ masa fresca) *	37.65	37.31	34.46	37.26	36.34
	a	a	a	a	a
Actividad peroxidasa ( $\text{U mg}^{-1}$ masa fresca) *	7.63	7.35	3.58	5.03	3.46
	a	ab	ab	ab	b
Actividad específica de peroxidasa ( $\text{U mg}^{-1}$ masa fresca) *	0.20	0.20	0.10	0.14	0.09
	a	a	a	a	a

\* resultados con la misma *letra* no son estadísticamente diferente (ANOVA, Tukey,  $p > 0.05$ )

**Cuadro 3:** Efecto de inmersión de las semillas *Zea mays* L. en Nitrógeno Líquido durante diferentes periodos de tiempo. Los indicadores fueron medidos inmediatamente post crioconservación.

	Exposición a nitrógeno líquido (días)				
	0	7	14	21	28
Porcentaje de Germinación en 5 días *	100.00	80.00	93.33	100.00	80.00
	a	a	a	a	a
Porcentaje de pérdida de electrolitos *	14.96	20.70	13.96	21.49	23.44
	a	a	a	a	a
Concentración total de clorofila ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	6.71	11.13	5.27	4.13	14.26
	bc	ab	bc	c	a
Concentración clorofila a ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	2.50	5.74	1.94	1.66	3.73
	ab	a	ab	b	ab
Concentración clorofila b ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	4.21	5.39	3.33	2.47	10.53
	c	ab	c	c	a
Contenido de Malonaldehído ( $\mu\text{M g}^{-1}$ masa fresca)	12.61	8.71	15.20	11.67	16.87
	a	a	a	a	a
Contenido de otros aldehídos ( $\mu\text{M g}^{-1}$ masa fresca)	1.52	0.87	1.70	1.48	1.50
	a	a	a	a	a
Contenido de fenoles totales ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	6387.94	6059.76	6753.91	6202.77	6495.46
	a	a	a	a	a
Contenido de fenoles libres ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	522.46	501.37	615.92	862.46	268.90
	b	b	b	a	c
Contenido de fenoles ligados a la pared ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca)	5865.48	5558.40	6137.99	5340.31	6226.56
	a	a	a	a	a
Contenido de proteínas totales ( $\text{mg g}^{-1}$ masa fresca)	11.89	11.22	10.28	11.85	15.91
	a	a	a	a	a
Actividad peroxidasa ( $\text{U mg}^{-1}$ masa fresca) *	9.67	6.67	7.78	10.65	13.37
	ab	b	ab	ab	a
Actividad específica de peroxidasa ( $\text{U mg}^{-1}$ masa fresca)	0.87	0.63	0.77	0.90	0.85
	a	a	a	a	a

\* resultados con la misma *letra* no son estadísticamente diferente (ANOVA, Tukey,  $p > 0.05$ )

**Cuadro 4:** Coeficiente de Variación Global (CVG) en el efecto de inmersión de las semillas *Phaseolus vulgaris* L; *Glycine max* L. y *Zea mays* L en Nitrógeno Líquido durante diferentes periodos de tiempo.

	CVG (%)* <i>Phaseolus vulgaris</i> L	CVG (%)* <i>Glycine max</i> L.	CVG (%)* <i>Zea mays</i> L	CVG(%)** Total
Porcentaje de Germinación en 5 días *	4.03	10.88	11.15	8.83
Porcentaje de pérdida de electrolitos *	82.45	51.73	22.19	84.22
Concentración total de clorofila ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	55.51	63.83	51.33	54.99
Concentración clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	45.33	65.93	53.57	58.17
Concentración clorofila <i>b</i> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	70.15	74.59	61.27	64.66
Contenido de Malondialdehído ( $\mu\text{M g}^{-1}$ masa fresca) *	19.50	36.63	24.34	72.61
Contenido de otros aldehídos ( $\mu\text{M g}^{-1}$ masa fresca) *	13.44	4.06	22.41	45.22
Contenido de fenoles totales ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	10.07	10.69	4.20	27.24
Contenido de fenoles libres ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	54.53	22.26	38.70	44.53
Contenido de fenoles ligados a la pared ( $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) *	11.97	11.32	6.46	28.11
Contenido de proteínas totales ( $\text{mg g}^{-1}$ masa fresca) *	3.44	3.53	17.65	40.92
Actividad peroxidasa ( $\text{U mg}^{-1}$ masa fresca) *	15.20	36.97	27.10	109.30
Actividad específica de peroxidasa ( $\text{U mg}^{-1}$ masa fresca) *	16.18	34.80	13.63	88.33

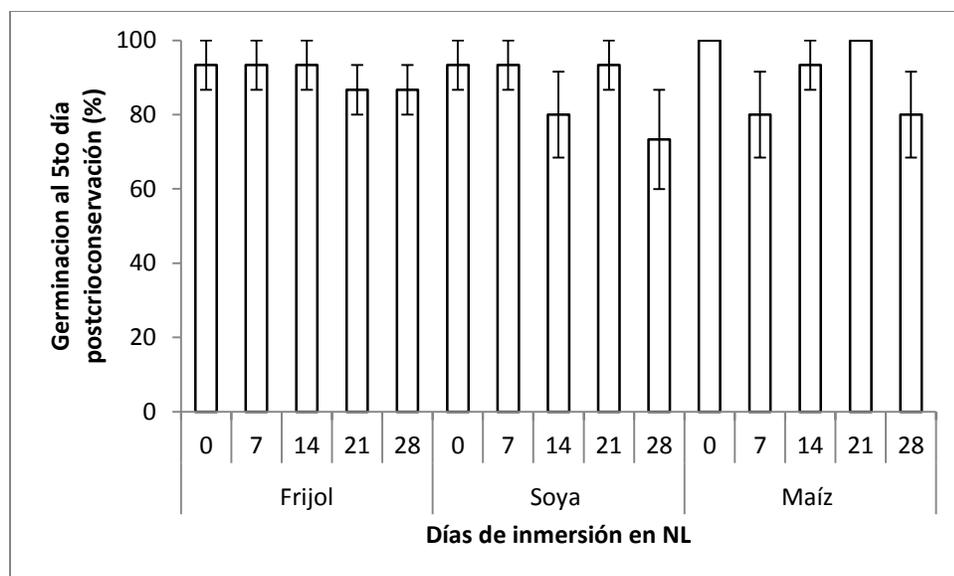
\* Coeficiente de variación global = (Desviación standard/media) x 100. Para calcular este coeficiente los 5 tiempos de exposición en nitrógeno líquido fueron considerados. Entre mayor la diferencia entre los tiempos de comparación, más alto es el coeficiente de variación global.

\*\* Coeficiente de variación global = (Desviación standard/media) x 100. Para calcular este coeficiente los 15 tiempos de exposición en nitrógeno líquido fueron considerados. Entre mayor la diferencia entre los 15 tiempos de comparación, más alto es el coeficiente de variación global.

Clasificación de CVG: Desde 3.44 a 38.73% se cataloga como "bajo", desde 38.73 a 74.01% se cataloga como "medio" y desde 74.01 a 109.30% se cataloga como "alto".

## Germinación

Con respecto al porcentaje de germinación de las tres especies estudiadas, los valores oscilaron entre 80% y 100% al quinto día después del descongelamiento (Figura 1, Cuadro 1, 2 y 3), no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de germinación después de los diferentes periodos de almacenamiento en LN. El Coeficiente de Variación Global Total (CVG total) fue de 8.83 % (Cuadro 4).

