



Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas

Facultad de Química-Farmacia

Departamento de Licenciatura en Farmacia

*Influencia del extracto acuoso de flores de Boldoa
purpurascens Cav. en la germinación de Leucaena
Leucocephala cv. Cunningham.*

Tesis para aspirar al título de Licenciado en Farmacia

Diplomante: Yadir Aguado Uribe

Tutores: Dr.C.Dulce Ma.González Mosquera

MsC. Juan Fco Ramírez Pedroso

Consultante: MsC .Maykel Hernández Aros

Santa Clara, 2013-2014

"Año 55 de la Revolución"

Pensamiento

"Debemos trabajar por nuestro perfeccionamiento interno como una impulsión constante, cada día analizar honestamente lo que hemos hecho, corregir nuestros errores y volver a empezar al día siguiente"

Che

Dedicatoria

*Hay personas que solo con existir hacen de nuestras vidas un sendero feliz.
A ellos dedicamos este triunfo con todo el amor que merecen.*

- *A mis padres que se lo merecen todo, por el infinito amor que me han brindado, por tantos desvelos, por todos los sacrificios, y porque los quiero.*
- *A todos aquellos que siempre depositaron su confianza en mi.*

Agradecimientos

A mis padres por su apoyo, cariño y constante preocupación hacia mi durante todos estos años, facilitando así que hoy se haga realidad este sueño.

A mi hermano que lo quiero mucho.

A mis tutores, por brindarme todo el apoyo necesario en la realización de este trabajo.

A Miriam Ruíz García y Osvaldo Norman Montenegro por ayudarnos cuando más lo necesitamos.

A Yannarys Hernández Ortega y Maykel Hernández Aros por su apoyo incondicional.

A todos los trabajadores del centro experimental de pastos y forrajes.

A todos los profesores del departamento que de una forma u otra contribuyeron a nuestra formación.

A toda mi familia por su gran apoyo.

Los agradecimientos son muchos; pero el espacio es poco, cuanto quisiera poder poner en esta página a todas las personas que me estiman, me quieren, que hasta sienten suyo este logro. Por lo mucho que los aprecio, les brindo mi más sincero agradecimiento.

Resumen

El trabajo evaluó el extracto acuoso de *Boldoa purpurascens* sobre la germinación de *Leucaena leucocephala*, la identificación y cuantificación de sus proteínas. Se colectó *B. purpurascens* en el *campus* universitario entre febrero y marzo de 2014. Se realizó una corrida electroforética de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y se aplicó el método analítico de cuantificación de Bradford. Se analizaron dos factores: órganos de *B. purpurascens* (hojas, flores, tallos) y dosis: 5, 10, 15 mL; por aplicación directa y por imbibición de las semillas. Los extractos se compararon con métodos convencionales de escarificación: agua 80°C (2min.), agua 10°C (2min.) y ácido sulfúrico (5min.). Se identificaron proteínas de bajo peso molecular entre 10-70 kDa, con mayor concentración en hojas (5.62 mg·mL⁻¹), flores (2.39 mg·mL⁻¹) y corteza (1.02 mg·mL⁻¹), en ese orden. Los extractos lograron promover la germinación de semillas de *L. leucocephala* de igual forma que los métodos convencionales de escarificación, *in vitro* y en campo. Se comprobó mayor germinación cuando se imbibieron las semillas que cuando se aplicó el extracto directamente. La combinación de los métodos de escarificación con la imbibición de las semillas en extractos, superó la germinación comparado a cuando se aplicaron solos. El extracto, con cualquier órgano, estimuló la radícula e hipocótilo de *L. leucocephala*, comparado con la escarificación convencional, excepto con agua 80°C. Se recomienda emplear los extractos de *B. purpurascens* como alternativa para eliminar la dormancia de semillas de *L. leucocephala*, así como indagar en la actividad de extractos proteicos de *B. purpurascens*.

Abstract

The study evaluated the aqueous extracts of *Boldoa purpurascens* on the germination of *Leucaena leucocephala*, identification and quantification of proteins. *B. purpurascens* was collected on campus between February and March 2014. Electrophoretic run proteins was performed under denaturing polyacrylamide gels and analytical Bradford quantification method was applied. *B. purpurascens* organs (leaves, flowers, stems) and doses: two factors were analyzed 5, 10, 15 mL; by direct application and seed imbibition. The extracts were compared to conventional methods of scarification: 80°C water (2min.), water 100°C (2min.) and sulfuric acid (5min.). Proteins of low molecular weight between 10-70 kDa were identified, with the highest concentration in leaves (5.62 mg • mL⁻¹), flowers (2.39 mg • mL⁻¹) and cortex (1.02 mg • mL⁻¹), in that order. The extracts were able to promote seed germination of *L. leucocephala* in the same way those conventional methods of scarification, in vitro and in the field. Higher germination when the seeds are found when the extract is applied directly imbibed. The combination of the methods of scarification with seeds imbibition extracts exceeded germination compared to when applied alone. The extract, any organ, the radicle and hypocotyl stimulated *leucaena*, scarification compared with conventional products except 80 ° C. Water We recommend using the extracts of *B. purpurascens* alternatively to remove seed dormancy *L. leucocephala* and investigate the activity of protein extracts from *B. purpurascens*.

Índice

Índice	Pag
Pensamiento.	
Dedicatoria.	
Agradecimientos.	
Resumen.	
Introducción.....	1
Capítulo 1: Revisión bibliográfica.....	3
1.1. Ubicación taxonómica de las especies.....	3
1.2. Características generales de las plantas.....	4
1.2.1. Descripción botánica.....	5
1.3. Usos e importancia.....	5
1.4. Germinación. Aspectos básicos.....	7
1.4.1. Fisiología de la germinación.....	7
1.4.2. Clima.....	9
1.4.3. Suelo.....	9
1.4.4. Necesidades para el uso de los inductores del crecimiento y la germinación y mecanismos para elevar la germinación.....	10
1.4.5. Principales problemas en la germinación de semillas de leguminosas.....	10
1.4.6. Métodos para inducir la germinación.....	11
1.5. Proteínas.....	12
1.5.1. Generalidades.....	12
1.5.2. Valor biológico de las proteínas.....	13
1.5.3. Importancia y aplicaciones de las proteínas vegetales.....	13
1.5.4. Influencia de las proteínas vegetales en la germinación.....	14
1.5.4.1. Movilización de reservas.....	15
1.5.5 Estrategias para el aislamiento y purificación de proteínas vegetales.....	15
1.5.5.1. Aislamiento de proteínas.....	15
1.5.5.2. Purificación de proteínas.....	16
1.5.6. Separaciones electroforéticas.....	16
1.5.7. Cuantificación de proteínas.....	17
Capítulo 2. Materiales y métodos.....	19
2.1 Efectos de extractos acuosos de <i>Boldoa purpurascens</i> en la germinación y crecimiento de <i>Leucaena leucocephala</i>	20
2.1.1. Aplicación de extractos de forma directa y por imbibición de semillas y su germinación y crecimiento in vitro.....	21
2.1.2. Comparación de extractos por aplicación directa e imbibición con los métodos convencionales de escarificación <i>in vitro</i>	24
2.1.3 Aplicación de extractos de forma directa y por imbibición de semillas y su germinación y crecimiento en condiciones de campo.....	24
2.1.4 Comparación de extractos por aplicación directa con los métodos convencionales de escarificación campo.....	27
2.2. Detección de proteínas por electroforésis.....	27
2.3. Cuantificación de proteínas.....	28
Capítulo 3. Resultados y Discusión.	30

3.1. Efectos de extractos acuosos de <i>Boldoa purpurascens</i> en la germinación y crecimiento de <i>Leucaena leucocephala</i>	30
3.1.1. Aplicación directa e imbibición de semillas de <i>L. leucocephala</i> en extractos en la germinación y crecimiento <i>in vitro</i>	30
3.1.2. Aplicación directa e imbibición de semillas de <i>L. leucocephala</i> en extractos y su comparación con los métodos convencionales de escarificación en la germinación y crecimiento <i>in vitro</i>	34
3.1.3. Aplicación directa e imbibición de semillas de <i>L. leucocephala</i> en extractos y germinación y crecimiento en suelo.....	39
3.1.4. Aplicación directa en extractos y su comparación con los métodos convencionales de escarificación en la germinación y crecimiento <i>en suelo</i>	41
3.2 Detección de proteínas por electroforésis.....	42
3.3. Cuantificación de proteínas.....	44
Conclusiones y recomendaciones.....	45
Referencias bibliográficas.....	47
Anexos.	

Introducción

Desde hace mucho tiempo el ser humano, por la misma necesidad de supervivencia, ha recurrido al uso y provecho de las plantas y poco a poco se han ido descubriendo las propiedades curativas de las mismas, que aparte de ser naturales, son económicas, fáciles de obtener y de preparar. Estas ventajas han contribuido a que el aprovechamiento de estos recursos hoy sea un tema de interés en el mundo moderno. En Cuba cada día se presta más atención al estudio de las plantas medicinales, de forma que la etnobotánica, la fitoterapia y la fitoquímica están tomando un auge insospechado. Por tales razones el estudio de las especies vegetales con actividad terapéutica es indispensable, siendo en este caso objeto de interés la especie *Boldoa purpurascens*.

Dicha especie ha sido objeto de estudios de múltiples investigadores, pues es tal vez una de las especies menos conocidas dentro del género y la familia Nyctaginacea; sin embargo en nuestro país y otras regiones de América crece de forma silvestre en jardines y parques. Contiene gran cantidad de metales entre los que se encuentran: plomo, cadmio, hierro, cobre, cromo, magnesio, níquel, sodio, manganeso, estando en mayor proporción el potasio. Entre los metabolitos secundarios identificados por tamizaje fitoquímico se encuentran: ácidos grasos, triterpenos y/o esteroides, saponinas, mucílagos, fenoles y/o taninos, alcaloides, grupos aminos y flavonoides (1). La planta es muy utilizada por la población por su acción diurética y antiséptica de las vías urinarias (2).

Informes recientes de Costa Rica evidencian el uso de *Boldoa purpurascens* Cav. como forraje en la alimentación animal (3) aspecto que aún no ha sido abordado para la especie en este país, de lo cual se puede inferir que posee componentes nutricionales que no han sido identificados.

En nuestro país se utilizan las leguminosas fundamentalmente en los sistemas silvopastoriles en función de la alimentación animal, específicamente la *Leucaena leucocephala* como leguminosa arbustiva usada en los diferentes sistemas de manejo y alimentación de la masa ganadera, que se ve en ocasiones limitado su uso y extensión por la escasa existencia y calidad de las semillas que pierden su poder germinativo en

diferentes condiciones de almacenamiento, por lo que resultaría interesante abordar esta problemática con el empleo de diferentes métodos y alternativas más viable y económicamente factibles para lograr niveles de semillas necesarios para mantener la especie lo que repercutirá en la producción de carne y leche, pero para ello se necesita lograr un proceso germinativo satisfactorio. Por todo ello, se plantea el siguiente problema científico:

Problema científico: Las semillas de *Leucaena leucocephala* forrajeras poseen poco poder germinativo, causando grandes pérdidas en los procesos productivos. Los métodos convencionales utilizados para eliminar la dormancia no resultan suficientemente efectivos por lo que se hace necesario introducir métodos alternativos que logren mejorar su capacidad germinativa.

Para dar solución a esta problemática se propone como hipótesis:

Hipótesis: Si fuera factible el proceso de germinación de *Leucaena leucocephala* con el empleo del extracto obtenido a partir de *Boldoa purpurascens* se puede proponer su uso como método alternativo para incrementar la capacidad germinativa de *Leucaena leucocephala*.

Objetivo general: Evaluar la influencia del extracto acuoso obtenido a partir de *Boldoa purpurascens* en la germinación y crecimiento de *Leucaena leucocephala*.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la actividad del extracto de *Boldoa purpurascens* en el proceso de germinación y crecimiento de *Leucaena leucocephala*, *in vitro* y en campo.
2. Detectar las proteínas presentes en los diferentes órganos de *Boldoa purpurascens* por el método electroforético y cuantificar las proteínas presentes en *Boldoa purpurascens* empleando un método espectrofotométrico.

Capítulo 1: Revisión bibliográfica

1.2. Ubicación taxonómica de las especies (4, 5)

Boldoa purpurascens Cav.

Tabla 1.1. Ubicación taxonómica de *Boldoa purpurascens* Cav.

Categorías taxonómicas	Ubicación
Familia:	Nictaginácea
Género	Boldoa
Sinonimia	<i>Boldoa ovatifolia</i> Lag; <i>Cryptocarpus globosus</i> HBK y <i>Salpianthus purpurascens</i>
División	Magnoliopsida
Especie	<i>Boldoa purpuracens</i>
Subclase	Magnoliophyta

Leucaena leucocephala Lam.

La aroma blanca (*Leucaena leucocephala*) como vulgarmente se conoce, pertenece a la tribu Mimosoideae de la familia Leguminasae. Numerosos investigadores han transformado su nombre. Wilson en 1961 plantea su correcta tipificación de *Leucaena glauca* (L.) Bth. y fue reafirmada por Everist en 1963, pero Gillis en 1974 indagando en el material disponible por Linnaeus en 1753, cuando publicó el nombre de *Mimosa latisiliqua* mostraba que él entendió ésta por *Lisiloma*, esparcida en las Bahamas y que el correcto nombre para esta especie debía ser *Lisiloma*. Sin embargo, Brewbaker en 1978 en su trabajo ratifica esta especie como *L. leucocephala* (Lam.), como nombre botánico correcto de esta especie y no el de *L. latisiliqua*, el cual es insatisfactorio de acuerdo a la Asociación Internacional para la Taxonomía de las Plantas(2, 6-12).

1.2. Características generales de las plantas

Boldoa purpurascens, Cav ex Lag. es conocida comúnmente en nuestro país como Nitro Blanco o Tostón y se le conoce también con las sinonimias de: *Boldoa ovatifolia* Lag, *Cryptocarpus globosus* H.B.K y *Salpianthus purpurascens*(1). Dentro del género abordado existen aproximadamente siete especies conocidas: *Boldoa arenareus*, *Boldoa lanceolata* var. *Macrodonia*, *Boldoa ovatifolia*, *Boldoa paniculata*, *Boldoa repens* y *Boldoa purpurascens*(13,14).

Las leguminosas son plantas con características muy particulares que las diferencian de las gramíneas. Existen cerca de 600 géneros y 12000 especies de leguminosas de las cuales 4000 son nativas de América. Las hay anuales, bianuales y perennes, herbáceas y arbustivas. Las hojas de estas especies están dispuestas alternadamente y se distinguen por tener grandes estípulas. Suelen ser compuestas, pinnadas o palmeadas. Los tallos varían en longitud, tamaño, grado de ramificación y lignificación. Poseen raíces pivotantes. Se asocian a bacterias del género *Rhizobium* para la fijación del nitrógeno atmosférico, almacenándolo en el suelo. Las inflorescencias pueden estar dispuestas en racimos, cabezuelas o espigas. El fruto de las leguminosas, aspecto distintivo de éstas, es una vaina que puede albergar una o varias semillas. Entre las principales cualidades de estas plantas cabe destacar su alto contenido de proteína, el cual varía de 14 a 29 % y la digestibilidad, de entre 60 y 70 %. Además, son una fuente para la fijación de nitrógeno en el suelo de hasta 500 kg.ha⁻¹.año¹ (15).

Leucaena leucocephala es una leguminosa de alto valor nutritivo y de amplia producción de semillas; es nativa de América Central y del Sur de las islas del Pacífico pero se ha adaptado exitosamente en Cuba (16). A dicha especie se le ha dado particular importancia en los últimos años, pues al aportar alimento para el ganado y combustible y fibra para el hombre, es considerada una de las especies de árboles multipropósito más adecuadas para el mejoramiento y la reforestación de los suelos afectados por la salinidad (17).

1.2.1. Descripción botánica

Boldoa purpurascens Cav

Es una planta de un metro o poco más de altura, con hojas rombo-aovadas a aovado-deltaideas, de 5 a 20 cm. Flores pequeñas, aglomeradas en racimos cortos y densos al extremo de las ramas de la panoja; periantio de 2,5-3 mm. Fruto de 1,5 mm de diámetro; semilla negra, lustrosa. Tallo ancho, que facilita la obtención de los nutrientes y el transporte de estos, posee un color verde y morado, es erecto, ramoso y las ramas delgadas, angulosas, lampiñas (18).