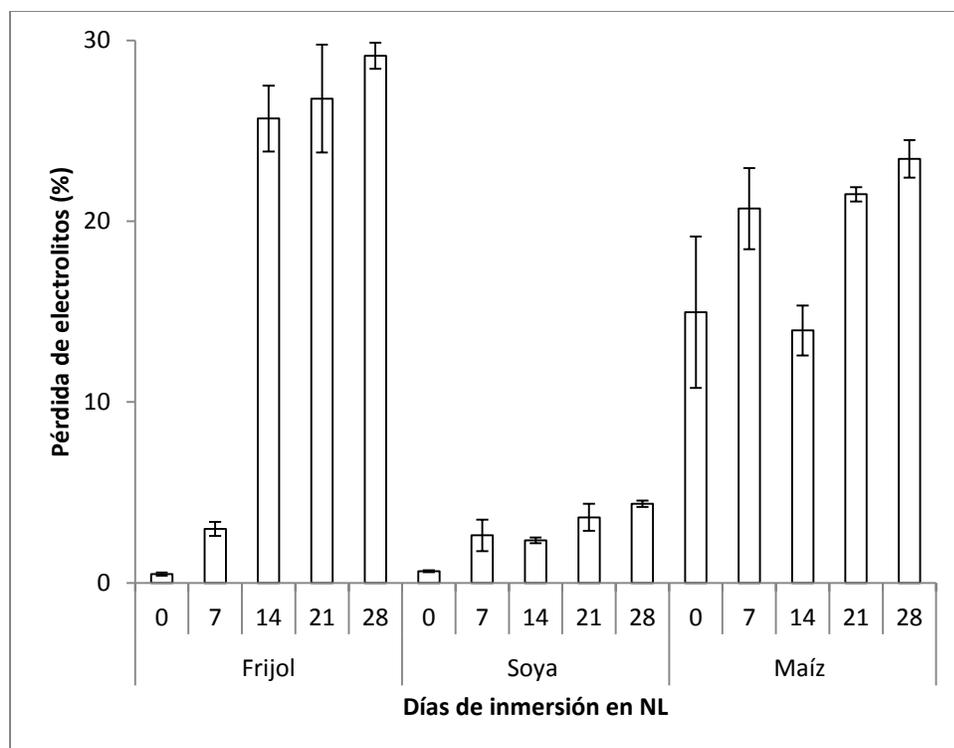


**Figura 1.** Porcentaje de germinación al quinto día post crioconservación de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.

### Pérdida de electrolitos

En el porcentaje de pérdida de electrolitos de semilla de frijol y soya si existe diferencias estadísticamente significativas y en las semillas de maíz no existiendo diferencias estadísticamente significativas después de los diferentes periodos de almacenamiento en LN (Figura 2).

*Phaseolus vulgaris* y *Glycine max* mostraron una tendencia creciente a mayor tiempo de inmersión en LN mayor pérdida de electrolitos; para un 29.15 % en frijol y 4.37% en soya al día 28 (Cuadro 1 y 2). *Zea mays* proyecta oscilaciones entre 14.96 % al día 0; 13.96 % al día 14 y 23.44 % al día 28 (Cuadro 3). El Coeficiente de Variación Global Total fue de 84.22 % (Cuadro 4).



**Figura 2.** Porcentaje de pérdida de electrolitos de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.

### Clorofila

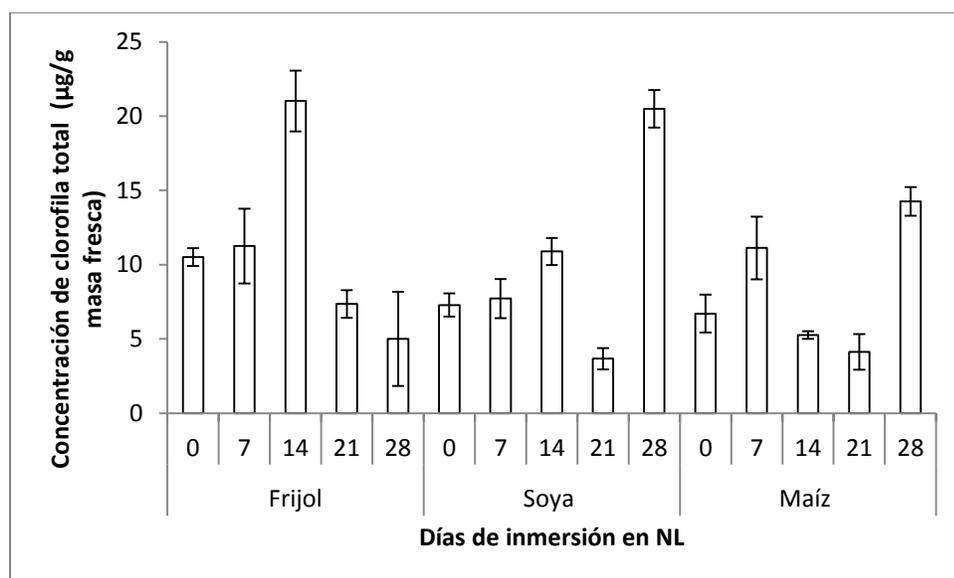
Con respecto a la concentración de clorofila total, *a* y *b*; en los tres casos para las 3 especies estudiadas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes periodos de almacenamiento en LN (Cuadro 1, 2, y 3, Figura 3, 4 y 5).

En Frijol las concentraciones clorofila total, *a* y *b*; tienen una tendencia oscilante entre 1.69  $\mu\text{g/g}$  y 21.02  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca: altas concentraciones a 14 días y bajas concentraciones a 28 días de inmersión en LN.

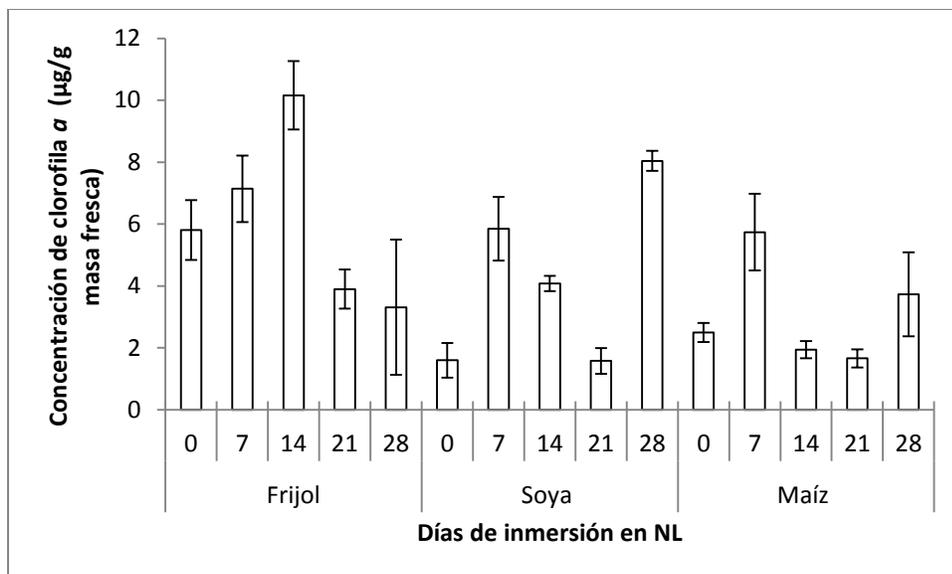
En soya las concentraciones clorofila total, *a* y *b*; mostraron concentraciones a 21 días son menores que la las concentraciones control, sin embargo altas concentraciones a 28 días. Oscilan entre 1.58  $\mu\text{g/g}$  y 20.49  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca.

En las semillas de maíz las concentraciones clorofila total, *a* y *b* fueron fluctuantes. La concentración de clorofila total y clorofila *b* fueron mínimas al día 21 y altas al día 28. En clorofila *a* las concentraciones fueron bajas al día 21 y altas a 7 días de inmersión en LN. Oscilan entre 1.66  $\mu\text{g/g}$  y 14.26  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca

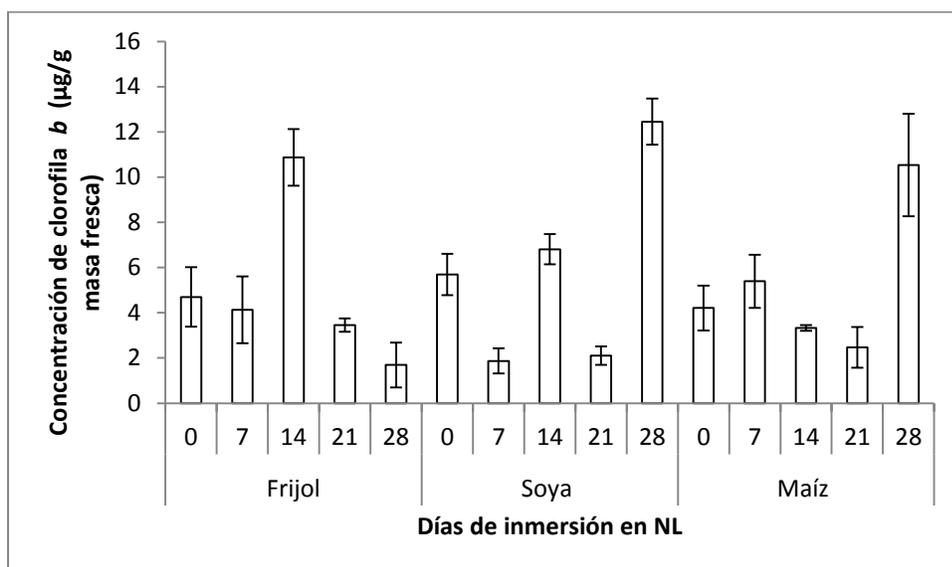
Se mostraron en el Cuadro 4 el Coeficiente de Variación Global Total de la concentración de clorofila tota, *a* y *b*; con 54.99 %, 58.17% y 64.66% respectivamente.



**Figura 3.** Concentración total de clorofila ( $\mu\text{g/g}$  masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.



**Figura 4.** Concentración de clorofila a ( $\mu\text{g/g}$  masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.



**Figura 5.** Concentración de clorofila b ( $\mu\text{g/g}$  masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.

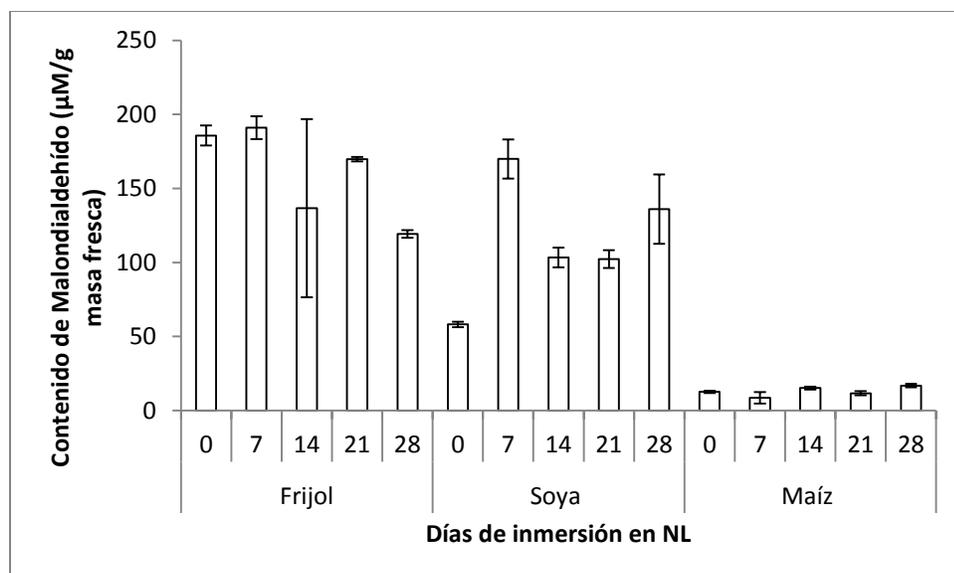
## Malondialdehído y otros aldehídos

En los cuadros 1, 2 y 3 se muestran que el contenido de Malondialdehído (MDA) en semillas de frijol y maíz, no se observaron diferencias estadísticamente significativas y en las semillas de soya se observaron diferencias estadísticamente significativas después de los diferentes periodos de almacenamiento en LN (Figura 6). El Coeficiente de Variación Global Total fue de 72.61 % (Cuadro 4).

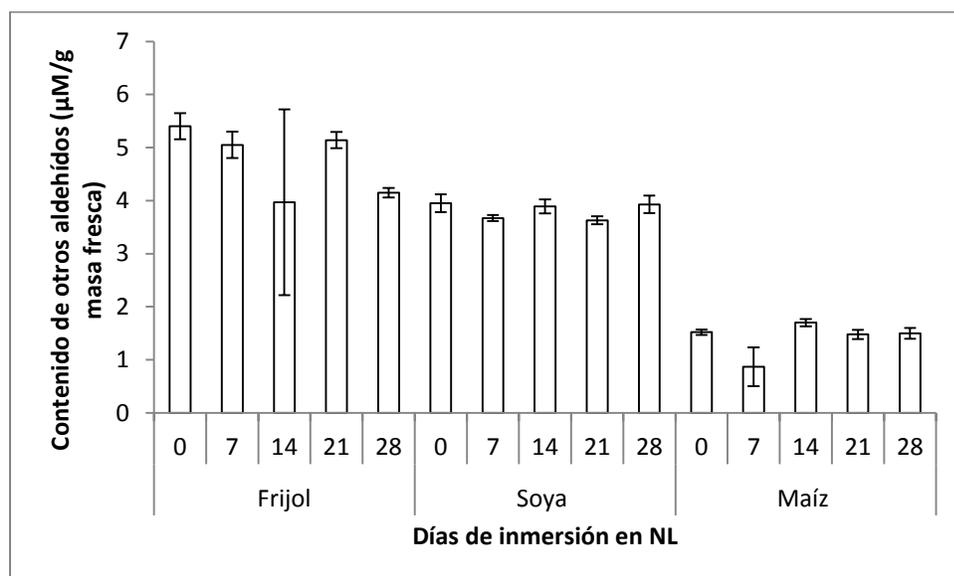
El contenido de MDA en frijol fue más alto el día 7 con 190.96  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca y más bajo el día 28 con 119.26  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca. En soya el contenido de MDA fue más alto el día 7 con 136.01  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca y el más bajo el control con 58.22  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca. En maíz el contenido de MDA fue más alto el día 28 con 16.87  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca y el más bajo el día 7 con 8.71  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca.