Leucaena leucocephala

Roig en 1974 la describe como un árbol inerme que a veces alcanza hasta 20m de altura, pero por lo general no es más que un arbusto de unos 3 m o menos, con las ramillas pubescentes, pecioladas, de 3 a 6 cm de largo, con o sin glándulas y pinnas superiores un poco más cortas que las inferiores. Foliolos uniuiláteros, flores blancas en cabezuela pedunculadas globulares, axilares o terminales en su mayoría aglomeradas, de 1,5 a 3 cm de diámetro. Legumbres numerosas, lineales, aplanadas, membranosas. Semillas aovadas, planas transversas. Dentro de Mimosoideae, junto con *Lysiloma*, *Desmanthus*, *Calliandra* y *Albizia*, difiere de *Acacia*, *Prosopis*, *Dichrostachys* y *Pithecellobium*, por no poseer espinas. Aunque se conocen alrededor de 100 variedades, estas son clasificadas en tres tipos: Hawiiano, Salvador y Perú siendo descritas las variedades glauca y glabrata por Brewbaker como pequeños árboles o arbustos de 8 m, hojas pequeñas compuestas por foliolos (7-12 mm), vainas pequeñas de 12-18 cm y semillas de 5-7 mm y como grandes árboles (hasta 18 m), con hojas grandes con foliolos de 10-18 cm, vainas de 18-26 cm y semillas (1, 12, 19, 20).

1.3. Usos e importancia

Ha sido reportada la eficacia de la actividad diurética de *Boldoa purpurascens* Cav. a nivel preclínico, confirmando que su extracto acuoso y dos de los flavonoides aislados de la misma, poseen una acción elevada, similar a la furosemida (21). Tradicionalmente esta planta se emplea como diurética, antiséptica y para la eliminación de cálculos de

las vías urinarias (1). Otros investigadores han evaluado su actividad antibacteriana frente a varias especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas, pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Proteus* (21,22). La acción antiséptica de esta planta, se investigó frente a cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, utilizando un extracto al 20% de las hojas (23). Dicho estudio comprobó que la planta no posee acción directa sobre los microorganismos estudiados al no detectarse actividad antibacteriana sobre ninguno de los 22 cultivos probados (24).

Por otra parte se evaluó la actividad antifúngica de un crudo de flavonoides extraído de la planta frente a *Candida albicans* y *Candida krusei*, la que resultó negativa en las condiciones estudiadas (25). También se ha evaluado la actividad antiinflamatoria de flavonoides aislados a partir de la especie, demostrándose que los mismos poseen efecto antiinflamatorio a todas las dosis estudiadas, siendo capaz de inhibir la extensión del proceso en la fase crónica (4, 26, 27).

En estudios preclínicos efectuados recientemente en ratas, se evaluó la actividad hipoglicemiante de extractos acuosos y etanólicos de la planta, utilizando como controles positivos insulina y metformin respectivamente. Los resultados obtenidos demostraron que ambos extractos disminuyeron apreciablemente los niveles de glucosa en sangre a las 72 h (28). En el estudio se reporta que la actividad estudiada es debida a la presencia de D-pinitol y flavonoides presentes en los mismos (21) (29).

Las leguminosas juegan un rol muy importante en nuestro país fundamentalmente como forraje en la alimentación y crianza animal. Aplicaciones importantes de las mismas que no se pueden dejar de señalar son su gran utilidad en los bancos de proteínas para la alimentación del ganado, también utilizadas en los silbo pastoreo, como abono verde, sombra en pastizales, sistemas de policultivos y producción de heno, de harina y piensos. Son empleadas, además, en cultivos de cobertura, mulch y control de la erosión. Constituyen una fuente importante de combustible y madera(30, 31).

La *Leucaena sp*, especialmente *Leucaena leucocephala*, ha sido objeto de numerosas investigaciones y es la especie más plantada en los sistemas agroforestales, además de ser una de las leguminosas forrajeras con mejores características para la ganadería. Existen razones por las cuales la *Leucaena leucocephala* ha sido ampliamente utilizada, entre las que resaltan su alta producción de biomasa (incluso en la época poco lluviosa), su aceptabilidad por diferentes especies animales y su capacidad de rebrote después del corte y/o ramoneo (32). Esta especie ha mostrado un comportamiento destacado en el desarrollo de la ganadería en Cuba y otros países por su alto contenido de proteínas y buen rendimiento, además de su alta capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico, ya que se informan fijaciones por encima de los 500 kg de N/ha/año. Este último aspecto reviste singular importancia, ya que dicha especie presenta alta especificidad en sus requerimientos de rizobio, pues no todas las cepas pueden producir una eficiente fijación del nitrógeno en esta planta, lo cual puede llegar a ser un factor limitante (33). El cultivar CNIA-250 y cv. Cunningham fueron introducidos en Cuba con buenos resultados, donde se ha destacado por su alto rendimiento y bajo contenido de mimosina y se adapta a suelos ácidos. Ello se debe a la increíble versatilidad de esta especie: control de la erosión, reforestación, producción de madera y sus derivados, árbol de sombra, fertilizante orgánico y alimento para las aves, así como al hecho de ser una fuente altamente productiva de biomasa de excelente calidad para el ganado y muy persistente y resistente, incluso en períodos en que otros pastos cesan prácticamente su crecimiento(20, 26, 30, 34-41).

1.4. Germinación. Aspectos básicos

1.4.1. Fisiología de la germinación

La germinación es el conjunto de fenómenos por los cuales el embrión, que se encuentra en estado de vida latente dentro de la semilla, reanuda su crecimiento y se desarrolla para formar una plántula.

Para la germinación de una semilla deben cumplirse tres condiciones, que el embrión sea viable (que esté vivo), que los factores externos sean favorables y que no presente factores internos que impidan la germinación.

La germinación comprende cuatro etapas principales:

1. La imbibición de agua
2. La síntesis y activación de los sistemas enzimáticos
3. Degradación de las sustancias de reserva
4. Elongación de las células del embrión y emergencia de la radícula

1. La imbibición de agua:

En un suelo adecuadamente provisto de agua existe un gradiente muy pronunciado de ψ (potencial hídrico) entre éste y la semilla. Esta diferencia de ψ crea un flujo de agua hacia ella, con mucha fuerza, en ocasiones de 100 MPa. Este fenómeno de entrada de agua se denomina imbibición y es puramente físico. La cantidad que penetra depende de las especies, pero es por lo general muy alta. El agua penetra a través de los tegumentos, la micrópila, la lente (estrofiolo), las paredes y las membranas celulares y se liga por uniones de hidrógeno a los coloides y otras sustancias eléctricamente cargadas. Al inicio el ingreso de agua es rápido. Las macromoléculas y estructuras se rehidratan y recuperan sus formas funcionales, durante este período, los solutos de bajo peso molecular pueden perderse desde la semillas.

2. La síntesis y activación de los sistemas enzimáticos:

En esta fase ocurren dos fenómenos fundamentales para la germinación. El primero es la reactivación de las enzimas, inactivadas por la extrema desecación y, el segundo, la síntesis de otras inexistentes.

Para iniciar el crecimiento del embrión las reservas de la semilla se movilizan, convertidas de la forma insoluble a la soluble, o a formas derivadas transportable y/o metabolizables. Durante la germinación, se producen enzimas como amilasas y maltasas las que romperán el endosperma amiláceo a glucosa. Estas enzimas son producidas en la capa de aleurona que rodea al endospermo.

3. Degradación de las sustancias de reserva:

Las enzimas degradan las reservas de la semilla y ponen a disposición del embrión no sólo los nutrientes, sino también energía generada por la fermentación y la respiración

de los sustratos solubilizados. Es así como los hidratos de carbono insolubles (almidón, inulina) son degradados por hidrolasas a monosacáridos solubles, como la glucosa, fructosa, etc. Los triglicéridos, principales lípidos de reserva de muchas leguminosas, son degradados en tres orgánulos: cuerpos lipídicos, mitocondrias y glioxisomas, son descompuestos a glicerol y ácidos grasos. Las proteínas de reserva son hidrolizadas a aminoácidos por proteinasas. En los cereales y otras gramíneas, las proteínas de reserva se encuentran en forma de cuerpos proteicos en la capa de aleurona y en menor cantidad, en el endosperma.

4. Elongación de las células del embrión y emergencia de la radícula:

En esta etapa el embrión dispone de suficientes nutrientes para crecer normalmente. Todos los productos de la hidrólisis nutren al embrión para el inicio de su crecimiento (42).

1.4.2. Clima

Las condiciones del clima son muy importantes para el proceso de germinación de semillas. Cada especie de semilla necesita absorber un cierto mínimo de humedad. Se ha encontrado que las semillas con alto contenido de proteína necesitan un contenido de humedad mayor que semillas con niveles bajos de proteína. El exceso de agua puede ser tan pernicioso para la semilla como la carencia. Sí el nivel de agua llega a excluir o restringir la penetración de oxígeno a la semilla, la germinación se retarda o no ocurre, en un gran número de especies. Como todos los procesos fisiológicos la germinación está afectada por la temperatura, esta afecta principalmente la actividad enzimática necesaria para la degradación de las sustancias de reservas. La exposición a la luz estimula la germinación de semillas de muchas especies silvestres y agrícolas(43).

1.4.3. Suelo

Un buen contacto de la semilla con el suelo es más favorable donde no esté saturada el agua. La absorción de agua es mayor en suelos y en medios saturados de agua. Las características de agua presente en el medio de germinación incluye la concentración

de solutos en el suelo, la habilidad de este para permitir el flujo de agua y su dureza(43)

1.4.4. Necesidades para el uso de los inductores del crecimiento y la germinación y mecanismos para elevar la germinación

Se conoce la dormancia como uno de los principales problemas que afecta la regeneración de semillas conservadas; y para romperla diversas han sido las sustancias químicas probadas, dentro de ellas, los reguladores de crecimiento han tenido un rol fundamental, al ser sustancias endógenas insustituibles para las plantas, y que en su interrelación deciden el crecimiento y las bases para su ulterior desarrollo. En leguminosas, Everist (1963) describe el uso de diversas dosis de reguladores de crecimiento (citoquininas y giberelinas) acorde a género y especie para favorecer el potencial fisiológico en la germinación de semillas conservadas en bancos de germoplasma. Las auxinas juegan un destacado papel en casi todos los aspectos relacionados con el desarrollo de las plantas. También se reconoce su importancia para la elongación y división celular, así como en la formación del embrión y su desarrollo. El incremento en los porcentajes de germinación en semillas de diversos cultivos de importancia económica ante la aplicación de AG₃ (ácido giberélico) ha sido expuesto por Chmidt (2000). Este resultado puede estar vinculado al efecto causado por las giberelinas en la inducción de germinación en semillas que pueden necesitar tratamientos de ruptura de dormancia , así como a su efecto en la producción de diversas enzimas durante la germinación y dentro de ellas, es notable, la de α -amilasa necesaria para suministrarle energía al proceso y facilitar la división celular(11, 17, 39, 40, 44).

1.4.5. Principales problemas en la germinación de semillas de leguminosas

Las gruesas cubiertas seminales de estas semillas constituyen una barrera impermeable al agua y a los gases o ejercen una resistencia física a la expansión de la radícula, que impide la germinación (45).

Las semillas de *Leucaena leucocephala* se caracterizan por la presencia de cubiertas impermeables al agua y a los gases que restringen su germinación, condición biológica

que es común en muchas leguminosas; al parecer la región de impermeabilidad de estas especies se encuentra en la capa del parénquima en empalizada y la resistencia a la entrada del agua se debe a la acumulación de suberina. Para eliminar su efecto se recomienda emplear bajas temperaturas, la escarificación mecánica o ácida y el almacenamiento, así como el agua a 80°C por 2 minutos (43,46,47).

1.4.3. Métodos para inducir la germinación

Existen diferentes métodos para mejorar la germinación, dentro de ellos tenemos:

Escarificación mecánica: consiste en pasar las semillas por superficies abrasivas, con el fin de causar daño en la testa sin tocar el embrión.

Tratamiento con agua caliente: consiste en sumergir las semillas en agua caliente por cinco segundos.

Escarificación ácida: consiste en sumergir las semillas en H₂SO₄, luego lavarlas con agua corriente y dejarlas secar. Es el método químico más utilizado en semillas de especies forrajeras, dado que disuelve, agrieta y debilita las cubiertas florales, lo cual permite la entrada de agua e intercambio de gases, facilita la expansión del embrión y la salida de la radícula.

Lavado en agua corriente: algunas sustancias inhibitoras son solubles en agua y pueden ser removidas por el simple lavado de las semillas.

Secado previo: las semillas recién cosechadas pueden perder la dormancia si se secan por algunas semanas en una cámara a 40°C.

Pre enfriamiento: algunas semillas pierden la dormancia sometiéndolas a bajas temperaturas.

Estratificación: se emplea para inducir procesos fisiológicos en el embrión que son necesarios a la germinación.

Imbibición en nitrato de potasio: algunas semillas superan la dormancia de actividad aparentemente metabólica.

Exposición a la luz: las semillas pueden requerir un determinado tratamiento de luz para poder germinar(10,48,49).

1.5. Proteínas

1.5.1. Generalidades

El nombre *proteína* proviene de la palabra griega *proteicos*, que significa lo primero. Entre todos los compuestos químicos, las proteínas han sido consideradas como los más importantes, denominándolas las sustancias de la vida, porque son los materiales que desempeñan el mayor número de funciones en las células de todos los seres vivos. Las mismas pueden ser de origen animal o vegetal.

Las proteínas de las células animales desempeñan funciones metabólicas y reguladoras. Estas se consideran los elementos que definen la identidad de cada ser vivo, ya que son la base de la estructura del código genético.

Las proteínas de origen vegetal son esenciales para la renovación celular. Estas aportan aminoácidos vitales para la alimentación animal. Se encuentran fundamentalmente en: legumbres, cereales, semillas y frutos secos, así como en hortalizas y diversas plantas de origen tropical (50).

Desde el punto de vista químico, las proteínas son polímeros grandes constituidas básicamente por carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N); aunque pueden contener también azufre (S) y fósforo (P) y, en menor proporción, hierro (Fe), cobre (Cu), magnesio (Mg), yodo (I), etc. Son poliamidas que se derivan de los ácidos α -amino carboxílicos. Una molécula de proteína contiene cientos, e incluso miles de unidades de aminoácidos, que pueden ser de unos 20 tipos diferentes, en los que se presentan numerosas combinaciones.(5)

Las proteínas se dividen en dos grandes grupos: fibrosas y globulares, las primeras son insolubles en agua, mientras que las segundas son solubles en agua y en soluciones de ácidos, bases o sales. Las moléculas de las proteínas fibrosas son largas en forma de hilos, los que tienden a unirse para formar fibras. Las globulares están dobladas y forman unidades compactas que a menudo se aproximan a la forma de un esferoide.(18)

5.2. Valor biológico de las proteínas

El valor o calidad biológica de una proteína, está dado por su capacidad de aportar todos los aminoácidos necesarios, para los seres humanos. Su calidad biológica es mayor cuanto más similar sea su composición a la de las proteínas del cuerpo humano. Hay proteínas de origen vegetal, como las de la soya, que a pesar de tener menor valor biológico que otras de origen animal, presentan un aporte proteico neto mayor, por asimilarse mucho mejor en el sistema digestivo. Por otra parte, las proteínas del arroz contienen todos los aminoácidos esenciales, pero son escasas en lisina. Si se combinan con lentejas o garbanzos, abundantes en lisina, la calidad biológica y aporte proteico resultante es mayor que el de la mayoría de los productos de origen animal. Combinando adecuadamente las proteínas vegetales por ejemplo legumbre con cereales se pueden obtener un conjunto de aminoácidos equilibrados(27).

1.5.3. Importancia y aplicaciones de las proteínas vegetales

Utilización en alimentación animal

Las proteínas de algunos vegetales constituyen, en la actualidad y de manera perspectiva, un componente fundamental de alimentos, para los animales. El empleo de concentrados de proteínas de diferentes partes de la planta es una variante muy utilizada en el mundo entero, para la alimentación animal y en algunos casos humana. En este sentido se destaca la soya con un contenido de proteínas que varía en un rango del 45-90 %, para la alimentación humana y en piensos para animales. También se han empleado concentrados de proteínas de las hojas de alfalfa preparadas a escala comercial en Europa, Estados Unidos y otros países, desde hace varias décadas. Por otra parte han sido realizadas numerosas investigaciones sobre la extracción de concentrados de proteínas de las hojas de plantas como: yuca, *leucaena*, sorgo, diversas legumbres tropicales, el arroz, diferentes tipos de césped, etc. La calidad de las proteínas del concentrado extraído de las hojas de estas plantas fue evaluada usando ratas.(51, 52)

Las legumbres tropicales: *Vigna unguiculata*, *Desmodium distortum*, *Phaseolus calcaratus* y *Psophocarpus tetragonolobus* dieron excelentes resultados, comparables

a los obtenidos del concentrado de proteínas de las hojas de la alfalfa. Los aminoácidos contenidos en las hojas de estas plantas, son similares entre sí y a los reportados para la alfalfa y la soya.