El contenido de otros aldehídos en las 3 especies (Cuadros 1,2, y 3) no observo diferencia estadísticamente significativa (Figura 7). El Coeficiente de Variación Global Total fue de 45.22 % (Cuadro 4).

El contenido de otros aldehídos en Frijol fue más alto el control con 5.40  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca y más bajo el día 14 con 3.97  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca. En Soya el contenido de otros aldehídos el más alto fue el control 3.95  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca y más bajo fue el día 21 con 3.63  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca. En maíz el contenido de otros aldehídos fue más alto el día 14 con 1.70  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca y más bajo el día 7 con 0.87  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca.



**Figura 6.** Concentración MDA ( $\mu\text{g/g}$  masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.

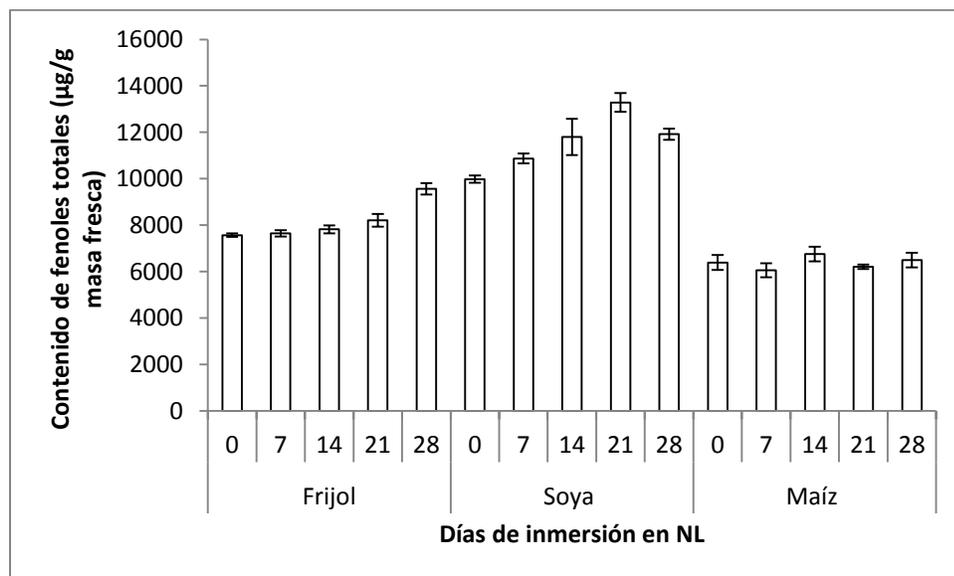


**Figura 7.** Concentración de otros aldehídos ( $\mu\text{g/g}$  masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.

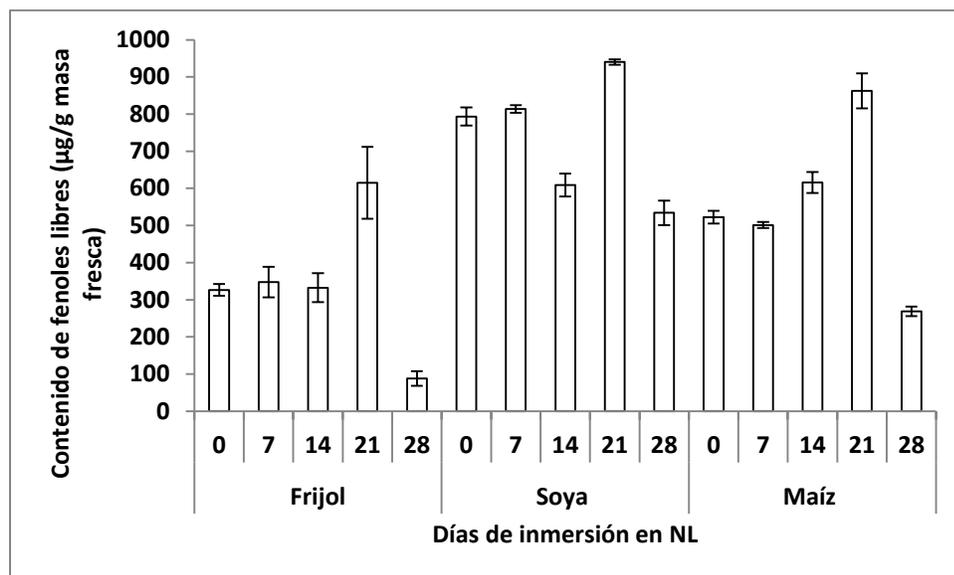
### Fenoles ligados a la pared celular, libres y totales

Respecto al contenido de fenoles totales, libres y ligados en las especies de frijol y soya (Cuadro 1 y 2) se observaron diferencias estadísticamente significativas; en las figuras 8, 9 y 10 se puede observar gráficamente. En las semillas de maíz (Cuadro 3) no existe diferencia estadísticamente significativa para el contenido de fenoles totales y fenoles ligados; sin embargo en el contenido de fenoles libres sí existe diferencia estadísticamente significativa. Se muestra en el cuadro 4 el Coeficiente de Variación Global Total del contenido de fenoles totales, libres y ligados; con 27.24 %, 44.53% y 28.11% respectivamente.

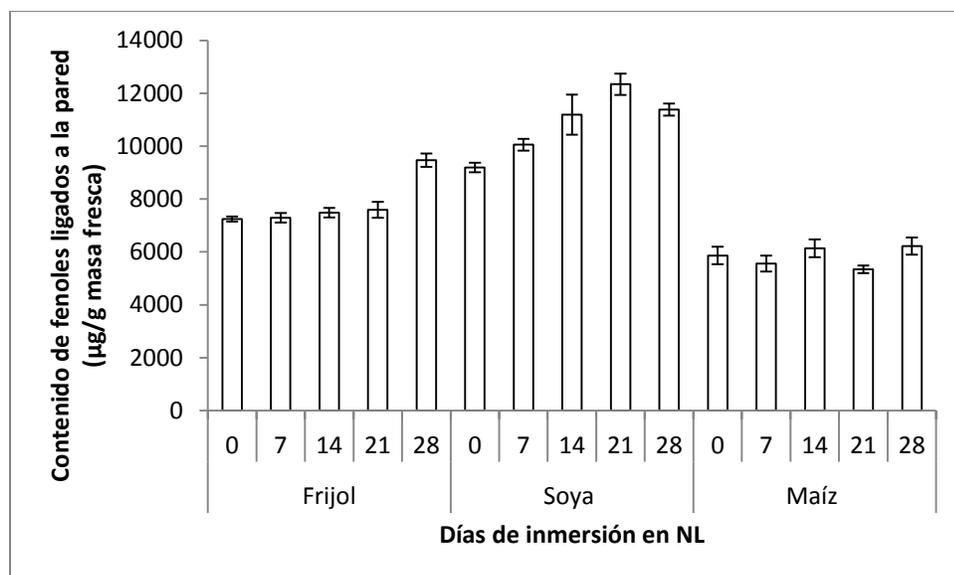
En frijol el contenido fenoles totales y ligados tienen una tendencia creciente: desde 7243,31  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca y 9561.87  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca. El contenido de fenoles libres oscilan entre 88.38  $\mu\text{g/g}$  y 614.90  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca. En soya el contenido fenoles totales, libres y ligados mostraron oscilaciones 534.11  $\mu\text{g/g}$  y 11916.74 de masa fresca. Y en maíz oscilan entre 268.90  $\mu\text{g/g}$  y 6753.91  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca.



**Figura 8.** Concentración total de fenoles ( $\mu\text{g/g}$  masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.



**Figura 9.** Concentración fenoles libres ( $\mu\text{g/g}$  masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.

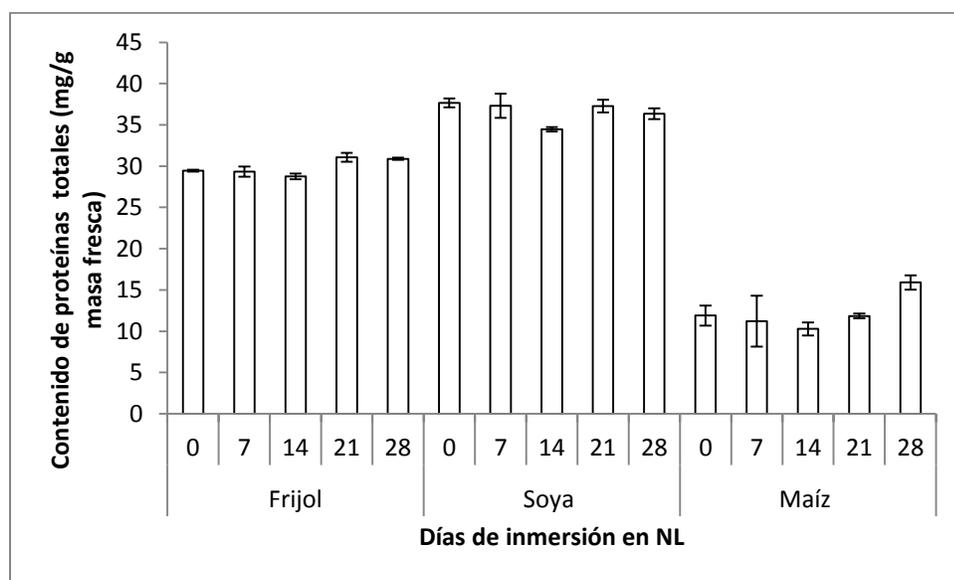


**Figura 10.** Concentración fenoles ligados a la pared celular ( $\mu\text{g/g}$  masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.

## Proteínas totales

En cuanto al contenido de proteínas totales semillas de frijol se observó diferencias estadísticamente significativas y para las semillas de soya y maíz no existiendo diferencia estadísticamente significativa después de los diferentes periodos de almacenamiento en LN (Cuadro 1, 2 y 3, Figura 11). El Coeficiente de Variación Global Total fue de 40.92 % (Cuadro 4).

Las tres especies mostraron una tendencia estable durante el tiempo de inmersión en LN. En *Phaseolus vulgaris* el contenido de proteínas totales se mantiene entre 28.74  $\mu\text{g/g}$  y 30.89  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca. En *Glycine max* el contenido de proteínas totales se mantiene entre 34.46  $\mu\text{g/g}$  y 37.65  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca. Para *Zea mays* el contenido de proteínas totales se mantiene entre 10.28  $\mu\text{g/g}$  y 13.37  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca.

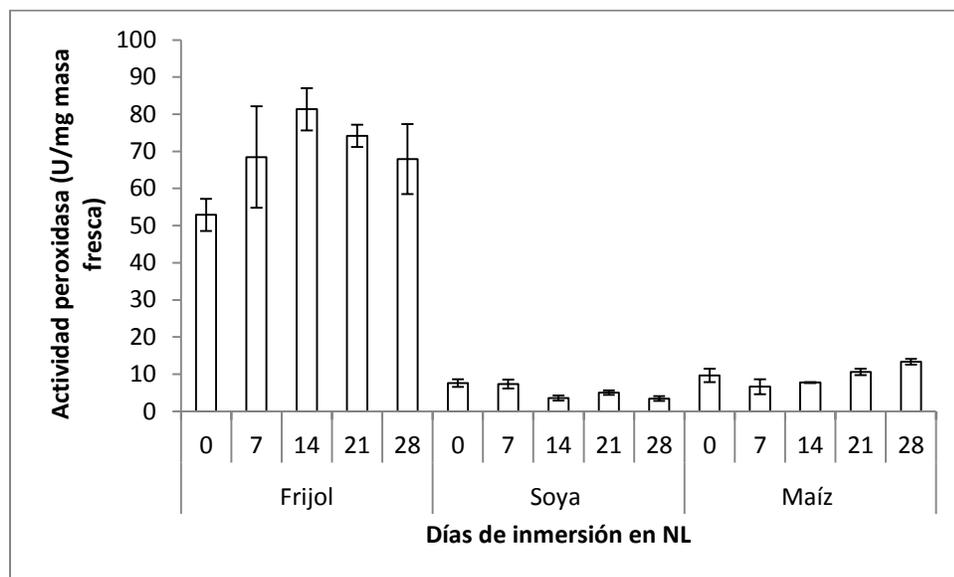


**Figura 11.** Concentración de proteínas totales (mg/g masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.

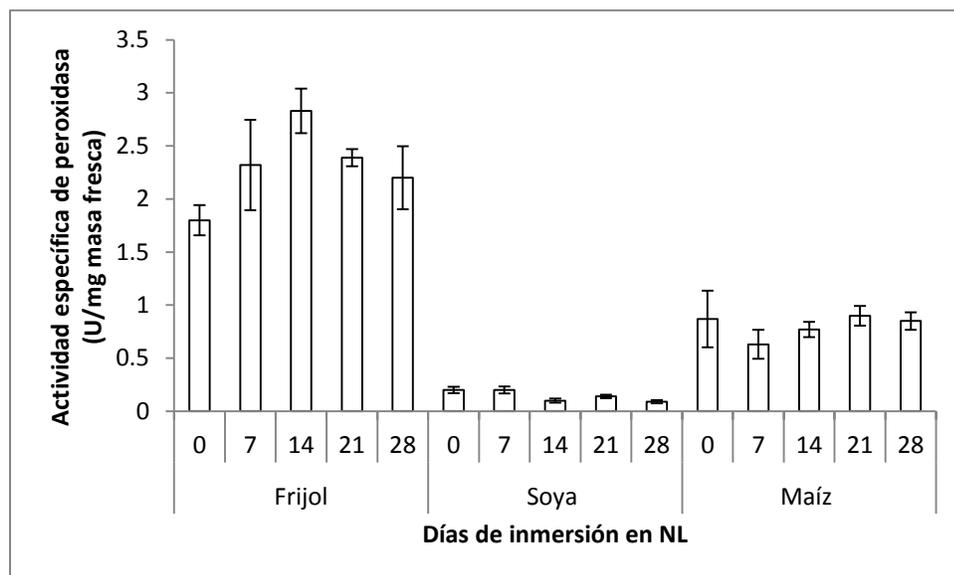
### Actividad peroxidasa y actividad específica de peroxidasas

Con respecto la actividad peroxidasa en las 3 especies estudiadas, los valores oscilan entre 3.46  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca y 81.35  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca (Cuadro 1, 2 y 3, Figura 12) no existiendo diferencias estadísticamente significativas para las semillas de frijol y para las semillas de soya y maíz sí se observó diferencias estadísticamente significativas. El cuadro 4 se muestra el coeficiente de Variación Global Total de 109.30 %.