1.5.4. Influencia de las proteínas vegetales en la germinación

Las proteínas vegetales son de gran importancia para la germinación, unas proteínas de gran utilidad en nuestro país son las peptidasas vegetales. Su importancia radica en que permiten la reutilización de los aminoácidos constituyentes de proteínas, lo que es fundamental en los procesos de desarrollo. Así, durante la germinación movilizan las reservas proteicas; durante el crecimiento y desarrollo permiten el recambio de las proteínas existentes por aquellas que la planta necesita para adaptarse a los cambios ambientales y, durante la senescencia producen los aminoácidos que serán reservados para su uso por la próxima generación. Sin embargo, se han identificado varias peptidasas que no parecen cumplir ninguna función en el crecimiento y desarrollo o se encuentran en cantidades muy superiores a las que la planta necesita para estas funciones. A tales peptidasas se las llama proteínas secundarias, por analogía con los metabolitos secundarios(54) (55).

1.5.4.1. Movilización de reservas

Durante la germinación, las proteínas almacenadas en las semillas son expresadas en órganos específicos (endosperma o mesófilo del cotiledón), siendo generalmente sintetizadas como precursores que serán procesados antes de su depósito en los cuerpos proteicos. Para ello pareciera que es importante la co-localización en la misma organela de varias peptidasas, muchas peptidasas están involucradas en la movilización de las proteínas de reserva de la semilla, proveyendo los aminoácidos para el crecimiento de la planta. Entre ellas se encuentran las cisteín-peptidasas de *Vignay* de maíz, las amino- y dipeptidasas de cebada y las aspartilpeptidasas de arroz, trigo, cebada, cacao y colza. Se asocian las altas actividades de peptidasas aspárticas encontradas en semillas no germinadas de varias angiospermas a funciones biológicas durante la maduración(56).

1.5.5 Estrategias para el aislamiento y purificación de proteínas vegetales

1.5.5.1. Aislamiento de proteínas

La metodología empleada en la extracción de proteínas determina su naturaleza y estabilidad, permitiendo validar los resultados obtenidos en procedimientos posteriores. En particular, la extracción de proteínas vegetales presenta problemas inherentes a la estructura de la célula vegetal, pues comparada con los tejidos animales y las células bacterianas, tiene menor contenido de proteínas y contienen en sus vacuolas peptidasas, alcaloides y compuestos polienólicos (flavonoides, taninos) que pueden interferir en la actividad proteica. En consecuencia, la estrategia de extracción depende de las características específicas de la proteína en estudio y de su localización. La primera etapa en el aislamiento de una proteína es su liberación de las células que la contienen. El método elegido depende de las características mecánicas del tejido de procedencia, así como de la localización celular de la proteína de interés. Como métodos de ruptura mecánica de las células vegetales para liberar sus proteínas se pueden mencionar: Trituración con arena o alúmina, trituración en mezclador de alta velocidad, homogeneizador a pistón, prensa francesa, sonicación, congelación con nitrógeno líquido y macerado. La diversidad de proteínas involucradas en procesos de crecimiento, desarrollo y defensa impide la formulación de un procedimiento de extracción universal que permita recuperar todas las proteínas de un tejido vegetal. Sin embargo, la solubilidad de las proteínas de plantas, que está relacionada con la localización intracelular, permite formular diferentes métodos de extracción. Ellos incluyen: 1) extracción con buffer acuoso, 2) extracción con detergentes, 3) precipitación directa con TCA, 4) precipitación con acetona y 5) precipitación con TCA-acetona. Para prevenir la proteólisis durante la extracción se debe utilizar algunos de los procedimientos siguientes: 1) extraer con buffer que contenga SDS (sodio dodecil sulfato), 2) extraer con TCA frío al 10 % (p/v), 3) adicionar un cóctel de inhibidores de peptidasas al buffer de extracción, 4) trabajar a baja temperatura durante períodos cortos de tiempo, 5) usar buffers de pH por encima o por debajo del óptimo, 6) adicionar agentes protectores como dimetilsulfóxido (10 %, v/v), glicerol (25 % v/v) o agentes reductores como ditioneol (1mM), L-cisteína (5 mM) o β -mercaptoetanol

(1mM)) ó 7) adicionar agentes quelantes como EDTA (2 mM) o EGTA (2mM) para remover cationes bivalentes que son cofactores de metalopeptidasas y de varias peptidasas serínicas.(8, 47).

1.5.5.2. Purificación de proteínas

Las proteínas se purifican mediante procedimientos de fraccionamiento. En una serie de etapas independientes, se aprovechan las diversas propiedades fisicoquímicas de las proteínas que interesan para separarlas progresivamente de otras proteínas y/o de las demás sustancias. Las características de las proteínas que se emplean en los diversos procedimientos de separación son: solubilidad, carga iónica, tamaño molecular, propiedades de absorción y capacidad de unión a otras moléculas biológicas(57).

1.5.6. Separaciones electroforéticas

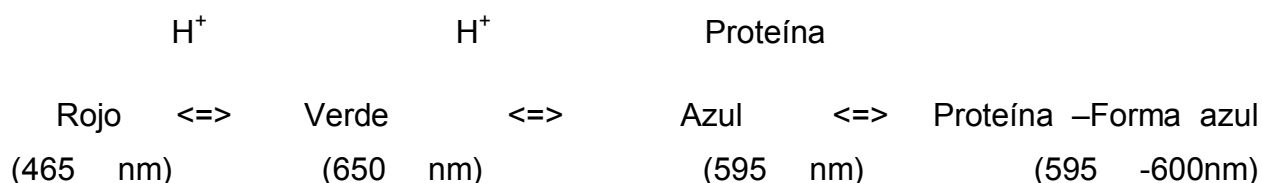
La electroforesis es un método analítico de alto poder resolutivo que permite la separación de moléculas biológicas cargadas por la combinación de su migración en un campo eléctrico y el efecto de tamizado molecular a través de un gel de corrida. Las proteínas, al ser moléculas anfotéricas polivalentes, migran en un campo eléctrico de acuerdo con su carga neta, que a su vez depende de la carga macromolecular, del tamaño y de la forma, como así también de las propiedades fisicoquímicas del medio electroforético. La incorporación del detergente SDS a la solución proteica permite separar todos los tipos de proteínas, incluyendo las insolubles en agua. El SDS se une a las regiones hidrofóbicas de las moléculas proteicas haciendo que se desplieguen las cadenas polipeptídicas, liberándolas de sus asociaciones con otras moléculas proteicas o lipídicas. En estas condiciones la electroforesis separa los polipéptidos en función de su tamaño, lo que proporciona información sobre su peso molecular. Además, el agregado de un agente reductor como el β -mercaptoetanol reduce los enlaces disulfuro que pudieran existir en las proteínas, de modo que se pueden visualizar todos los polipéptidos constitutivos de las moléculas poliméricas(58).

1.5.7. Cuantificación de proteínas

Método de Bradford

La técnica analítica del *azul brillante de Coomassie*, es uno de los métodos de determinación de la concentración de proteínas más populares (30).

El indicador libre existe en diferentes formas iónicas. En condiciones fuertemente acídicas la forma más estable es la roja, doblemente protonada. La forma aniónica azul enlaza con las proteínas y se estabiliza; su máximo de absorción corresponde a 595 nm como muestra el siguiente equilibrio.



La variación de la absorbancia de 465 a 595 nm es proporcional a la concentración de proteínas presente en la muestra, lo que constituye el basamento del método analítico. El espectro de absorción en la región VIS muestra el corrimiento referido (Figura 2).

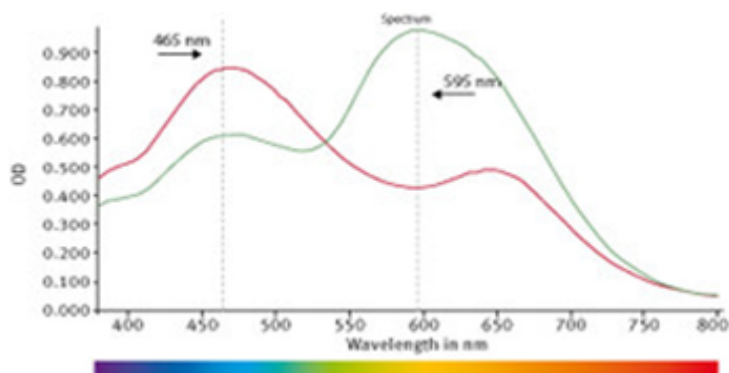


Figura 1.1. Espectros VIS de la albúmina con o sin indicador

El método analítico de Bradford presenta ventajas en relación a los demás respecto a su rapidez y relativa estabilidad a la respuesta colorimétrica. Además, resulta bastante específico frente a las sustancias químicas presentes generalmente en las muestras de proteínas, siendo una excepción la presencia de los detergentes(3).

Capítulo 2. Materiales y métodos

El estudio se realizó en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas (UCLV), en áreas de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Cascajal (municipio Santo Domingo, provincia Villa Clara) y en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) (Sancti Spíritus), en el período comprendido de febrero a mayo del 2014.

Colecta y procesamiento del material vegetal

El material vegetal empleado en el estudio se recolectó en áreas cercanas a la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, específicamente en la estación experimental “Las Antillas”, en los meses de febrero y marzo del 2014.

Comprendió ejemplares procedentes de un suelo carbonatado que se encontraban en estado de floración y fructificación y se realizó en horas tempranas de la mañana. La identificación de la especie se realizó por un especialista en taxonomía vegetal de dicha estación experimental.

Para el desarrollo del trabajo se emplearon las partes aéreas de la planta (flores, hojas, tallos) para continuidad de sus estudios, ya que la literatura informa escasos estudios sobre esta especie y es de nuestro interés realizar la identificación, cuantificación de las proteínas presentes en la misma para luego evaluar su influencia en la germinación de granos (*Leucaena leucocephala*).

Las muestras en estudio se trasladaron hasta el laboratorio de Química- Farmacéutica y Farmacognosia del departamento de Farmacia, donde se procedió a la selección y separación de sus partes aéreas y a la eliminación de las materias extrañas.

2.1. Efectos de extractos acuosos de *Boldoa purpurascens* en la germinación y crecimiento de *Leucaena leucocephala*

Se trabajó con semillas de la especie *Leucaena leucocephala* cosechadas en marzo del 2006 y que se encontraban almacenadas a 25°C, procedentes de bancos de semillas de la Estación experimental de Pastos y Forrajes Villa Clara. Se determinó la pureza de las semillas, seleccionando 2025 semillas de tamaño uniforme sin presencia de daños por plagas y con grosor característico. Según las reglas ISTA(International seed test analys).

Obtención de los extractos

La obtención de los extractos a partir de las partes aéreas de *Boldoa purpurascens* se realizó mediante el empleo de un agitador mecánico a 340 rpm durante 1 hora. El diagrama de flujo se representa en la figura 2.1.

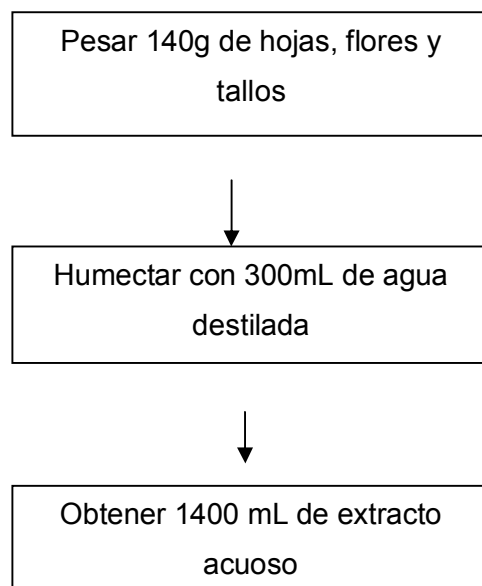


Figura 2.1. Diagrama de flujo de la obtención de los extractos a partir de las partes aéreas de *Boldoa purpurascens*.

2.1.1. Aplicación de extractos de forma directa y por imbibición de semillas y su germinación y crecimiento *in vitro*

Las pruebas de germinación se realizaron en placas petri (9 cm de diámetro) bajo lámparas fluorescentes de 40 W situadas a 20cm del nivel de las placas con un fotoperíodo de 8 horas/luz. Se diseñó un experimento factorial (3^2) con 2 factores a 3 niveles cada uno, también se incluyeron 3 métodos convencionales de escarificación, y se realizaron además 2 réplicas de dicho experimento. (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Tratamientos empleados en la aplicación directa del extracto en los experimentos *in vitro*.

Métodos convencionales de escarificación	Extracto acuoso de <i>B. purpurascens</i> Cav.
agua 10°C	
agua 80°C	5, 10 y 15 mL de los extractos acuosos de hojas, tallos y flores
Ácido Sulfúrico H ₂ SO ₄	

El procedimiento experimental para aplicación directa *in vitro* se muestra en la figura 2.2.

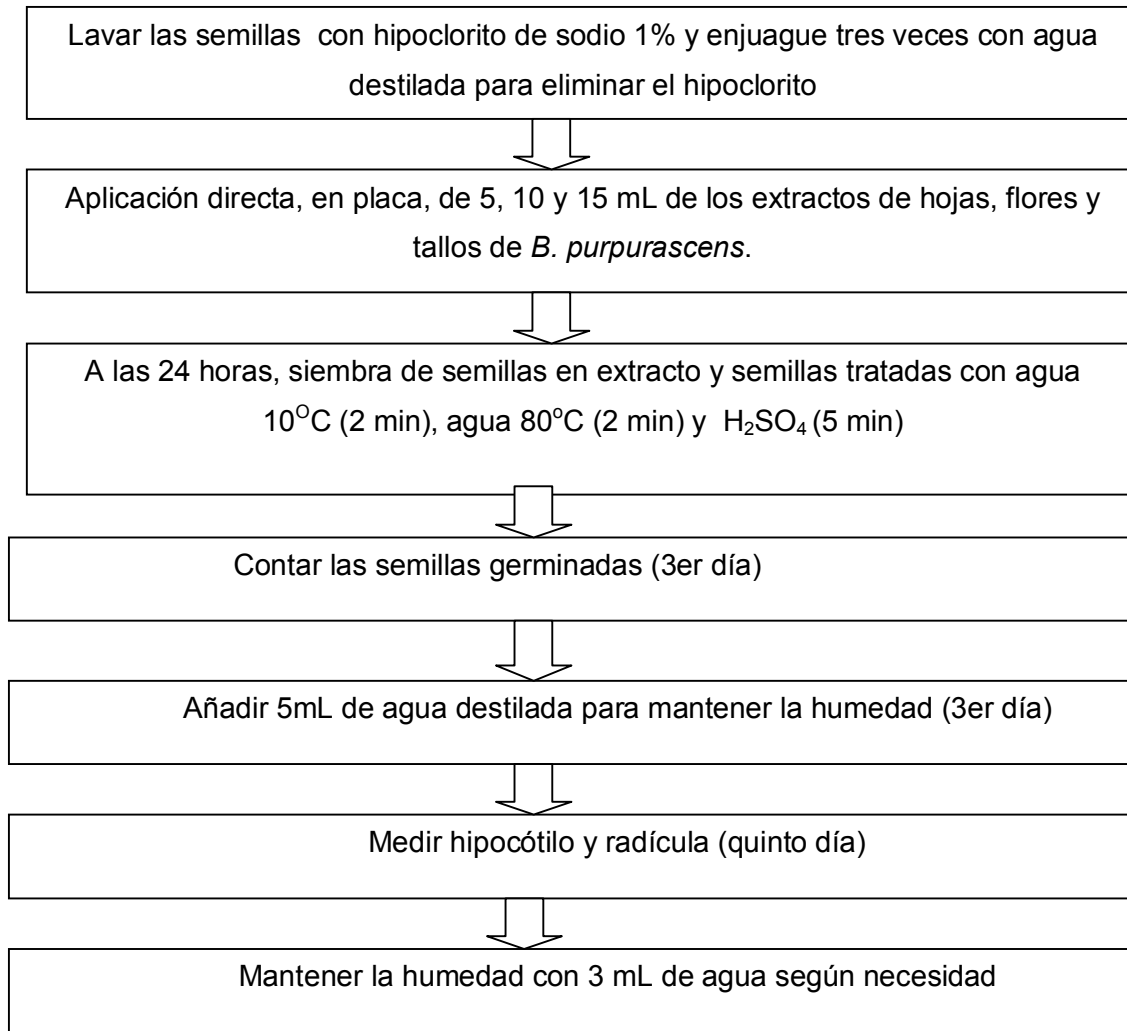


Figura 2.2. Procedimiento a seguir para la aplicación directa de los extractos acuosos de partes aéreas (PAP) de *Boldoa purpurascens*.