La actividad específica de peroxidasa para las 3 especies, los valores oscilaron entre 1.80  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca y 22.83  $\mu\text{g/g}$  de masa fresca (Cuadro 1, 2 y 3, Figura 13) no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la actividad específica de peroxidasa después de los diferentes periodos de almacenamiento en LN. El Coeficiente de Variación Global Total fue de 88.33 % (Cuadro 4).



**Figura 12.** Actividad peroxidasa (U/mg masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.



**Figura 13.** Actividad específica de peroxidasa (U/mg masa fresca) de frijol, soya y maíz a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de inmersión en Nitrógeno líquido.

## DISCUSION DE RESULTADOS

La presente investigación permitió identificar variaciones metabólicas en *Phaseolus vulgaris* L.; *Glycine max* L. y *Zea mays* L en Nitrógeno Líquido en almacenamiento a corto plazo.

Las 7 pruebas (13 indicadores) fisiológicos y bioquímicos determinaron las variaciones metabólicas postcrioconservación. Las metodologías de germinación y pérdida de electrolitos se utilizaron como indicadores de la viabilidad de las semillas. Las restantes metodologías permitieron identificar el deterioro por estrés oxidativo.

En crioconservación el metabolismo es limitado por las ultra bajas temperaturas y es probablemente que algunas vías metabólicas se vean afectadas, ya que todas las moléculas orgánicas son susceptibles a oxidaciones (Walters *et al.*, 2010).

Las criotemperaturas son motivo del estrés oxidativo con secuelas perjudiciales para diversos tejidos de plantas. Se da la síntesis y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) resultando especies químicas reactivas y altamente tóxicas, como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Estas especies son aparentemente desencadenadas durante la desecación, refrigeración y tratamientos criogénicos de tejidos vegetales (Varghese, y Naithani 2008).

Según Varghese, y Naithani (2008) los lípidos constituyentes de membrana son los principales blancos para el ataque ROS y el daño oxidativo es el principal factor en la desestabilización de las membranas. La producción de malondialdehído (MDA) se utiliza frecuentemente como marcador de estrés oxidativo.

Durante el descongelamiento descrito se presencié la ruptura de la testa y el fraccionamiento de cotiledones de frijol constantemente. En soya se desprendió la testa con menor reiteración.

Las pruebas con mayor variación entre tiempos de inmersión y entre cultivos fue de electrolitos con Coeficiente de Variación Global Total (CVG) de 84.22%; actividad peroxidasas con CVG Total 109.30% y actividad específica de peroxidasas CVG Total 88.33 %.

## **Germinación**

A lo largo de múltiples estudios se ha demostrado que las semillas ortodoxas, tales como maíz, frijol común y la soya, son dadas a resistir la exposición LN (Iriando, 2001). Cuando se da un recalentamiento óptimo de semillas, la germinación no se ve directamente afectada después de la criopreservación (Cardoso *et al.*, 2000).

Visualmente no se observaron cambios fenotípicos en las plántulas recuperadas de los diferentes tratamientos de las 3 especies al quinto día después del descongelamiento,. Tras su inmersión en LN, no presentaron una menor viabilidad. El porcentaje de germinación de las semillas presentaron un Coeficiente de Variación Global Total “bajo”.

## **Pérdida de electrolitos**

El aumento de la conductividad en varios cultivos se correlaciona con la disminución de la germinación y del vigor de las especies. Tajbakhsh, (2000) menciona que la mayor lixiviación está relacionada con el envejecimiento y el deterioro de las semillas. Estas sustancias lixiviadas son principalmente potasio, fosfatos, azúcares y aminoácidos. Se menciona que la exudación de azúcares y otros electrolitos son resultado de daño en la membrana.

En las semillas de frijol y soya, la fuga de electrolitos aumenta con el tiempo de exposición en LN. Con el cambio brusco de temperatura las membrana de las semillas y testa pueden surgir algunas microfracturas (Iriando, 2001). Asimismo, la expansión de nitrógeno durante el recalentamiento de semillas provoca daños físicos a las semillas como las fracturas y rotura de la semilla (Cardoso *et al.*, 2000). Naturalmente la testa proporciona una barrera física y química para proteger la semilla para resistir los ataques medioambientales (Arc *et al.*, 2011). En las especies de leguminosas el efecto de las fracturas y microfracturas varia (Cardoso *et al.*, 2000). La permeabilidad dada por la testa evita la fuga de solutos de la semilla (Arc *et al.*, 2011). Maghitskiy y Plaza

(2007) menciona que la fuga de solutos está directamente relacionada con el espesor y estado de la testa. La fuga de electrolito está dada por las microfracturas, producidos en el proceso de recalentamiento de la semilla.

### **Clorofila**

En las semillas de maíz, se observaron modificaciones importantes y estadísticamente significativas en los niveles de pigmentos de clorofila. El Coeficiente de Variación Global Total (CVG total) “mediano”. Como se muestran en las Figuras 3, 4 y 5 y en el Cuadro 4 no se evidencian tendencias razonables observadas; pues se registraron varios altibajos. El contenido de clorofila *a* disminuyó a los 21 y 28 días. Los niveles de clorofila total y clorofila *b* aumentó a 14 días y luego disminuyeron.

### **Malondialdehído y otros aldehídos**

Se ha demostrado que la peroxidación de lípidos participan en el envejecimiento de semillas y no parece estar asociado con la pérdida de viabilidad (Mira *et al.*, 2011). En frijol, los niveles de MDA tienden a disminuir, el maíz se mantuvo con niveles similares durante los 5 tiempos; ambos sin diferencia significativa y los niveles de soya mostraron tendencias oscilatorias.

El contenido de MDA mostró diferencia significativa en soya, indicando la peroxidación lipídica; causa del envejecimiento de semillas de soya. Durante el envejecimiento, la acumulación de ROS y la peroxidación de lípidos generan cambios en las propiedades estructurales y funcionales de los lípidos de membrana, que aumentan la permeabilidad de la membrana (Mira *et al.*, 2011). Otros aldehídos no se asocian directamente en el envejecimiento de las semillas; no hay diferencia significativa (Mira *et al.*, 2011).

## Fenoles ligados a la pared celular, libres y totales

Los cambios bruscos en las semillas perturban el equilibrio metabólico de éstas, lo que provocará un aumento de ROS (Zhang *et al.*, 2010). La acumulación de ROS puede inducir la pérdida de integridad de la membrana celular.

Según Kuskoski *et al.*, (2005) los fenoles, muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo. Así mismo funciona como mecanismo beneficioso en la prevención de daños celulares. Aunque existen algunos antioxidantes en las semillas, se vuelven inactivos al deshidratar las semillas. (Zhang *et al.*, 2010). Estas lesiones oxidativas alteraron principalmente los niveles de fenoles libres en los 3 tipos de semillas; se mostraron variaciones significativas en los niveles de fenoles libres. Durante los distintos periodos de tiempo se apreciaron oscilaciones en las concentraciones de fenoles libres.