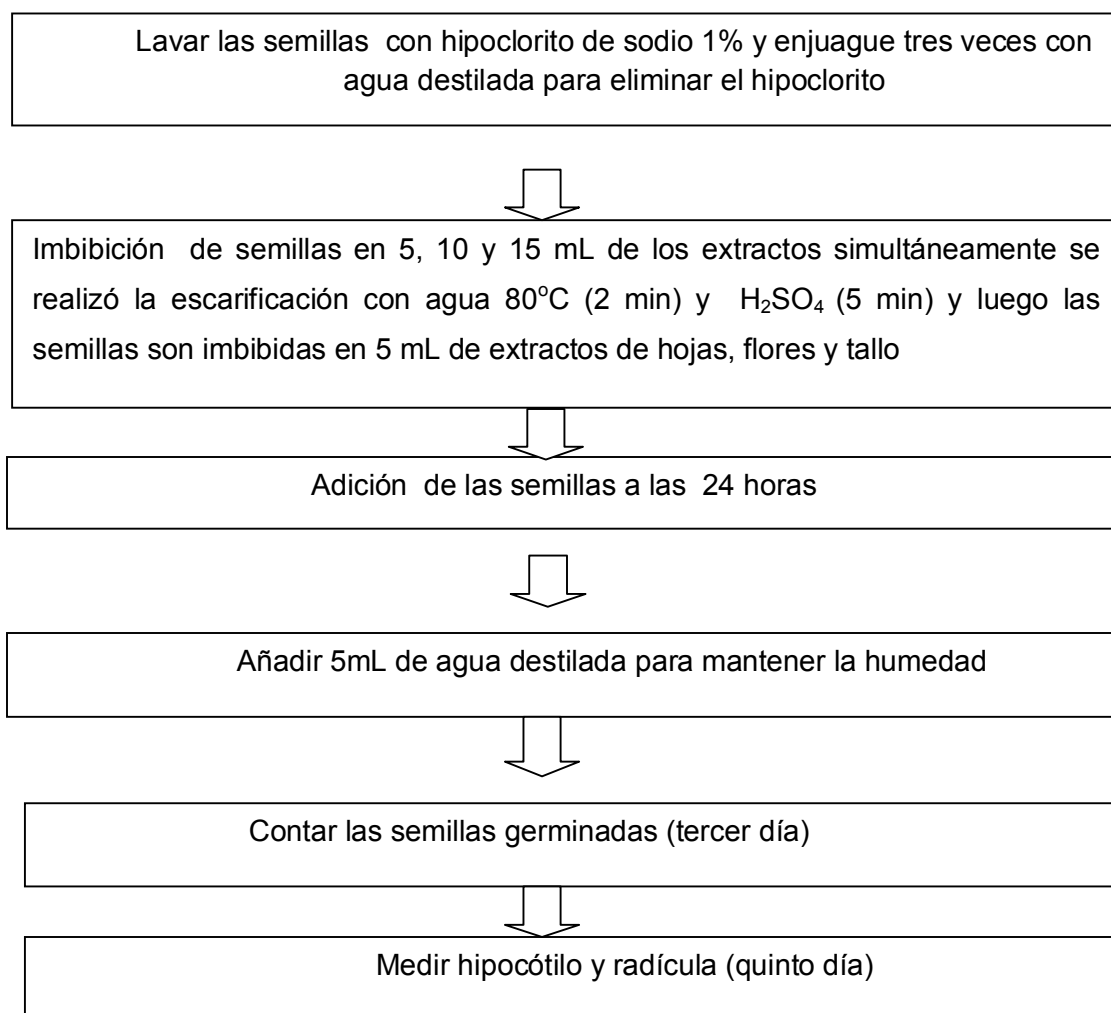
Imbibición de las semillas en extractos para sembrar *in vitro*

Se diseñó un experimento factorial (3^2) con 2 factores a 3 niveles cada uno, también se incluyeron 2 métodos convencionales de escarificación combinados con 5, 10 y 15 mL de extractos de hojas, flores y tallos, y se realizaron además 2 réplicas de dicho experimento (Tabla 2.3). En este experimento se decidió no aplicar el tratamiento de agua a 10°C, lo cual responde a la interacción de dicho tratamiento térmico con las especies tratadas, no especificándose para *L. leucocephala* el empleo de esta temperatura.

Tabla 2.3. Tratamientos empleados en la imbibición de semillas del extracto en los experimentos *in vitro*.

Métodos integrados (convencional + extractos acuosos)	Extracto acuoso de <i>B. purpurascens</i> Cav.
Agua 80°C + 5 mL extractos hojas, tallos y flores	Dosis: 5, 10 y 15 mL extracto Órganos: hojas, tallos y flores
Ácido Sulfúrico H ₂ SO ₄ + 5 mL extractos hojas, tallos y flores	

El procedimiento experimental por imbibición *in vitro* se muestra en la figura 2.3.



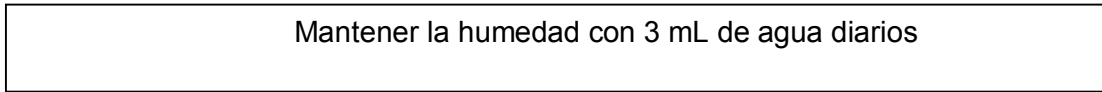


Figura 2.3. Diagrama de flujo del procedimiento a seguir para aplicación por imbibición de los extractos acuosos de las partes aéreas (PAP) de *Boldoa purpurascens*.

2.1.2. Comparación de extractos por aplicación directa e imbibición con los métodos convencionales de escarificación *in vitro*

Se realizó una comparación entre la aplicación directa e imbibición de semillas en extractos con los métodos convencionales de escarificación en germinación y crecimiento *in vitro*.

La comparación por aplicación directa se realizó entre los extractos 5,10 y 15 mL de hojas, flores y tallos de *B. purpurascens* y los métodos convencionales de escarificación agua 80°C (2 min), agua 10°C (2 min) y H₂SO₄ (5 min). La comparación por imbibición se realizó entre los extractos de *B. purpurascens* y una combinación de los métodos convencionales de escarificación: agua 80°C (2 min) y H₂SO₄ (5 min) con 5mL de los extractos de *B. purpurascens*. Ver el procedimiento experimental (figura 2.2 y 2.3).

2.1.3. Aplicación de extractos de forma directa y por imbibición de semillas y su germinación y crecimiento en condiciones de campo

Aplicación directa de extractos en condiciones de campo

El experimento se llevó a cabo en condiciones de un suelo Alftico amarillento, de baja actividad arcillosa, de textura loam-arenosa. Con características de pH ácido (4,5-5,2), contenido de Materia Orgánica (MO) de 2,0 a 4,0 %, baja capacidad de intercambio

catiónico ($<20,0 \text{ cmol kg}^{-1}$), baja fertilidad natural y una gruesa capa de mocarrero en su perfil (58).

Las pruebas de germinación se realizaron en canteros en suelo a pleno sol según la duración natural del día con riegos frecuentes cada día. El diseño y los tratamientos empleados fueron los mismos utilizados para la germinación *in vitro* (acápite 2.3.1., Tabla 2.2). La altura de la planta se mide desde la superficie del suelo hasta la salida de la primera hoja.

El procedimiento experimental para aplicación directa en condiciones de campo se muestra en la figura 2.4.

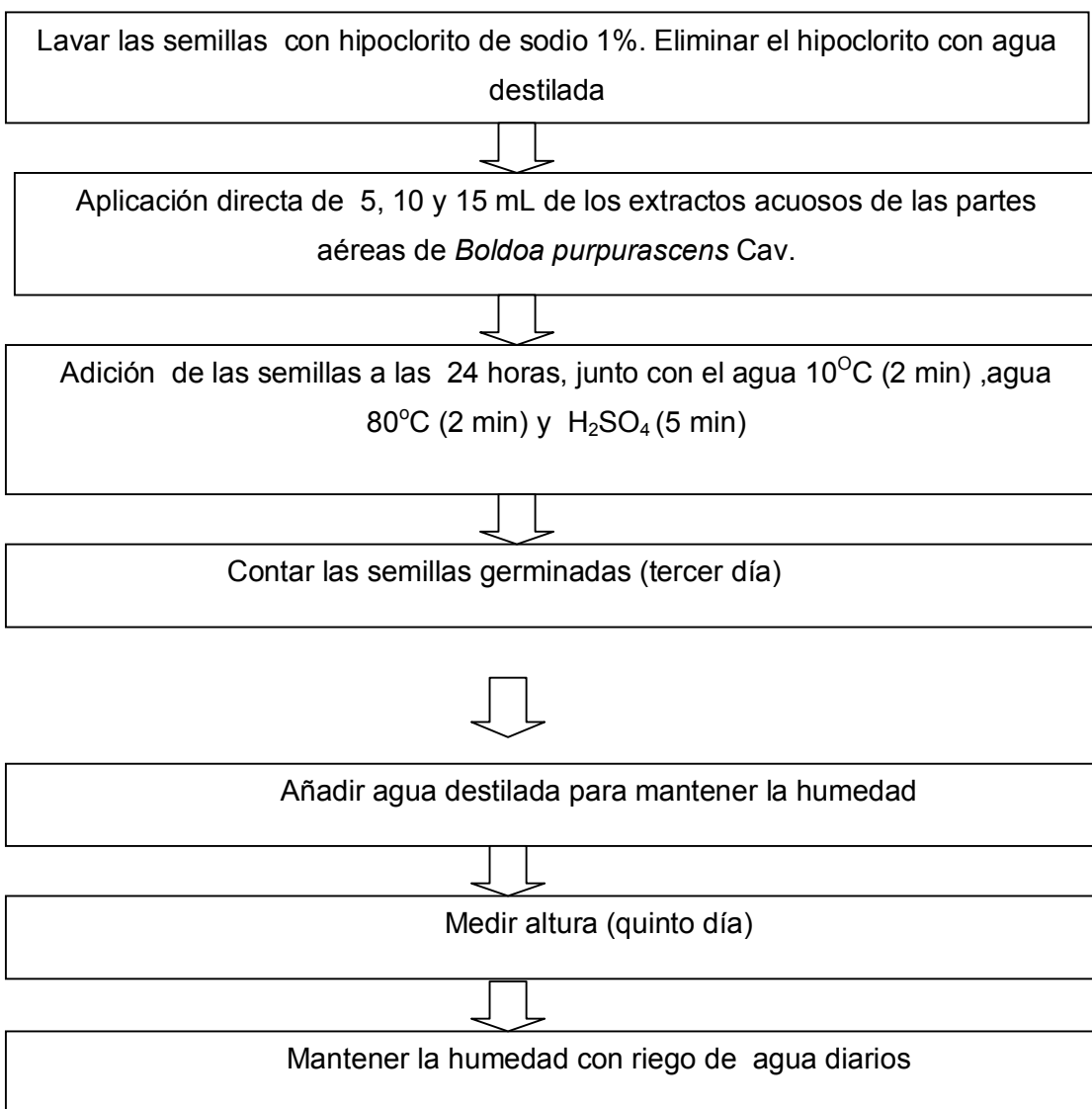


Figura 2.4. Diagrama de flujo del procedimiento a seguir para aplicación directa de los extractos acuosos de partes aéreas (PAP) de *Boldoa purpurascens*.

Imbibición de las semillas en extractos para sembrar en condiciones de campo

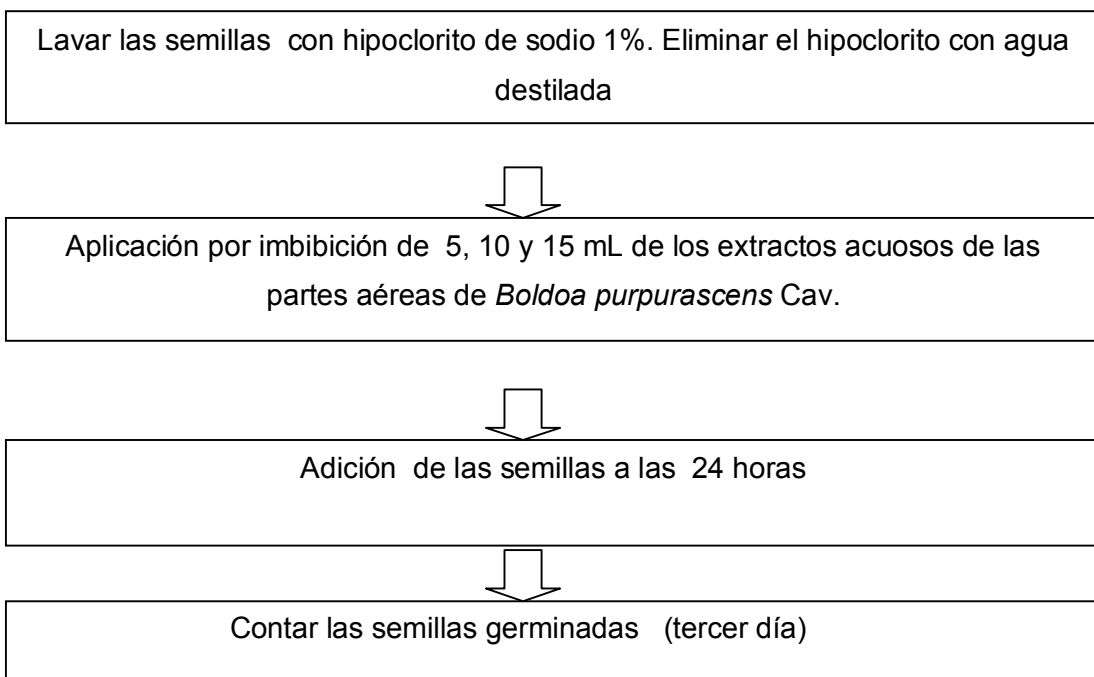
Se diseñó un experimento factorial (3^2) con 2 factores a 3 niveles cada uno (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Tratamientos empleados por imbibición en los experimentos en condiciones de campo.

Extracto acuoso de <i>B. purpurascens</i> Cav.
5, 10 y 15 mL de los extractos acuosos de hojas, tallos y flores de <i>Boldoa purpurascens</i>

El procedimiento experimental por imbibición en suelo se muestra en la figura

2.5.



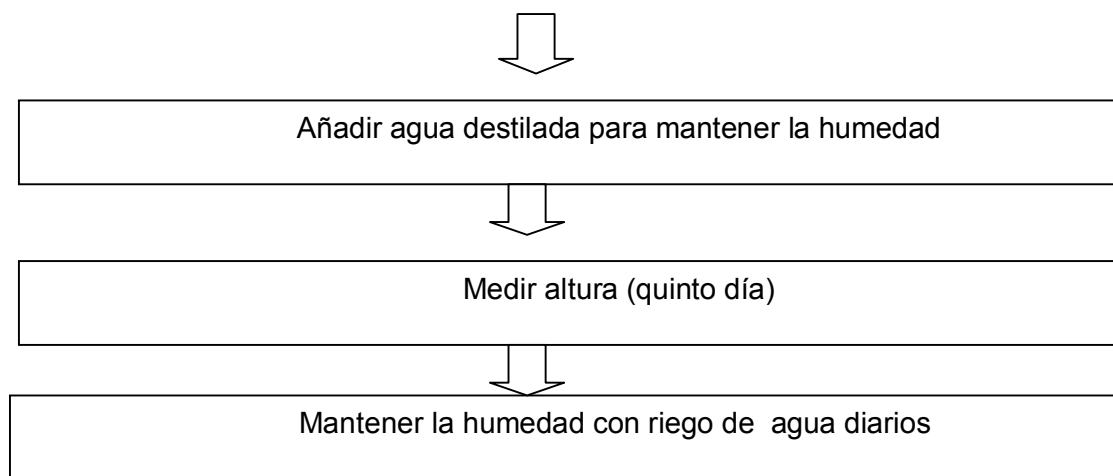


Figura 2.5. Diagrama de flujo del procedimiento a seguir para aplicación por imbibición de los extractos acuosos de partes aéreas (PAP) de *Boldoa purpurascens*.

2.1.4. Comparación de extractos por aplicación directa con los métodos convencionales de escarificación en condiciones de campo

Se realizó una comparación entre la aplicación directa con los métodos convencionales de escarificación en germinación y crecimiento en condiciones de campo.

La comparación por aplicación directa se realizó entre los extractos 5,10 y 15 mL de hojas, flores y tallos de *B. purpurascens* y los métodos convencionales de escarificación: agua 80°C (2 min), agua 10°C (2 min) y H₂SO₄ (5 min) experimental (Figura 2.4).

2.2. Detección de proteínas por electroforesis

El material vegetal se pulverizó con nitrógeno líquido antes de realizar la extracción. La corrida electroforética de proteínas se realizó empleando gel desnaturante de poliacrilamida 12.5% con dodecilsulfato de sodio 2% (SDS) y utilizando el sistema Mini-Protean® II (BIORAD Laboratories, EUA). Una vez separadas las proteínas se tiñeron con una solución de azul de Coomassie R-250 0,1 % (p/v), metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) por 20 minutos. Las bandas se visualizaron luego de la destinción del

gel con una solución de metanol 10% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Se empleó el marcador Applichem Protein Marker III a 200, 116,68, 43, 30, 20, 14 y 6.5KDa.

Tabla 2.1. Partes Aéreas de la planta y SDS.

Muestra	SDS (μL)
Flores	15
Hojas	10
Corteza	15

2.3. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de las proteínas se maceraron fragmentos de 100 mg de tejido vegetal con nitrógeno líquido y se suspendieron en 200 μL de tampón de extracción de proteínas, compuesto por: NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 100 mM, pH 7; EDTA 10 mM; β-mercaptoetanol 10 mM; Lauril sarcosinato de sodio 0,1% y Tritón X-100 0,1%. Posteriormente, se centrifugó a 4°C por 30 minutos a 12 225rev x g y se colectó el sobrenadante. Las muestras se diluyeron en tampón de carga [Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 1 % (p/v); glicerol 5 % (v/v); DTT 10 mM y Bromofenol azul 0,005 % (p/v)] y se calentaron por 10 minutos a 100°C. Se aplicó un estimado de 20 μg de proteínas totales por pozo y la corrida se realizó a un voltaje constante de 200 V durante 45 minutos aproximadamente en tampón (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8, Glicina 192 mM y SDS 35 mM). Se empleó como patrón la albúmina y se realizó la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 590 nm.

Variables estudiadas y procesamiento estadístico

Las variables estudiadas *in vitro* fueron la germinación total y el crecimiento del hipocótilo y radícula. En campo se determinaron la altura de la planta y la germinación total.

Los datos se procesaron mediante el empleo del paquete estadístico STATGRAPHICS. El procedimiento estadístico utilizado fue un análisis de varianza de clasificación ANOVA multifactorial y las medias fueron comparadas según la prueba de rangos múltiples de Duncan (1955), para un 95% de confianza.

Para comparar la germinación entre los métodos convencionales de escarificación *in vitro*, y la aplicación directa de extractos con la imbibición tanto *in vitro* como en campo se empleó un análisis de comparación de proporciones con un 95 % de confianza.

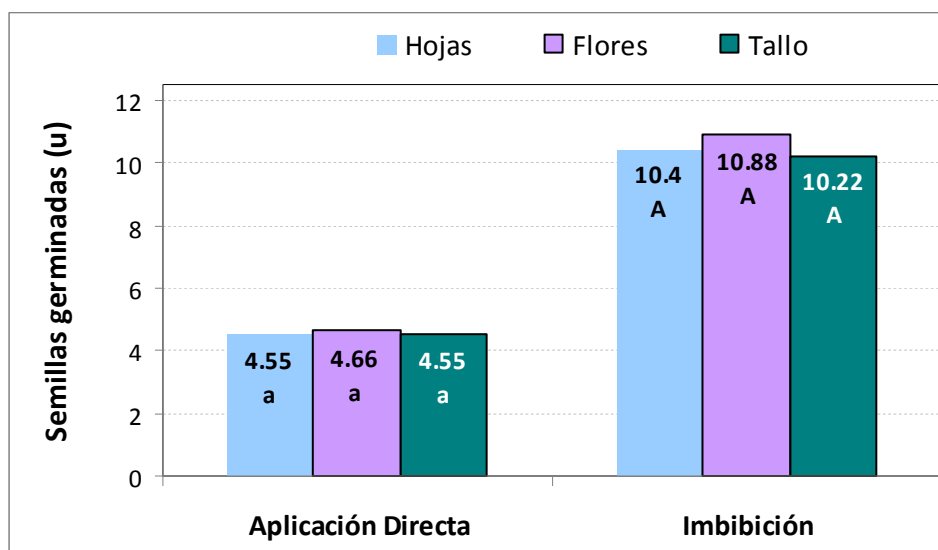
Capítulo 3. Resultados y Discusión

3.1. Efectos de extractos acuosos de *Boldoa purpurascens* en la germinación y crecimiento de *Leucaena leucocephala*

3.1.1. Aplicación directa e imbibición de semillas de *L. leucocephala* en extractos en la germinación y crecimiento *in vitro*

Efectos en la germinación

En el proceso de germinación de *Leucaena leucocephala*, tanto al aplicar directamente los extractos de las diferentes partes aéreas (flores, hojas y tallo) de *B. purpurascens* sobre las semillas, como al imbibirlas en los extractos, no se constataron diferencias estadísticamente significativas entre los extractos de flores, hojas y tallo (Figura 3.1.). Este resultado se cumple también para las dosis (Anexo 1).



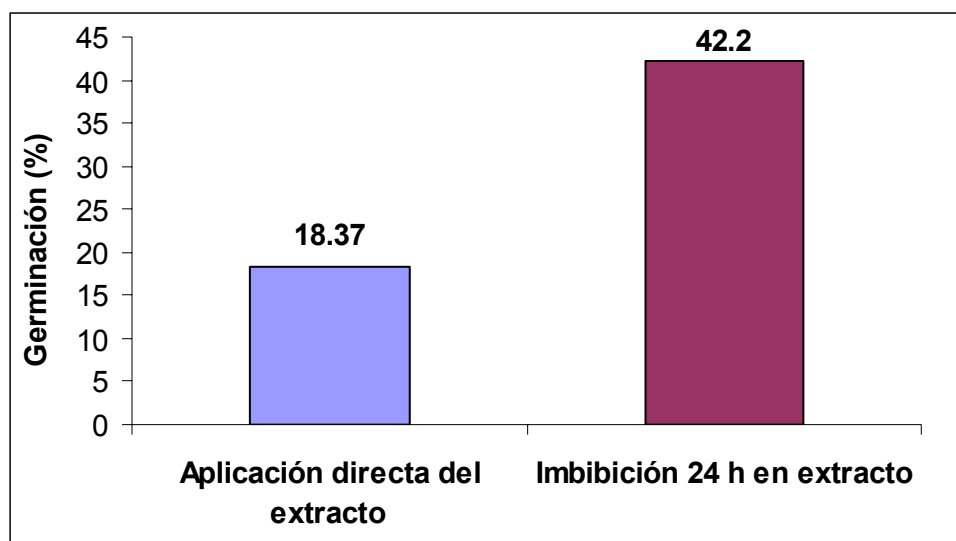
Letras distintas para un mismo método de aplicación difieren por Duncan para $p < 0.05$

Figura 3.1. Aplicación directa e imbibición de semillas de *L. leucocephala* en extractos en la germinación y crecimiento *in vitro*.

Los efectos usualmente pueden diferenciarse por la síntesis o la acumulación de determinadas sustancias en órganos específicos de la planta (61). La acumulación de

acaticócidos en las partes aéreas de *Centella asiática* citando la biosíntesis de alcaloides tropanicos en las raíces y los aceites esenciales en las glándulas de partes aéreas de plantas. En el presente estudio los resultados apuntan a que las sustancias involucradas pudieran producirse o acumularse sin diferencia en los tres órganos estudiados de la planta (hojas, flores y tallos), aunque serían necesarios otros estudios para comparar la actividad de las raíces de esta planta.

En adición a estos resultados, se observó mayor por ciento de semillas germinadas cuando se realizó el tratamiento con extractos por imbibición durante 24 horas (42.2 %), que cuando se aplicó el extracto directamente sobre las semillas en las placas (18.37%) (Figura3.2.).



Prueba de hipótesis z ($z = -9.39875$) $p = 0.00$. Por cientos referentes a un muestra $n = 675$

Figura 3.2. Comparación entre el tratamiento directo o por imbibición 24h con extractos de *B. purpurascens* (hojas, flores y tallos) sobre la germinación de las semillas de *L. leucocephala*.

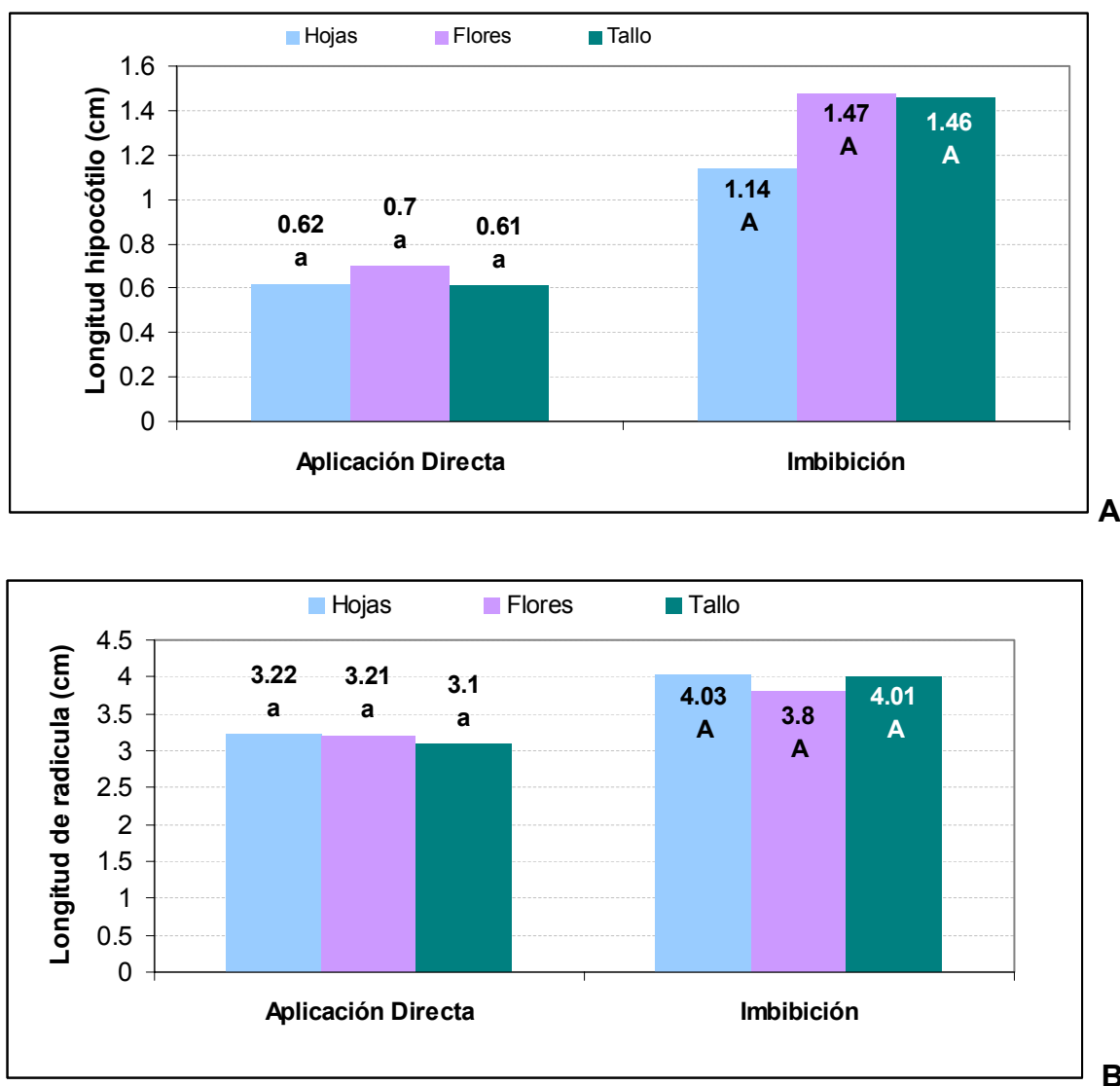
Algunas plantas pueden producir efectos estimulantes en la germinación de otras especies (51), encontraron efectos estimulantes de *Cassia uniflora* Mill. Spreng. (Caesalpiniaceae) sobre la germinación de *Brassica juncea* y *Raphanus sativus*.

Aunque los efectos son altamente dependientes de la concentración de los extractos, siendo las concentraciones más bajas de 2 -2.5% de 0.1g mL⁻¹ estimulantes y entre 15 -20% inhibitorias.

Presuntamente se conoce la actividad de algunas enzimas en el proceso germinativo, entre ellas una muy estudiada, las amilasas, al tratarse del almidón el principal constituyente de las reservas de las semillas. Sustancias de naturaleza proteica pudieran estar implicadas en los estímulos de estos procesos ya sean directamente o indirectamente. La importancia de las mismas radica en que permiten la reutilización de los aminoácidos constituyentes de las proteínas, lo que es fundamental en los procesos de desarrollo biológico. Así, durante la germinación se movilizan las reservas proteicas; durante el crecimiento y desarrollo permiten el recambio de las proteínas existentes por aquellas que la planta necesita para adaptarse a los cambios ambientales y durante la senescencia se producen los aminoácidos que serán reservados para su uso por la próxima generaciones capaz de movilizar las proteínas de reserva que presentan estas leguminosas forrajeras para así favorecer su germinación (27).

Efectos en el crecimiento

En el crecimiento del hipocótilo y la radícula de plántulas de *Leucaena leucocephala* tratadas por aplicación directa e imbibición, utilizando los extractos acuosos de los órganos aéreos de *Boldoa purpurascens* Cav. no se constataron diferencias estadísticamente significativas (figura 3.3.). En cuanto a las dosis se apreció que influyen de forma semejante en el crecimiento del hipocótilo y la radícula (Anexo 2 y 3).



Letras distintas para un mismo método de aplicación difieren por Duncan para $p < 0.05$

Figura 3.3. Aplicación directa e imbibición de semillas de *L. leucocephala* en extractos y sus efectos en la longitud del hipocótilo (A) y radícula (B), *in vitro*.

Los resultados obtenidos sobre el crecimiento de *L. leucocephala in vitro*, se asemejan a los obtenidos por Mominul e Hisashi⁽⁶²⁾, al estudiar extractos (30mg mL^{-1}) de *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae). En esta experiencia no se comprobó ningún efecto sobre el crecimiento de *Echinochloa crus-galli* L. y *Lactuca sativa* L. (lechuga), mientras que los extractos de *L. sibiricus* alcanzaron inhibir el crecimiento, de tallos y radículas en *Phleum pratense* L., *Digitaria sanguinalis* L. Scop., *Medicago sativa* L., *Brassica*

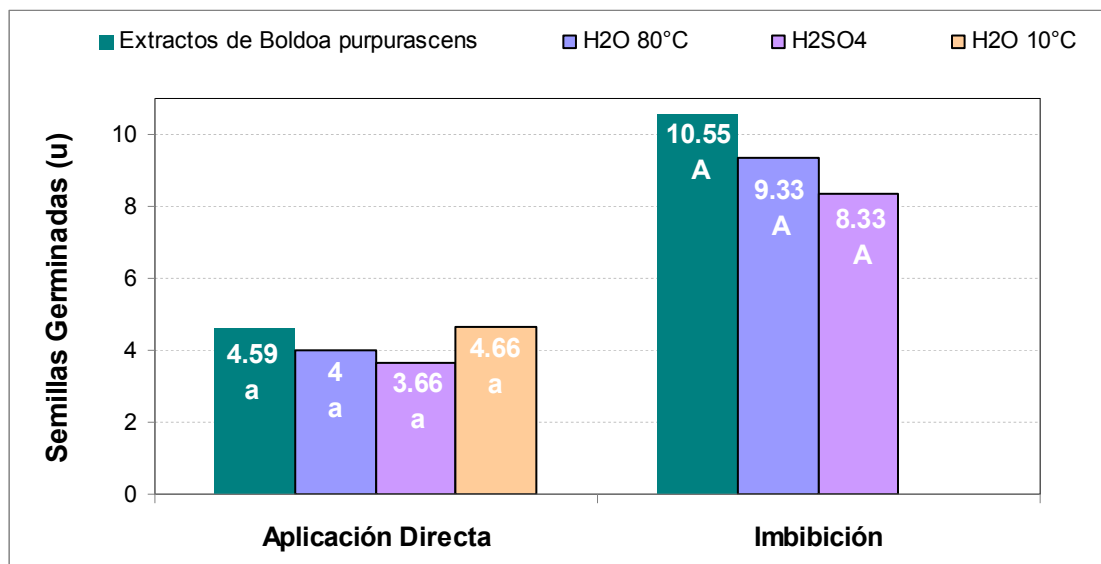
napus L. Esto evidencia una alta dependencia de la especie receptora en cuanto a la sensibilidad a los extractos de otras plantas. También autores como Ghayal *et al.* (51) han encontrado efectos estimulantes del crecimiento al emplear extractos sobre plantas.

3.1.2. Aplicación directa e imbibición de semillas de *L. leucocephala* en extractos y su comparación con los métodos convencionales de escarificación en la germinación y crecimiento *in vitro*

Efectos en la germinación

Al comparar los diferentes métodos de escarificación de semillas con respecto a los extractos de *Boldoa purpurascens* Cav., se puede decir que tanto cuando se aplicó directamente el extracto en las placas, sobre las semillas, como cuando se sometió a imbibición las semillas, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con métodos convencionales de escarificación y con el extracto acuoso de *B. purpurascens* (Figura 3.4). Resultado similar ocurrió con las dosis (Anexos 4).

Esto nos permite inferir que ejercen el mismo o similar efecto sobre el proceso de escarificación de *Leucaena leucocephala*, lo que pudiera aportar desde su contribución a la economía y agronomía de nuestro país, pues utilizando una planta medicinal como *Boldoa purpurascens* Cav en el proceso de germinación se logra un ahorro de recursos, tiempo y contribuye al cuidado de la salud de los trabajadores y la conservación del medio ambiente, ya que los métodos convencionales de escarificación son de alto riesgo para la salud del hombre y el medio.