Los enlaces de lignina de los fenoles ligados a la pared celular fueron afectados negativamente en las semillas de frijol y soya, con una tendencia a aumentar; similar a lo hallado por Zevallos *et al.*, (2013a) en hojas *Solanum lycopersicum* provenientes de semillas germinadas después de la crioconservación, con tendencia al aumento al día 28. El maíz se mantuvo sin variación significativa con niveles similares en los 5 tiempos evaluados. Los fenoles totales de frijol y soya también mostraron variantes, con tendencia a aumentar, comparable a lo estudiado por Zevallos *et al.*, (2013b) en raíces y tallos de *Solanum lycopersicum* proveniente de semillas crioconservadas, con tendencia al aumento al día 28. El maíz mostró la menor concentración de compuestos fenólicos. Arc *et al.*, (2011) menciona que el contenido de compuestos fenólicos es característico de testas. La testa en las semillas de frijol y soya sufrieron daños visibles, exponiendo los cotiledones.

## Proteínas totales

Los cambios de temperatura dañan la membrana celular mediante microfracturas (Iriondo, 2001). ROS puede dañar los componentes celulares, tales como lípidos, proteínas, hasta puede dar lugar a la muerte celular. Aunque existen algunos

antioxidantes en las semillas, se vuelven inactivos al deshidratar las semillas. (Zhang *et al.*, 2010). En las concentraciones de proteínas totales en frijol sí existe diferencia estadísticamente significativa, con tendencia al aumento. Estos resultados no concuerdan con los estudiados por Cejas *et al.*, (2012) en plántulas germinadas a partir de semillas crioconservadas. En las semillas de soya y maíz no existe diferencia estadísticamente significativa, los niveles se mantuvieron similares, por lo que la ruptura de membranas celulares fue mayor en frijol.

### **Actividad peroxidasas y actividad específica de peroxidasas**

Actividad peroxidasas y actividad específica de peroxidasas son afectadas por ROS como resultado de los eventos oxidativos (Arc *et al.*, 2000). En frijol estas actividades, durante los 5 tiempos no mostraron variaciones relevantes, con una tendencia de aumento; sin embargo, a partir del día 21, decrecieron los niveles de actividad peroxidasa y la actividad específica de peroxidasa. En contraste con lo sucedido en el estudio de Zevallos *et al.*, (2013<sup>a</sup>), donde los niveles de hojas peroxidasa y actividades específicas aumentaron. En las semillas de soya la actividad peroxidasa mostró variaciones significativas, con tendencia a disminuir, mientras que en el maíz, se determinó una tendencia al aumento. Sin embargo, en la actividad específica de peroxidasa no se observó diferencia estadísticamente significativa, mostrando valores similares en los diferentes periodos de almacenamiento evaluados.

## CONCLUSIONES

- El estrés oxidativo se puede producir durante la inmersión en Nitrógeno Líquido o durante el periodo de descongelación y recuperación, por lo que se deben monitorear cuidadosamente las condiciones de la semilla, y las técnicas de congelación y descongelación para evitar daños en los materiales a recuperar del almacenamiento.
- El contenido de humedad y el método de descongelamiento, son determinantes para evitar daños en las membranas celulares.
- La viabilidad de las semillas no fue afectada por el periodo de almacenamiento en LN.
- De acuerdo con estos resultados podrían producirse algunos cambios en la actividad metabólica en semillas de frijol, soya y maíz durante el proceso de criopreservación, principalmente en el contenido de fenoles y la pérdida de electrolitos.

## **RECOMENDACIONES**

Continuar con las evaluaciones y determinar el efecto de la crioconservación después de 7, 14, y 28 días después del descongelamiento para poder inferir sobre la estabilidad bioquímica de estos materiales y los mecanismos que podrían explicar los cambios observados en el material de este estudio.

## BIBLIOGRAFIA

- ARC, E.; OGÉ, L.; GRAPPIN, P.; RAJJOU, L. 2011. Plant seed: A relevant model to study aging processes. Transworld Research Network. 2011:87-102 ISBN: 978-81-7895-513-1
- BENSON E. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critic Rev Plant Sci.* 27:141–219
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem.* 72:248-254
- CARDOSO, F. A.; PITA J. M.; GOMES, J. 2000. Efecto de la crioconservación sobre la germinación de Semillas de leguminosas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande* 1(2):67-71
- CEJAS, I.; VIVES, K.; LAUDAT, T.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J.; ENGELMANN, F.; MARTÍNEZ-MONTERO, M.E.; LORENZO, J.C. 2012. Effects of cryopreservation of *Phaseolus vulgaris* L. seeds on early stages of germination. *Plant Cell Rep.* 31(11):2065-2073. DOI 10.1007/s00299-012-1317-x
- ENGELMANN, F.; RAMANATHA, R. 2012. Major research challenges and directions for future research. In: Normah MN, Chin HF, Reed BM (eds) *Conservation of Tropical Plant Species*. Springer Verlag, Berlin. P. 511-526
- FAOSTAT. 2012. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Consultado 12 de Agosto 2013. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/S>
- GONZALEZ-ARNAO, M.T., ENGELMANN, F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation - dehydration technique: review and case study on sugarcane. *Cryo-Letters.* May-Jun;27(3):155-168.

- GURR, S.I.; MCPHERSON, J.; BOWLES, D.J. 1992. Lignin and associated phenolic acids in cell walls. In: Wilkinson, D. L., ed. *Molecular Plant Pathology*. Oxford. Vol. 2, p 51-56 ISBN 0-19-963352-5
- HARDING, K. 2004. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. *Cryoletters*. Jan-Feb;25 (1):3-22
- HEATH, R.L.; PACKER, J. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125(1):189-198
- IRIONDO, J. M. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Investigación Agraria, Producción y Protección Vegetales*. 16:(1):5-24
- JACOBS, A.; DRY, I.; ROBINSON, S. 1999. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology*. 48:325-336.
- KUSKOSKI, M.; ASUERO, A.; TRONCOSO, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)*. 25(4):726-732 ISSN 1678-457X
- LAKHANPAUL, S.; BABREKAR, P.; CHANDEL, K. 1996. Monitoring studies in onion (*Allium cepa* L.) seeds retrieved from storage at -20C and -180C. *Cryoletters* 17:219-232
- MAG. Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. 2007. Plan estratégico de la cadena productiva de Maíz y Frijol. Consultado 12 de Agosto 2013. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00039.pdf>
- MAG. Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. sf. Consultado 12 de Agosto 2013. [http://www.mag.go.cr/biblioteca\\_virtual\\_ciencia/tec\\_soya.pdf](http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec_soya.pdf)