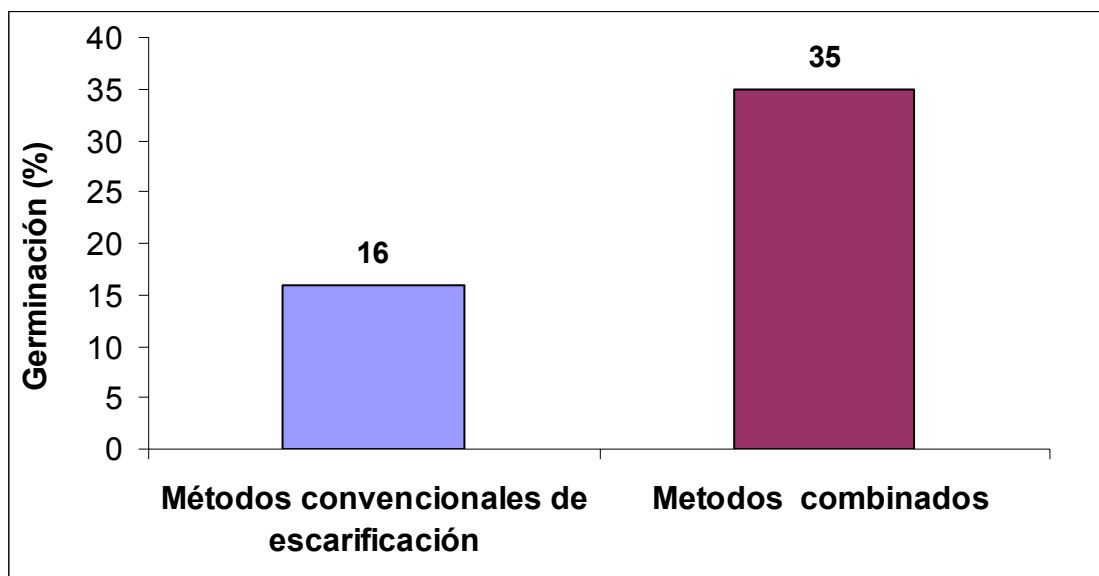
Letras distintas para un mismo método de aplicación difieren por Duncan para $p < 0.05$

Figura 3.4. Aplicación directa e imbibición de semillas de *L. leucocephala* en extractos y su comparación con los métodos convencionales de escarificación en la germinación *in vitro*.

Sanderson *et al.*⁽⁶³⁾, no observaron efectos significativos sobre la germinación de *Lactuca sativa* L. cuando probaron extractos acuosos de hojas (1-15%) de *Jatropha curcas* L. (Euforbiácea). Esto está altamente relacionado con la especie receptora de los extractos, factor que puede influir inclusive entre genotipos de una misma especie. La cuestión está en que los receptores de las moléculas activas se establecen de forma casi exacta por enlaces químicos entre las sustancias y los sitios de acción (64, 65).

Comparando los métodos convencionales de escarificación sobre la germinación de *L. leucocephala*, se observó un 35 % de germinación cuando se sometieron las semillas a escarificación con ácido y agua caliente y después se imbibieron por 24 horas en los extractos de *B. purpurascens*, frente a un 16.4% alcanzado sólo con la escarificación de las semillas. Esto indica la actividad de los extractos en el estímulo de la germinación de *L. leucocephala*, que superó en poco más que el doble la germinación de las semillas. Por otra parte no resulta viable los tratamientos de escarificación frente

al extracto de *B. purpurascens*, cuando se aplicó el método de imbibición, ya que sus efectos no se diferenciaron con los extractos (Figura 3.5).



Prueba de hipótesis z ($z = -4.24$) $p = 0.00$. Por cientos referentes a una muestra n: Métodos convencionales de escarificación $n = 225$ y Métodos combinados $n=150$.

Figura 3.5. Aplicación directa e imbibición de semillas de *L. leucocephala* en extractos y su comparación con los métodos convencionales de escarificación en la germinación *in vitro*.

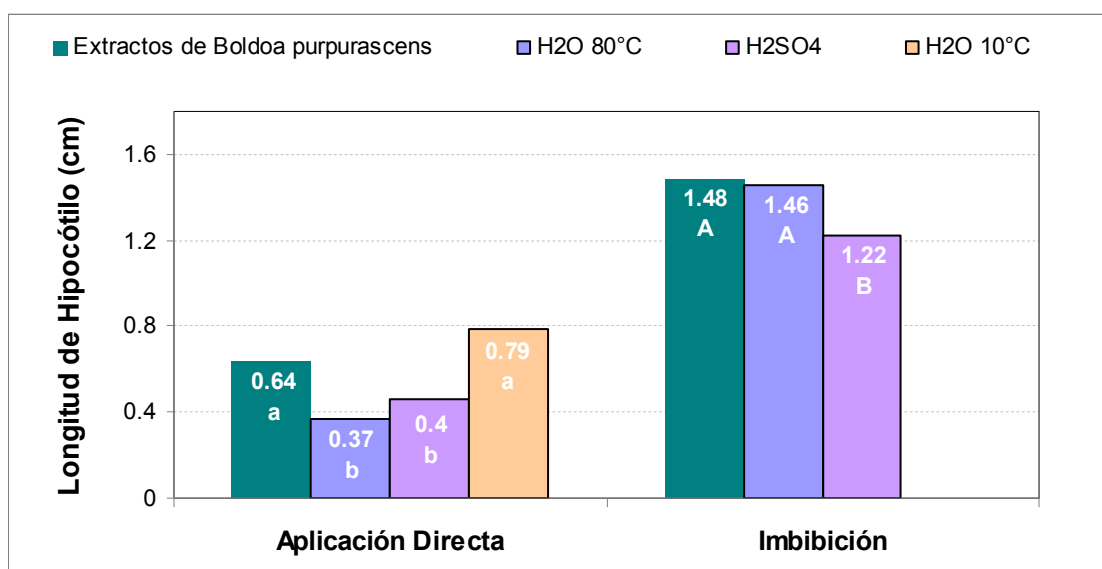
Se han obtenido buenos resultados en la escarificación de leguminosas al emplear ácidos y agua caliente para debilitar la estructura de la testa en las semillas. Ejemplo de ello lo obtuvo Merou⁽⁵⁰⁾, alcanzó un 99% de germinación de *Albizia julibrissin* Durazz (Leguminosa) con el empleo de H_2SO_4 por dos horas y también obtuvo resultados buenos al emplear agua caliente a 40-50°C por 1-2 horas (86-91%).

Aunque no se han reportado métodos convencionales combinando con extractos si se reportan combinaciones de métodos para lograr una mayor capacidad germinativa. Sánchez⁽⁶⁶⁾, comprobó mayor germinación de semillas envejecidas de especies de leguminosas (*Crotalaria spectabilis*, *Macroptilium atropurpureum* y *Mimosa invisa*) cuando se empleó, de entre varios métodos y sus combinaciones, la escarificación

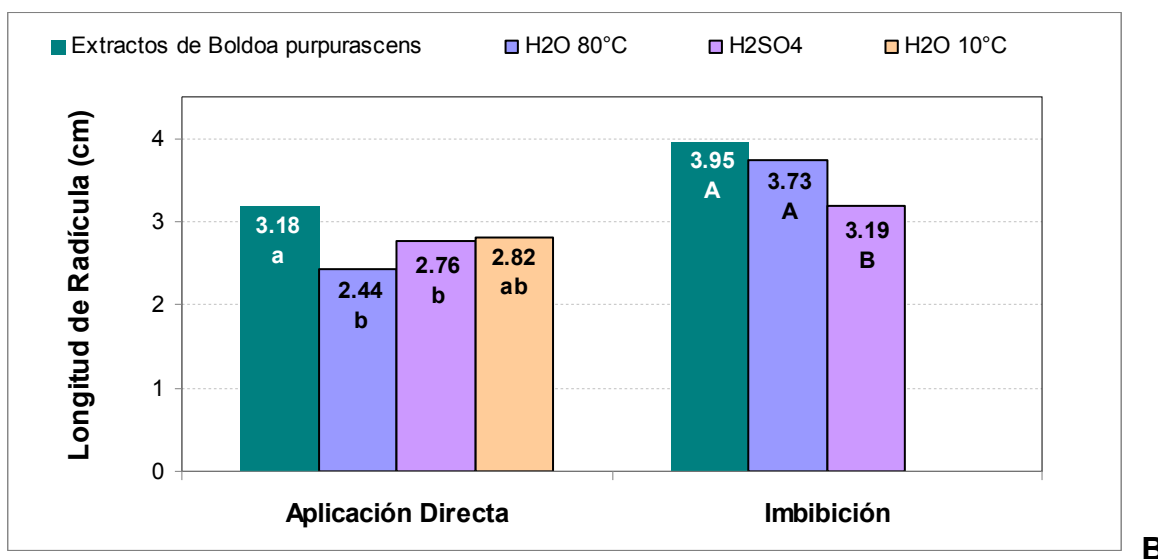
térmica (agua 80°C por 2 minutos) seguido de la hidratación-deshidratación en agua (6-48 horas respectivamente a 30°C). Este tratamiento resultó para las 3 especies más efectivo que la aplicación de la escarificación ácida o térmica por separado. Resultados similares en la combinación de métodos de escarificación han sido obtenidos también por (González *et al.*) ⁽⁶⁷⁾.

Efectos en el crecimiento

Al realizar la comparación de los diferentes métodos de escarificación de semillas respecto a las partes aéreas evaluadas se comprobó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes métodos, al aplicarlos directamente o por imbibición. Mientras que tanto en las dosis no existen diferencias significativas (Anexos 5 y 6). El extracto de *B. purpurascens* alcanzó buenos resultados al estimular el crecimiento longitudinal de hipocótilo y radícula respecto a los otros tratamientos de escarificación, aunque los tratamientos con agua resultaron 10 °C (2 minutos) resultaron igual de favorables, cuando se aplicaron los extractos directamente sobre las semillas. La imbibición de las semillas en el extracto, incrementó el estímulo sobre el crecimiento de *L. leucocephala*, de igual manera que cuando se trató con agua 80°C (2 minutos), pero ambas superaron la escarificación con ácido sulfúrico (Figura 3.6).



A



Letras distintas para un mismo método de aplicación difieren por Duncan para $p < 0.05$

Figura 3.6. Aplicación directa e imbibición de semillas de *L. leucocephala* en extractos y su comparación con los métodos convencionales de escarificación en la longitud de hipocótilo (A) y radícula (B), *in vitro*.

Los tratamientos con agua caliente a 80°C han sido probados por otros investigadores y recomendados con muy buenos resultados en *L. leucocephala* (67, 68).

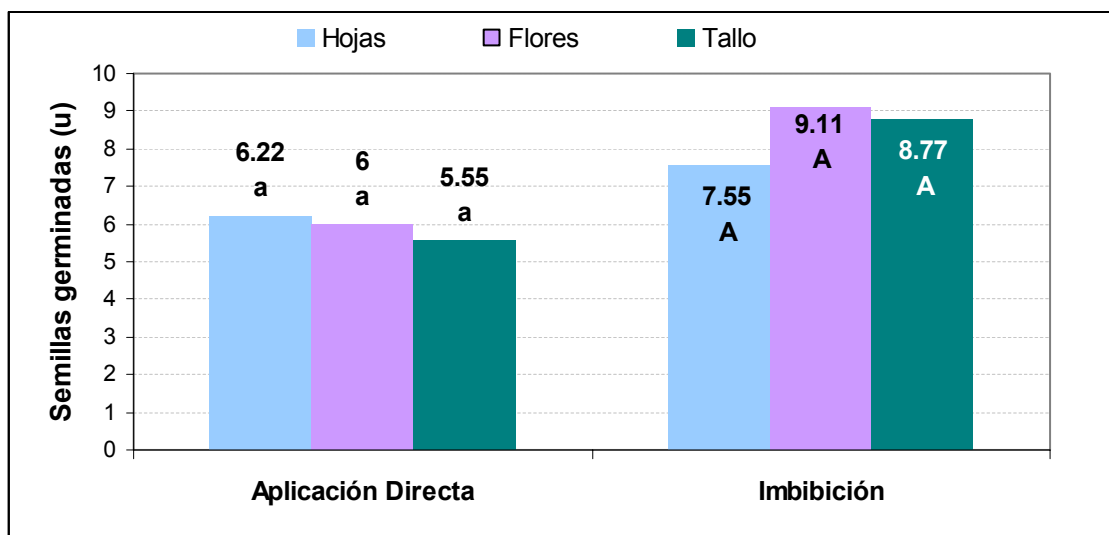
Al valorar el efecto de los extractos acuosos no debe olvidarse la presencia de algunos metabolitos secundarios en los extractos de *B. purpurascens*, estos pudiera ser también la causa del estímulo encontrado con estos. Así se identificaron cualitativamente la presencia de flavonoides, aminoácidos libres, triterpenos y esteroides, saponinas, ácidos grasos, mucílagos(1). El incremento de la actividad antioxidante en las células evita fundamental-mente la peroxidación lipídica y con ello el envejecimiento de las semillas McDonald^(56,69). Esta capacidad antioxidante se puede relaciona con la actividad de algunos metabolitos secundarios como los flavonoides, en general. Por otra parte la aplicación de extractos puede estimular la germinación e incrementar la actividad de las proteínas enzimáticas o incrementar su contenido como lo demostró Kavitha⁽⁶⁴⁾, al aplicar extractos de *Vitex negundo* L. sobre *Vigna spp.*.

La influencia de los extractos de plantas pueden afectar algunas fases fenológicas en particular, como lo demostró Sanderson⁽⁶³⁾, cuando, aun sin encontrar efectos de extractos de *J. curcas* (Jastrofa) sobre la germinación de *L. sativa* (lechuga), si se observaron efectos inhibitorios sobre el crecimiento del follaje y la raíces de la misma (70).

3.1.3. Aplicación directa e imbibición de semillas de *L. leucocephala* en extractos y germinación y crecimiento en condiciones de campo

Efectos en la germinación

En condiciones de campo los extractos de hojas, flores y tallos *B. purpurascens* no se diferenciaron en su efecto sobre la germinación de *L. leucocephala* (Figura 3.7). Tampoco las dosis mostraron efecto alguno (Anexo 7).

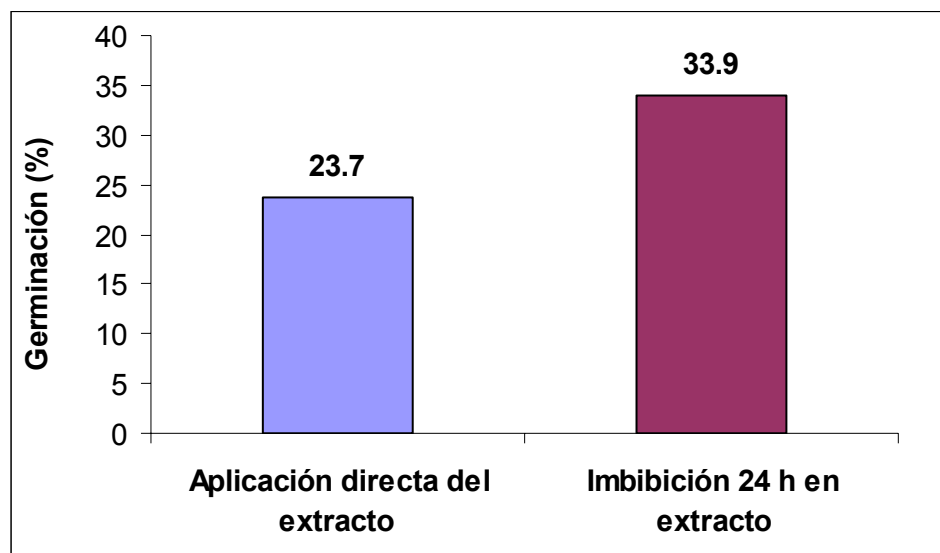


Letras distintas para un mismo método de aplicación difieren por Duncan para $p < 0.05$

Figura 3.7. Aplicación directa e imbibición de semillas de *L. leucocephala* en extractos y germinación en condiciones de campo.

En el efecto si se comprobó diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los métodos de aplicación directa e imbibición. La imbibición de las

semillas alcanzó 10% más de germinación (Germinación total: 33.9%) que cuando se aplicó directo el extracto de *B. purpurascens* sobre las semillas (Figura 3.8).

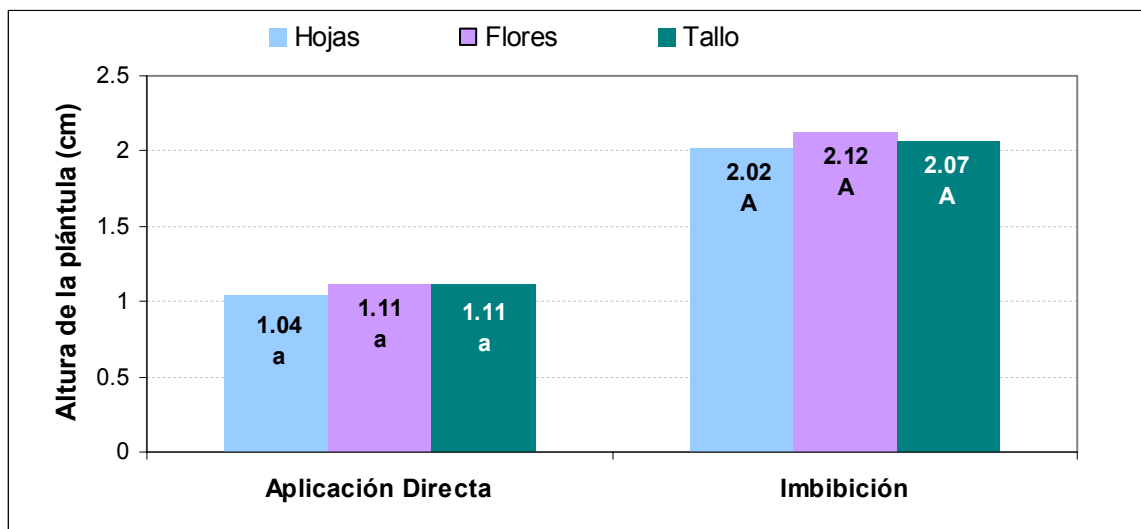


Prueba de hipótesis z ($z = -4.09$) $p = 0.00$. Por cientos referentes a una muestra $n = 675$

Figura 3.8. Aplicación directa e imbibición de semillas de *L. leucocephala* en extractos y germinación en condiciones de campo.

Efectos en el crecimiento

Al evaluar el crecimiento en altura de *Leucaena leucocephala* no se constataron diferencias estadísticamente significativas entre los órganos de *Boldoa purpurascens*, las dosis (Figura 3.9) (Anexo 8).



Letras distintas para un mismo método de aplicación difieren por Duncan para $p < 0.05$

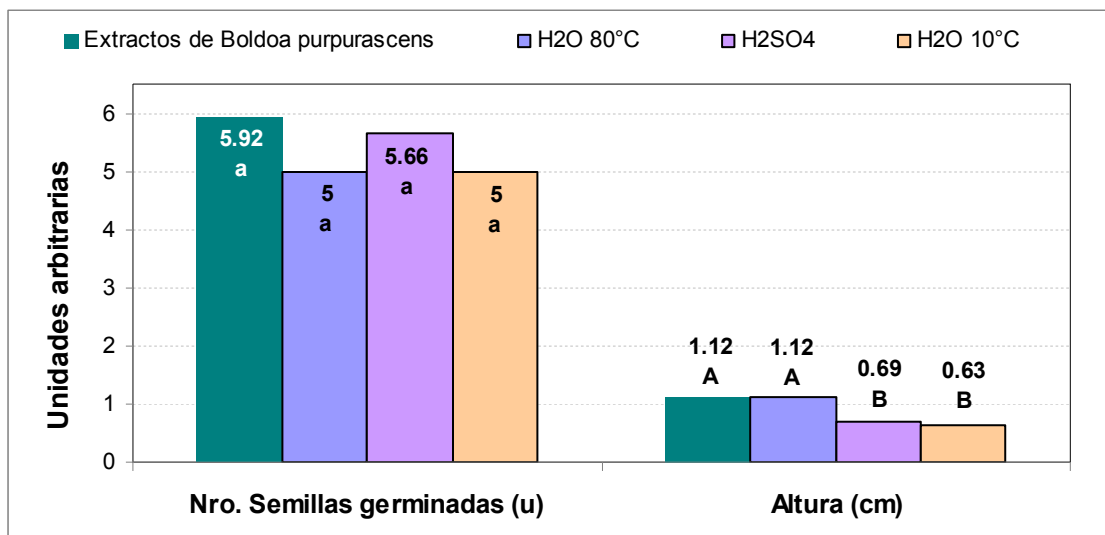
Figura 3.9. Efectos de extractos de *B. purpurascens* aplicados directamente y por imbibición de semillas sobre la altura de plántulas de *L. leucocephala*, en condiciones de campo.

Gang⁽⁵²⁾, encontró una alta dependencia de los órganos de *Parthenium hysterophorus* L. (Asteracea) en cuanto a su actividad sobre la germinación y crecimiento de *Raphanus sativus* L. y *Brassica juncea* (L.) Czern., aunque siempre dependiente de la concentración. Por ejemplo, sólo a concentraciones de 5% (la más baja) los extractos de tallos y raíces no tuvieron efectos sobre la germinación de *R. sativus*, mientras que sólo las raíces no afectaban la germinación de *B. juncea* a igual concentración. Las concentraciones más elevadas (hasta 100%), producían inhibición en la germinación y el crecimiento.

3.1.4. Aplicación directa en extractos y su comparación con los métodos convencionales de escarificación en la germinación y crecimiento en condiciones de campo

Al evaluar el número de semillas germinadas en campo se observó que no existen diferencias significativas entre los extractos de *B. purpurascens* y los métodos

convencionales de escarificación, similar resultado se apreció en las dosis y las réplicas (Figura 3.10) (Anexos 9 y 10).



Letras distintas para un mismo método de aplicación difieren por Duncan para $p < 0.05$

Figura 3.10. Aplicación directa en extractos y su comparación con los métodos convencionales de escarificación en la germinación y crecimiento *en suelo*

Efectos similares obtuvo Torres *et. al.*⁽⁷¹⁾, al probar extractos acuosos de *Phylla strigulosa* (Mart. y Gal.) Mold. (Verbenacea) sobre cultivos, comprobándose estímulo en el crecimiento del tallo y radícula de soja maíz, pepino y frijol.

3.2. Detección de proteínas por electroforésis

Para comprobar la presencia de proteínas en los órganos de la planta se realizó una corrida electroforética, empleando patrones de elevado y bajo peso molecular, donde se pudo apreciar la evidencia marcada de este tipo de metabolito en las hojas, flores y corteza del tallo, aunque no aparece evidencia de estas en el tallo no se puede decir categóricamente que no existen, pues es posible que bajo las condiciones del gel no se visualicen, conociendo que en la corteza existen. De acuerdo al electroforograma, las proteínas presentes en los órganos de la especie evaluados son de bajo peso molecular apareciendo en el intervalo entre 10 y 70 KDa y según la cuantificación

realizada se observa que la mayor cantidad se acumulan en hojas y flores y por último en la corteza.

La figura 3.11 muestra las bandas reflejadas en la electroforesis donde se puede apreciar la presencia de proteínas en ellas estando en mayor proporción en las hojas.

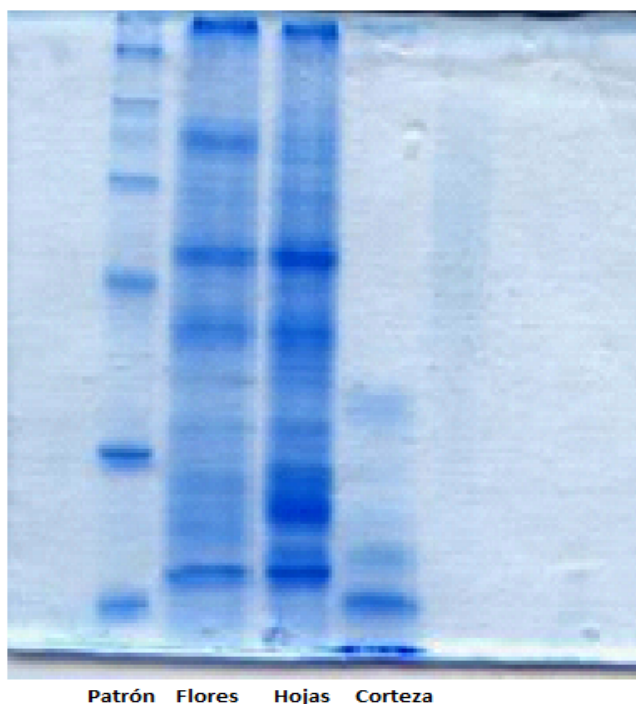


Figura 3.11. Resultados de la electroforesis en flores, hojas y corteza de *Boldoa purpurascens*.

El almidón es uno de los mayores componentes (más del 50%) de reserva en las semillas de muchas plantas, este carbohidrato es la principal fuente de energía e importante para el desarrollo y crecimiento de la planta; ya que, cuando las semillas inician el proceso de germinación, el almidón comienza a hidrolizarse por acción de las α amilasas; con la finalidad de proporcionar las moléculas de glucosa que serán oxidadas para producir la energía necesaria para el desarrollo del embrión (59). En tal sentido Bedón⁽⁶⁰⁾, refieren la presencia de enzimas hidrolíticas de tipo α -amilasas con una peso

molecular de 44 KDa en extractos de semillas de *Chenopodium quinoa*, coincidentemente con la talla encontrada en *Triticum* sp., de 43 KDa (54).

Por otra parte, también se ha encontrado efectos inhibitorios de extractos que pueden suprimir algunas funciones en la movilización de las reservas de las semillas y por tanto retardar o inhibir la germinación. Tal es el caso del estudio realizado por Bogatek ⁽⁵⁸⁾, donde se encontraron bajos niveles de absorción de oxígeno dado por la reducción de la actividad de la isositrato liasa, ligada a la disponibilidad de sustratos para el proceso respiratorio.

3.3. Cuantificación de proteínas

Los resultados obtenidos en la cuantificación de proteínas realizados mediante el método de Bradford, muestra que en las hojas aparece la mayor concentración de estos metabolitos, seguidos de la flores y por último la corteza (Tabla 3.1), observándose total correspondencia con los resultados de la electroforésis. Esto nos permitió corroborar la presencia de estos componentes en todas las partes aéreas de la especie, ya que solamente se poseía información de la presencia de compuestos con grupos aminos según el tamizaje fitoquímico realizado (4).

Tabla 3.1. Resultados de la cuantificación de proteínas

Muestra	Concentración (mg·mL ⁻¹)
flor	2,39
hoja	5,62
corteza	1,02

Conclusiones

1. El uso de los extractos de *Boldoa purpurascens* Cav. permiten sustituir total o parcialmente los métodos tradicionales de escarificación por la influencia que mostraron en la germinación, crecimiento de hipocótilo, radícula y altura de *Leucaena leucocephala*.
2. Las proteínas presentes en la especie *Boldoa purpurascens* Cav son de bajo peso molecular (10 -70 KDa) de acuerdo al los resultados de electroforesis, encontrándose concentraciones de 2,39; 5,62 y 1,02 mg·mL⁻¹ en flores, hojas y tallos respectivamente.

Recomendaciones

1. Evaluar el uso de la especie para mejorar la germinación de semillas de diferentes tiempos de almacenamiento.
2. Identificar el tipo de proteínas que presenta *Boldoa purpurascens* Cav.

Bibliografía

1. Roig M J. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba.
ed. La Habana: Editorial Científico -Técnica; 1988.
2. . 3 ed ed. La Habana: Editorial Ciencia y Técnica; 1988. Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos; p. 255.
3. Burger WC, ed. Flora Costaricensis. Chicago: Publisher: Chicago, Ill. : Field Museum of Natural History; 2005.
4. Elide C. Aislamiento y caracterización de metabolitos a partir de las hojas de *Boldoapurpurascen* Cav. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico.. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico. La Habana: Departamento de Farmacia; 2010.
5. Franco F, Pedroso R, Noa A. Lista oficial de plantas. Material complementario para la Botánica Santa Clara: ; 2004.
6. León. Flora de Cuba. 2. Dicotiledóneas: Casuarináceas Meliáceas. La Habana: Colegio "De La Salle" 10; 1951.
7. Yepes S, editor. Introducción al estudio las leguminosas 1971.: Memoria EEPF "Indio Hatuey".
8. Wilson G, Cradock F, Flemons L. Pasture and soil fertility investigations in Belliger district. Agric Gaz NSW. 1961 72:243
9. Everist SL. *Leucaena leucocephala* the correct botanical name for *Leucaena glauca*. Qd J Agric Sci 1963;20:547
10. Gillis WT, Stearn WT. Tyfication of the names of the species of *Leucaena* and *Lysiloma* in the Bahamas. TAXON - Journal of the IAPT. 1974;23:185
11. Linnaeus. Pastos y Forrajes 1978.
12. Brewbaker JL. Guide to the systematics of the genus *Leucaena* (Mimosaceae) visiting Scientist. 1978: Available from: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/Edge/jul97/jul97new.shtml>.
13. Dequan L, Gilbert M. Nyctaginaceae. In: Wu Z, Raven PH, Hong D, editors. Flora of China: Ulmaceae through Basellaceae. Beijing: Science Press; 2003. p. pp 430-3.

14. Carpenter S P. The Nyctaginaceae and Chenopodiaceae of northwestern South America. : Field Museum of natural history; 1931.
15. Stern, Nicolayevsky. Manual de Actualización Técnica Semillas Papalotla el Futuro del campo 2001.
16. González Y, Mendoza F. Efecto del agua caliente en la germinación de *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham. Matanzas, Cuba: EEPF "Indio Hatuey" 1995. p. 18-59
17. Dixon RK, Garg VK, Rao MV. Inoculation of *Leucaena* and *Prosopis* seedlings with glomus and rhizobium species in saline soils: Rhizosphere relations and seedling growth. *Arid Soil and Rehabilitation. Ann For Sci.* May-June 2003;60(4):pp 379 - 84.
18. Flora de Cuba. 2. Dicotiledóneas: Casuarináceas Meliáceas [database on the Internet]1957. Available from: http://kiki.huh.harvard.edu/databases/publication_search.php?mode=details&id=662.
19. Yepes S. Centro de diversificación de las leguminosas forrajeras en América. *Revista Series Téc Cienc Agrop.* 1975;18(A-7).
20. Anon F F. *Leucaena leucocephala* for cattle grazing. 1975
21. González D. Evaluación fitoquímica y farmacológica de las hojas de la especie *Boldoapurpurascens* Cav. La Habana: Intituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de Habana; 2006.
22. Fernández M L, González M D. Evaluación fitoquímica y toxicológica del extracto hidroalcohólico al 80% del tallo de *Boldoa purpurascens* Cav. [TD]. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2011.
23. Rodríguez E. Avances en el estudio fitoquímico de dos especies vegetales: *Boldoapurpurascens* y *Portulacaolerácea*. . Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2001.
24. Rojas H N, Matos A M, Romeu A B. Actividad antibacteriana de *Boldoa purpurascens* Cav *Rev Cubana Plant Med.* 2004;9(2).
25. Milián L. Estudio fitoquímico y genotóxico del extracto acuoso de *Boldoapurpurascens*. 2000.
26. Hernández I. Utilización de tres especies arbóreas en un contexto silvopastoril. [T Doctor en Ciencias]. La Habana: CUJAE; 2000.

27. Teleguario S C. Caracterización y cuantificación de flavonoides, sapogeninas esteroidales en extractos de tres plantas mesoamericanas *Lippia Graveolens* (Orégano), *Passiflora Edulis* (Maracuyá) y *Smilax Domingensis* (Zarzaparrilla). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2008.
28. Pérez M M, Boffil C. M, González M D. Efecto de la administración oral continuada de *Boldoa purpurascens* Cav. sobre diferentes variables fisiológicas en ratas. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2009;8:pp 203 - 10.
29. González D, Cuéllar A, Cid M, Cabrera K, Hernández P. Evaluación del efecto diurético del extracto acuoso de *Boldoa purpurascens* Rev Cubana Farm (suplemento especial). 2001;35(6):174.
30. Funes F. Integración ganadería-agricultura con bases agroecológicas. Plantas y animales en armonía con la naturaleza y el hombre,. Matanzas: Ed. Instituto de Investigación de Pastos y Forrajes; 2004.
31. Maldonado G S. La colección de plantas acuáticas del Jardín Botánico Nacional de Cuba. Revista del Jardín Botánico Nacional. 2010:pp 15-31.
32. Tang M, Menéndez J. Estudio de la nodulación natural de leguminosas tropicales. Pastos y Forrajes. 1990;2:13.
33. Napompeth B, MacDicken KG. *Leucaena psyllid*: problem and management. Bogor, Indonesia: Proceedings of an International Workshop; 1989.
34. Feles G, Monzote M, Ruiz TE. La planta. In: Ruíz TR, Febles G, editors. *Leucaena*, una opción para la alimentación bovina en el trópico y subtrópico. La Habana: EDICA. Cuba.; 1987.
35. Lucena C. N, Ribamar de CO J. Effect of cutting height on the yield and protein content of *leucaena*. *Leucaena Research Reports* 1992:pp 6-1336. Lucena C N, Paulino VT. Comparative performance of four *Leucaena* cultivars in an ultisol. *Leucaena Research Reports*. 1990:pp 11-37.
37. López M. Simbiosis Rizobio-*Leucaena*: inoculación. In: Ruíz T, Febles G, editors. *Leucaena*, una opción para la alimentación bovina en el trópico y subtrópico. La Habana, Cuba: EDICA; 1987. p. 43.

38. Date RA. Inoculation of tropical pasture legumes. Workshop on exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture. Hawaii: College of Tropical Agriculture; 1977. p. 293.
39. Tang M. Study of Rhizobium inoculation in tropical forage legumes in Cuba. [Dissertation for the Candidate Science Degree]. Prague, Czechoslovakia 1988.
40. Trinick J. Nodulation in tropical legumes. I. Specificity in the Rhizobium symbiosis of *Leucaena leucocephala*. . Expl Agric. 1968;4:243
41. Cordovi E, R. A. Estudio comparativo de variedades de *Leucaena* (*Leucaena leucocephala*) . . Ciencia y Técnica en la agricultura. 1984;7(1):p 17
42. Cossío L. Reguladores de crecimiento. Guía de Estudio Cátedra de Fisiología Vegetal 2013: Available from: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Reguladores%20de%20Crecimiento%20en%20las%20plantas.pdf>.
43. González Y, Hernández A, Mendoza F. Comportamiento de la germinación y la viabilidad de las semillas de leguminosas arbustivas. Memorias Taller Internacional Silvopastoril “Los árboles y arbustos en la ganadería”. Matanzas, Cuba: EEPF “Indio Hatuey” 1998. p. 107.
44. Ruaysoongnern S. The nutrition of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit cv. Cunningham seedlings. I. External requirements and critical concentrations in index leaves of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, sulfur and manganese. Australian Journal of Agricultural Research 1989;40(6):1241 - 51
45. Socorro AyDM. Granos. Edit. Pueblo y Educación. ed. La Habana, 1989.
46. Buch MS, Jara LF, Franco E, Fariñas MR. Viabilidad de semillas pretratadas de *Caesalpinia velutina* (B&R) Standl., *Enterolobium cyclocarpum* (J) Griseb y *Leucaena leucocephala* (Lam) Boletín de Mejoramiento Genético y Semillas Forestales. 1997;1:pp 8-16
47. Schmidt L. Guide to handling of tropical and subtropical Forest seed.: Danida Forest Seed Centre; 2000. Available from: <http://sl.dfsc.dk/Extensionstudy/EXT-823.htm>.

48. Clavero T. *Leucaena leucocephala*. Alternativa para la alimentación animal. 1998 Centro de Transferencia de Tecnologías en Pastos y Forrajes. Universidad del Zulia, Venezuela. :78.
49. Tomás L, Frías R. Escarificación de semillas de gramíneas forrajeras un ambiente de aprendizaje en el tema. Nogales. Predio "Las Agujas", Nextipac, Zapopan, Jalisco,: Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias; 2010.
50. Merou T, Tacos I, Konstantinidou E, Galatsidas S, Varsamis G. Effect of different pretreatment methods on germination of *Albizia julibrissin* seeds. *Seed Sci & Technol*. 2011;39:pp 248-52.
51. Ghayal N, Dhumal K, Deshpande N, Kulkarni A, Phadke A, Shah S. Phytotoxic effects of *Cassia uniflora* leaf leachates on germination and seedling growth of radish (*Raphanus sativus*) and mustard (*Brassica juncea*). *Allelopathy Journal* 2007;19:pp 361-72.
52. Hu G, Zhang Z, Hu B. Allelopathic potential of *Parthenium hysterophorus* L. extracts on seed germination and seedling growth of two crops. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 2013;11(3-4):pp 1460-2.
53. . Grain Legumes. 6th European Conference on Grain Legumes; Noviembre 2007; Lisboa.
54. Machaiah J, Vakil U. Isolation and partial characterization of α -amylase components evolved during early wheat germination Bhabha atomic research center 1984;6
55. Peptidasa vegetales. Available from: https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/2-Peptidasas_vegetales.pdf.
56. McDonald M. Seed deterioration: physiology, repair, and assessment. *Seed Sci & Technol*. 1999;27:177.
57. Cuéllar C A, Miranda M M. Farmacognosia y productos naturales. La Habana: Editorial Félix Varela 2001.
58. Bogatek R, Gniazdowska A, Stępien J, Kupidłowska E, editors. Sunflower Allelochemicals Mode of action in germinating Mustard Seeds. Fourth World Congress on Allelopathy; 2005; Wagga Wagga, Australia.: The Regional Institute Limited, Charles Sturt University.

59. Coon EA, Stumpf R. Bioquímica fundamental. 2 ed ed. México Ediciones Limusa; 2001.
60. Gómez MB, Cárdenas O, Carpio C, Román AG. Purificación Parcial y Caracterización de Alfa Amilasa de granos germinados de *Chenopodium quinoa* (Quinoa). *Revista ECIPerú* 2013;10:pp 51-8.
61. Mangas SA. Producción de saponinas triterpénicas en cultivos in vitro de *Centella asiatica*. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2009.
62. Mominul AK, H KN. Allelopathic activity of *Leonurus sibiricus* on different target plant species. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 2014;12:pp 286 – 9.
63. Sanderson K, Bariccatti RA, Primieri C, Viana OH, Viecegli CA, Junior HGB. Allelopathic influence of the aqueous extract of *Jatropha* on lettuce (*Lactuca sativa* var. Grand Rapids) germination and development *Journal of Food, Agriculture & Environment* 2013;11:pp 641-3
64. Leicach S. Alelopatía. Estrategia defensiva de los vegetales. *Revista Ciencia Hoy* [serial on the Internet]. 2005; 15(89): Available from: <http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy89/alelopatia.htm>
65. Kavitha D, Prabhakaran J, Arumugam K. Allelopathic influence of *Vitex negundo* L. on germination and growth of Greengram (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) and Blackgram(*Vigna mungo* (L.) Hepper). *International Journal Of Ayurvedic And Herbal Medicine*. 2012;2:pp 163-70.
66. Sánchez JA, Bárbara MJ, Laura M. Efectos combinados de escarificación t de hidratación parcial en la germinación de semillas envejecidas de leguminosas. *Pastos y Forrajes* 2003 26(1):327.
67. González Y, Reino J, Sánchez J, Fung C, Machado R. Validación de la técnica de hidratación-deshidratación en semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham. . *Pastos y Forrajes*. 2005;28:pp 117-26.
68. González Y, Reino J, Machado R. Dormancia y tratamientos pregerminativos en las semillas de *Leucaena spp.* cosechadas en suelo ácido. *Pastos y Forrajes*. 2009;32(4):pp 1-.
69. McDonald M. Seed priming. In: Black M, Bewley J, editors. *Seed technology and its biological basic*. Sheffield: Academic Press; 2000. p. 286.

70. León-García A. Efectos fitotóxicos de *Petiveria alliacea* L. y *Phyla strigulosa* var *sericea* (M.Martenes & Galeotti) Moldenke) sobre la germinación de *Portulaca olearacea* L. 43 Jornada Científica Estudiantil. []. In press 2014.
71. Torres S, Hernández M, Puente M, De Cupere F, Van Damme P. Efectos alelopáticos de *Phyla strigulosa* sobre la germinación y crecimiento de cultivos. *Centro Agrícola*. 2006;33(2):pp 69-73.

Anexos

1. Germinación por aplicación directa e imbibición de las partes aéreas de la planta (PAP) (hojas, flores, tallos) de *Leucaena leucocephala in vitro*

Tabla 1. Resultados del análisis de la varianza en la germinación de *Leucaena* por aplicación directa

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
A:PAP	0.0740741	2	0.037037	0.04	0.9575
B:Dosis	4.4537	2	2.22685	2.62	0.0979
C:Réplica	5.12037	2	2.56019	3.01	0.0721
Residuales	17.0278	20	0.851389		
Total de Corrección	22.5185	26			

Coeficiente de variación	20.264%
--------------------------	---------

Tabla 2. Resultados del análisis de la varianza en la germinación de *Leucaena leucocephala* por imbibición.

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
A:PAP	2.0	2	1.0	0.48	0.6250
B:Dosis	1.55556	2	0.777778	0.37	0.6925
C:Réplicas	1.55556	2	0.777778	0.37	0.6925
Residuales	41.5556	20	2.07778		
Total de Corrección	46.6667	26			

Coeficiente de variación	12.6922%
--------------------------	----------

2. Crecimiento del Hipocótilo por aplicación directa e imbibición *in vitro* de *Leucaena leucocephala*

Tabla 3. Resultados análisis de la varianza del crecimiento de hipocótilo por aplicación directa de *Leucaena leucocephala*

.Grupos	Suma de los cuadrados	Grados de libertad Df	Cuadrado medio	Razón de Fisher	Valor de significación (p)
A:PAP	0.0498741	2	0.024937	1.37	0.2758
B:Dosis	0.0652074	2	0.0326037	1.80	0.1915
C:Réplicas	0.00482963	2	0.00241481	0.13	0.8761
Residuales	0.362807	20	0.0181404		
Total de Corrección	0.482719	26			

Coeficiente de variación	21.0466%
--------------------------	----------

Tabla 4. Resultados análisis de la varianza del crecimiento de hipocótilo por imbibición de *Leucaena leucocephala*.

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
A:PAP	0.0177852	2	0.00889259	0.59	0.5626
B:Dosis	0.0606741	2	0.030337	2.02	0.1588
C:Réplicas	0.0216074	2	0.0108037	0.72	0.4992
Residuales	0.300363	20	0.0150181		
Total de Corrección	0.40043	26			

Coeficiente de variación	8.3497%
--------------------------	---------

3. Crecimiento de la radícula por aplicación directa e imbibición in vitro de *Leucaena leucocephala*

Tabla 5. Resultados análisis de la varianza del crecimiento de la radícula por aplicación directa de *Leucaena leucocephala*.

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
A:PAP	0.0833185	2	0.0416593	0.57	0.5758
B:Dosis	0.0428741	2	0.021437	0.29	0.7499
C:Réplicas	0.137096	2	0.0685481	0.93	0.4095
Residuales	1.46812	20	0.0734059		
Total de Corrección	1.73141	26			

Coeficiente de variación	8.11023%
--------------------------	----------

Tabla 6. Resultados análisis de la varianza por imbibición del crecimiento de la radícula de *Leucaena leucocephala*

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
A:PAP	0.284867	2	0.142433	2.53	0.1049
B:Dosis	0.196156	2	0.0980778	1.74	0.2007
C:Réplicas	0.267622	2	0.133811	2.38	0.1186
Residuales	1.12616	20	0.0563078		
Total de Corrección	1.8748	26			

Coeficiente de variación	6.79246%
--------------------------	----------

4. Métodos convencionales de escarificación y extractos acuosos de *B. purpurascens* por aplicación directa e imbibición *in vitro* de la germinación de *Leucaena leucocephala*

Tabla 7. Resultados análisis de la varianza de los métodos convencionales de escarificación y extractos acuosos de *B. purpurascens* en la germinación por aplicación directa de *Leucaena leucocephala*.

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
Entre los grupos	3.12037	3	1.04012	1.20	0.3273
Dentro de los grupos	27.8519	32	0.87037		
Total de Corrección	30.9722	35			

Coeficiente de variación	21.0343%
--------------------------	----------

Tabla 8. Resultados análisis de la varianza de los métodos convencionales de escarificación y extractos acuosos de *B. purpurascens* en la germinación por imbibición de *Leucaena leucocephala*

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
Entre los grupos	16.0606	2	8.0303	3.44	0.6
Dentro de los grupos	70.0	30	2.33333		

Coeficiente de variación	16.0112%
--------------------------	----------

5. Métodos convencionales de escarificación y extractos acuosos de *B. purpurascens* por aplicación directa e imbibición *in vitro* del crecimiento del hipocótilo en *Leucaena leucocephala*

Tabla 9. Resultados análisis de la varianza por aplicación directa de métodos convencionales de escarificación y extractos acuosos de *B. purpurascens* en el crecimiento del hipocótilo de *Leucaena leucocephala*.

Grupos	Suma de los cuadrados	Grados de libertad Df	Cuadrado medio	Razón de de Ficher	Valor de significación (p)
Entre los grupos	0.51257	3	0.170857	10.14	0.0001
Dentro de los grupos	0.539452	32	0.0168579		
Total de Corrección	1.05202	35			

Coeficiente de variación	28.3184%
--------------------------	----------

Tabla 10. Resultados análisis de la varianza por imbibición de métodos convencionales de escarificación y extractos acuosos de *B. purpurascens* en el crecimiento del hipocótilo por imbibición de *Leucaena leucocephala*

<i>.Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
Entre los grupos	0.182025	2	0.0910125	5.91	0.0069
Dentro de los grupos	0.461963	30	0.0153988		
Total de Corrección	0.643988	32			

Coeficiente de variación	9.71249%
--------------------------	----------

6. Métodos convencionales de escarificación y extractos acuosos de *B. purpurascens* por aplicación directa e imbibición *in vitro* del crecimiento de la radícula de *Leucaena leucocephala*

Tabla 11. Resultados análisis de la varianza del crecimiento de la radícula por aplicación directa de *Leucaena leucocephala*.

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
Entre los grupos	1.93216	3	0.644052	8.57	0.0003
Dentro de los grupos	2.40607	32	0.0751898		
Total de Corrección	4.33823	35			

Coeficiente de variación	11.5106%
--------------------------	----------

Tabla 12. Resultados análisis de la varianza del crecimiento de la radícula por imbibición *in vitro* de *Leucaena leucocephala*

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
Entre los grupos	1.62952	2	0.814761	9.01	0.0009
Dentro de los grupos	2.71347	30	0.0904489		
Total de Corrección	4.34299	32			

Coeficiente de variación	9.5343%
--------------------------	---------

7. Germinación en condiciones de campo por aplicación directa e imbibición de *Leucaena leucocephala*

Tabla 13. Resultados análisis de la varianza de la germinación por aplicación directa de *Leucaena leucocephala*.

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
A:PAP	2.07407	2	1.03704	0.98	0.3930
B:Dosis	3.18519	2	1.59259	1.50	0.2464
C:Réplicas	5.40741	2	2.7037	2.55	0.1030
Residuales	21.1852	20	1.05926		
Total de Corrección	31.8519	26			

Coeficiente de variación	18.6777%
--------------------------	----------

Tabla 14. Resultados análisis de la varianza de la germinación por imbibición de *Leucaena leucocephala*.

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
A:PAP	12.0741	2	6.03704	2.80	0.0850
B:Dosis	14.7407	2	7.37037	3.41	0.0530
C:Réplicas	2.74074	2	1.37037	0.63	0.5405
Residuales	43.1852	20	2.15926		
Total de Corrección	72.7407	26			

Coeficiente de variación	19.7211%
--------------------------	----------

8. Altura por aplicación directa e imbibición condiciones de campo de *Leucaena leucocephala*

Tabla 15. Resultados análisis de la varianza de la altura por aplicación directa de *Leucaena leucocephala*.

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
A:PAP	0.0953852	2	0.0476926	0.63	0.5411
B:Dosis	0.534163	2	0.267081	3.55	0.080
C:Réplica	0.00227407	2	0.00113704	0.02	0.9850
Residuales	1.50585	20	0.0752926		
Total de Corrección	2.13767	26			

Coeficiente de variación	25.7206%
--------------------------	----------

Tabla 16. Resultados análisis de la varianza de la altura por imbibición de *Leucaena leucocephala*.

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
A:PAP	0.0512667	2	0.0256333	0.66	0.5291
B:Dosis	0.0144889	2	0.00724444	0.19	0.8319
C:Réplicas	0.117067	2	0.0585333	1.50	0.2470
Residuales	0.780044	20	0.0390022		
Total de Corrección	0.962867	26			

Coeficiente de variación	9.27176%
--------------------------	----------

9. Métodos convencionales de escarificación y extractos acuosos de *B. purpurascens* en la germinación en condiciones de campo de *Leucaena leucocephala*

Tabla 17. Resultados análisis de la varianza de métodos convencionales de escarificación y extractos acuosos de *B. purpurascens* en la germinación en campo de *Leucaena leucocephala*.

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
Entre los grupos	4.23148	3	1.41049	1.11	0.3579
Dentro de los grupos	40.5185	32	1.2662		
Total Total de Corrección	44.75	35			

Coeficiente de variación	19.665%
--------------------------	---------

10. Métodos convencionales de escarificación y extractos acuosos de *B. purpurascens* de la altura en condiciones de campo de de *Leucaena leucocephala*

Tabla 18. Resultados del análisis de la varianza de métodos convencionales de escarificación y extractos acuosos de *B. purpurascens* de la altura de *Leucaena leucocephala*.

<i>Grupos</i>	<i>Suma de los cuadrados</i>	<i>Grados de libertad Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón de Ficher</i>	<i>Valor de significación (p)</i>
Entre los grupos	0.551589	3	0.183863	2.42	0.0844
Dentro de los grupos	2.43373	32	0.0760542		
Total de Corrección	2.98532	35			
Coeficiente de variación			30.0226%		