- MARTÍNEZ-MONTERO, M.E.; MORA, N.; QUIÑONES, J.; GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F.; LORENZO, J.C. 2002. Effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of cell membranes of sugarcane (*Saccharum sp.*) embryogenic calluses. *Cryoletters*. 23(4):237-244
- MIRA, S.; ESTRELLES, E.; GONZALEZ-BENITO, M.; CORBINEAU, F. 2011. Biochemical changes induced in seeds of Brassicaceae wild species during ageing. Springer: *Acta Physiol Plant* 33(5):1803–1809
- PASCUAL, M.; PEREDA, C.; PÉREZ, R. 1983. Inverse correlation between estrogens receptor and peroxidase activity in human mammary tumor. *Neoplasma*. 30:p 611.
- PORRAS, R.J. 1991. Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic and marine organisms including recalcitrant algae. En: Scheer, H. (ed.) *Chemistry of chlorophyll*. CRC Press Boca Raton, Florida. pp. 305-320.
- RIVERO, M.V; DIGILIO, A. Y CLAUSEN A. 2009. Crioconservación de germoplasma de batata *Ipomoea batatas* L. [Lam.]. ensayos preliminares. Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. Instituto de Recursos Biológicos. p. 425-426.
- TAJBAKSH, M. 2000. Relationships Between Electrical Conductivity of Imbibed Seeds Leachate and Subsequent Seedling Growth (Viability and Vigour) in Omid Wheat. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2(1):67-71
- URAGAMI, A.; LUCAS, M.; RALAMBOSOA, J.; RENARD, M.; DEREUDDRE, J. 1993. Cryopreservation of microspore embryos of soilseed rape (*Brassica napus*) by dehydration in air with or without alginate encapsulation. *Cryoletters* 14:83-90
- VARGHESE, B.; NAITHANI, S.C. 2008. Oxidative metabolism-related changes in cryogenically stored neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds. *Journal of Plant Physiology*. 165(7):755-765

- WALTERS, C.; BALLESTEROS, D.; VERTUCCI, V. 2010. Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. *Plant Science*. 179(1):565–573
- ZEVALLOS, B.; CEJAS, I.; RODRÍGUEZ, R.C.; YABOR, L.; ARAGÓN, C.; GONZÁLEZ, J.; ENGELMANN, F.; MARTÍNEZ, M.E.; LORENZO, J.C. 2013<sup>a</sup>. Biochemical characterization of Ecuadorian wild *Solanum lycopersicum* Mill. plants produced from non-cryopreserved and cryopreserved seeds. *CryoLetters* Jul-Aug 34(4):413-421
- ZEVALLOS, B.; CEJAS, I.; VALLE, B.; YABOR, L.; ARAGÓN, C.; ENGELMANN, F.; MARTÍNEZ, M.E.; LORENZO, J.C. 2013<sup>b</sup>. Short-term liquid nitrogen storage of wild tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) seeds modifies the levels of phenolics in 7 day-old seedlings. *Sci Hort*; 160:264-267
- ZHANG, C.; DING, Z.; WANG, X.; QIN, G.; TIAN, S. 2010. Crucial roles of membrane stability and its related proteins in the tolerance of peach fruit to chilling injury. *Spinger: Amino Acids*. 39(1) pp.181–194 DOI 10.1007/s00726-009-0397-6

## ANEXOS

### Anexo 1. Ecuación de pérdida de electrolitos

$$\text{Pérdida de electrolitos} = \frac{(\text{Conductividad inicial} - \text{Conductividad H}_2\text{O})}{(\text{Conductividad final} - \text{Conductividad H}_2\text{O})} \times 100$$

%

### Anexo 2. Calculo de concentración de clorofilas

Clorofila a = 12,25 Absorbancia 664 nm – 2,55 Absorbancia 647 nm

Clorofila b = 20,31 Absorbancia 647 nm – 4,91 Absorbancia 664 nm

Clorofila total = 17,76 Absorbancia 647 nm + 7,34 Absorbancia 664 nm

En cada caso los resultados se expresaron en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de masa fresca.

### Anexo 3. Calculo de concentración de MDA y otros aldehídos

La absorbancia no específica del producto de la reacción (600 nm) se sustrajo de la absorbancia máxima a 532 nm para las mediciones del MDA, y de 455 nm para otros aldehídos. Para el cálculo de la concentración de MDA se utilizó un coeficiente de extinción molar de  $156 \text{ mmol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$  y para los otros aldehídos de  $45,7 \text{ mmol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$  (promedio de los coeficientes de extinción del propanal, butanal, hexanal, y propanal-dimetilacetal) a 532 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  de masa fresca.

**Anexo 4.** Cálculo del contenido de fenoles ligado a la pared, libres y totales.

$$\text{Concentración de la muestra} = \frac{((\text{Abs } 725 \text{ nm} / E) * \text{Factor de dilución})}{\text{masa (g)}}$$

$$\text{Fenoles solubles} = \frac{(\text{Promedio de Abs } 725 \text{ nm} / 0.0044) * 5}{\text{masa fresca}}$$

$$\text{Fenoles ligados} = \frac{(\text{promedio de Abs } 725 \text{ nm} / 0.0044) * 5}{\text{masa fresca}}$$

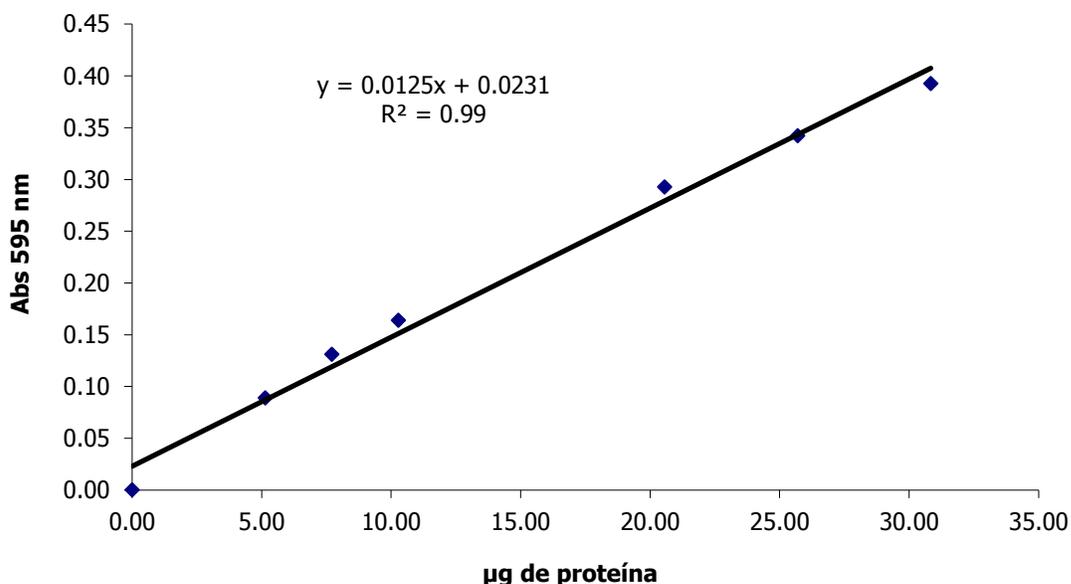
Dónde:

Factor de dilución = 5

E = valor obtenido, constante de las curvas de patrón de NaOH = 0.0044

Fenoles totales = fenoles libres + fenoles ligados.

Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  de masa fresca.

**Anexo 5.** Curva de patrón de Bradford**Anexo 6.** Cálculo de actividad peroxidasas y actividad específica de peroxidasas

La actividad enzimática se calculó como el cociente de la variación de la absorbancia medida en el tiempo de ensayo con respecto a la variación del tiempo, referidos al coeficiente de extinción molar del guayacol ( $5570 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). La actividad enzimática guayacol peroxidasa se expresó como  $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$  de masa fresca, donde una unidad de actividad enzimática corresponde a  $1 \mu\text{mol}$  de sustrato transformado en 1 minuto. La actividad peroxidasa específica se calculó como la relación entre la actividad enzimática guayacol peroxidasa y la concentración de proteínas obtenida para cada tratamiento. Se expresó en  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteínas.