



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE COMPONENTES DE LA PARED CELULAR DE LA
VAINA DE FRUTOS DE FRIJOL QUE PUEDEN CONTRIBUIR AL
DESARROLLO DE LA SEMILLA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

PEDRO CANO RENDÓN

DIRECTOR DE TESIS

J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
VOCAL: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
SECRETARIO: EUCLIDES AVILA CHÁVEZ
1er. SUPLENTE: MARÍA DEL CONSUELO PLATA RAMOS
2º SUPLENTE: ADRIANA BERENICE PÉREZ JIMÉNEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 102 DEL CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO GRACIAS AL FINANCIAMIENTO OTORGADO POR LA FACULTAD DE QUÍMICA CON EL PROGRAMA DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN Y AL POSGRADO (PAIP) 5000-9127 Y POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA)-UNAM AL PROYECTO IN 203017

ASESOR DEL TEMA:

DR. J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS

SUSTENTANTE:

PEDRO CANO RENDÓN

Índice

1	Resumen	1
2	Marco teórico	2
2.1	Importancia del frijol en México	2
2.2	Desarrollo de los frutos de frijol	2
2.3	La vaina de frijol	4
2.3.1	Características y función	4
2.3.2	Estructura y desarrollo de la vaina.....	6
2.3.3	El floema y el transporte desde la pared de la vaina	7
2.3.4	Descarga del floema en la vaina.....	7
2.4	Paredes celulares vegetales	9
2.4.1	Composición química de la pared celular primaria	10
2.5	Celulosa	11
2.5.1	La orientación de las fibrillas de celulosa	12
2.5.2	Movimiento activado por la humedad	13
2.6	Pectinas	14
2.6.1	Estructuras moleculares e interacciones de pectinas	14
2.6.2	La interacción de las pectinas con otros componentes de la pared celular	15
2.6.3	Las funciones celulares de las pectinas	18
2.7	Hemicelulosas.....	19
2.7.1	Hemicelulosas como compuestos de almacenamiento en semillas ..	21
2.8	El almacenamiento y la movilidad de los componentes de la pared celular	22
2.8.1	Movilidad	22
2.8.2	Compuestos estructurales de la pared celular y su movilidad	23
2.9	Expansinas y enzimas que remodelan las paredes celulares.....	24
3	Problema	25
4	Hipótesis.....	25
5	Objetivos.....	25
5.1	Objetivo general	25
5.2	Objetivos específicos	26

6	Metodología.....	27
6.1	Material biológico	27
6.2	Purificación de las paredes celulares (Stolle-Smits <i>et al.</i> , 1999).....	28
6.3	Determinación de celulosa método tomado y modificado de Updegraff (1969).....	29
6.3.1	Cuantificación de azúcares.....	29
6.4	Determinación de hemicelulosa (Vetten y Huber, 1990)	30
6.5	Determinación de ácido galacturónico (Zhu <i>et al.</i> , 2016)	30
6.6	Análisis estadístico.....	31
7	Resultados.....	32
7.1	Contenido de celulosa.....	37
7.2	Contenido de Ácido Galacturónico.....	39
7.3	Contenido de hemicelulosa	41
8	Análisis de resultados.....	45
9	Conclusiones	47
10	Bibliografía.....	48

Índice de figuras

Figura 1. Etapas de desarrollo de una planta de frijol.	3
Figura 2. Características de las etapas de desarrollo de las plantas de frijol.....	3
Figura 3. Cinética de crecimiento de vainas y semillas de frijol en la variedad Porrillo Sintético.....	4
Figura 4. Fruto de la planta de frijol y sus componentes	5
Figura 5. Esquema de la ruta de los azúcares en la carga del floema.....	8
Figura 6. Modelo de pared celular vegetal.....	11
Figura 7. Modelo esquemático de la deformación por tracción de un compuesto hipotético formado de fibrillas extremadamente rígidas (esencialmente no deformables) (gris) en una matriz blanda (blanco).....	13
Figura 8. Estructura de HG, RG-I Y RG-II y sus interacciones.	16
Figura 9. Representación esquemática de los tipos de hemicelulosas encontrados en las paredes celulares de las plantas.....	20
Figura 10. Movilidad de los componentes celulares.	23
Figura 11. Germinación de semillas.....	27
Figura 12. Crecimiento de las plantas.....	28
Figura 13. Características de los materiales analizados.	28
Figura 14. Cinética de crecimiento de los frutos de frijol genotipos OTI (A) y G-15 (B).....	32
Figura 15. Semillas y frutos de frijol de los genotipos OTI y G-15.....	34
Figura 16. Efecto de la falta de nutrimentos sobre los pesos secos de vainas y semillas de frutos del genotipo OTI.....	35
Figura 17. Efecto de la falta de nutrimentos sobre los pesos secos de vainas y semillas de frutos del genotipo G-15.....	36
Figura 18. Curva de calibración de glucosa para la determinación de celulosa.....	37
Figura 19. Contenido de celulosa en vainas de los genotipos OTI (A) y G-15 (B).	38
Figura 20. Curva de calibración para la determinación de pectinas.....	39
Figura 21. Contenido de ácido galacturónico en vainas de los genotipos OTI (A) y G-15 (B).....	40
Figura 22. Curva de calibración para la determinación de hemicelulosa.	41
Figura 23. Contenido de hemicelulosa en vainas de los genotipos OTI (A) y G-15 (B).	42
Figura 24. Composición relativa de celulosa, ácido galacturónico y hemicelulosa en las muestras analizadas.	43

Abreviaturas

dda: días después de antesis

Dha: ácido heptulopiranosilórico

DMSO: dimetilsulfóxido

Kdo: ácido 3-deoxi-mano-octulosónico

KOH: hidróxido de potasio

HG: homogalacturonano

NaBH₄: borohidruro de sodio

NaB₄O₇: tetraborato de sodio

RIA: residuo insoluble en alcohol

RG-1: ramnogalacturonano-I

RG-2: ramnogalacturonano-II

RMN: resonancia magnética nuclear

Análisis de componentes de la pared celular de la vaina de frutos de frijol que pueden contribuir al desarrollo de la semilla

1 Resumen

La vaina de frijol desempeña un papel importante durante el desarrollo de las semillas; a través de ella se distribuyen los productos de la actividad fotosintética de las hojas, al mismo tiempo que es una barrera efectiva que protege a las semillas de factores abióticos y bióticos.

La vaina es un órgano que presenta actividad fotosintética, que es capaz de almacenar compuestos de reserva como almidón, azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y proteínas. En estudios previos en los que frutos en una etapa inicial del desarrollo de la semilla se cortaron de la planta y se incubaron en oscuridad, se ha demostrado que en respuesta a la severa disminución en el flujo de los nutrimentos, las vainas pueden reducir hasta el 60% de su peso seco y generar recursos que contribuyen al desarrollo de las semillas. Se han identificado el almidón y los azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) como moléculas que las vainas remobilizan bajo esas condiciones.

En este trabajo se utilizó el mismo sistema experimental de cortar e incubar en oscuridad frutos de planta de frijol para investigar si componentes de las paredes celulares de las vainas son también movilizados hacia las semillas para que estas puedan continuar con su desarrollo bajo condiciones nutricionales extremas.

Los resultados de las mediciones de las cantidades de hemicelulosa, pectina y celulosa en muestras de paredes celulares de las vainas de dos genotipos (OTI y G-15) sugieren que bajo esas condiciones, la vaina no moviliza los materiales que forman sus paredes celulares, lo que da como resultado paredes celulares probablemente más resistentes.

2 Marco teórico

2.1 Importancia del frijol en México

El frijol es uno de los cultivos de mayor importancia en México, para muchos productores representa una fuente importante de ocupación e ingreso, y una garantía de seguridad alimentaria. El frijol se cultiva en todas las regiones del país, entre las que destaca la región del Altiplano del Centro-Norte con clima templado-semiárido, que comprende los estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí y Guanajuato, donde en el ciclo primavera- verano se siembra 68% de la superficie nacional que se dedica a este cultivo (Herrera *et al.*, 2012).

El frijol pertenece a la familia *Fabaceae*, subfamilia *Papilionoideae*, tribu *Phaseolae*, y especie *Phaseolus vulgaris* L. Por su alto contenido proteico (20-25%) es, entre las leguminosas, el tercer cultivo más importante en el mundo, después de la soya y el cacahuete (Lara, 2015). Como la mayoría de las leguminosas, sus proteínas son deficientes en aminoácidos azufrados como la metionina y la cisteína; sin embargo, una ingesta regular de frijol favorece la disminución de los niveles de colesterol y reduce los riesgos de padecer cáncer (Anderson y Gustafson, 1988). En el caso particular de México, el consumo de frijol representa el 36% de la ingesta diaria de proteínas.

2.2 Desarrollo de los frutos de frijol

El desarrollo de la planta de frijol comprende de manera general dos fases sucesivas: la vegetativa y la reproductiva. La etapa vegetativa se inicia en el momento en que la semilla dispone de condiciones favorables para germinar, y termina cuando aparecen los primeros botones florales; en esta fase se forma la mayor parte de la estructura vegetativa que la planta necesita para iniciar su reproducción (Fernández de C. *et al.*, 1986).

La etapa reproductiva se inicia con la aparición de los primeros botones o racimos florales y termina cuando el grano alcanza el grado de madurez necesario para la cosecha; a pesar de ser esta fase eminentemente reproductiva, durante ella las variedades indeterminadas (Tipos II, III y IV) continúan, aunque con menor intensidad, produciendo estructuras vegetativas (Fernández de C. *et al.*, 1986). En

la Figura 1, además de las fases ya mencionadas, se identifican 10 etapas de desarrollo cuya duración puede variar dependiendo del genotipo y de las condiciones de cultivo, mientras que en la Figura 2 se hace una breve descripción de cada una de ellas.

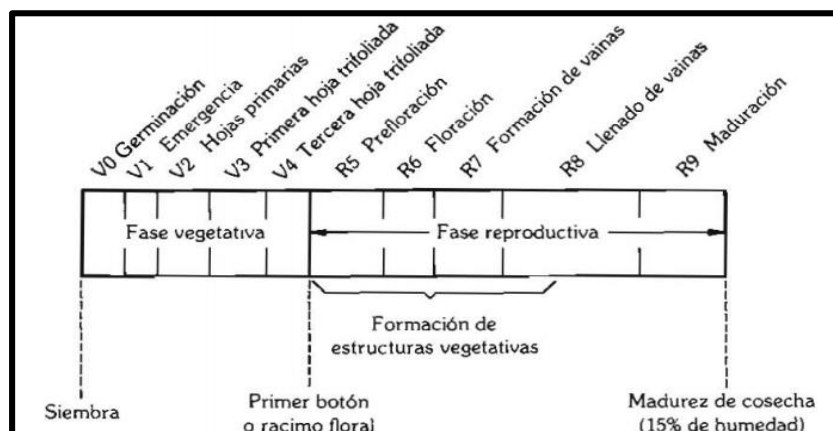


Figura 1. Etapas de desarrollo de una planta de frijol. Se identifican 10 etapas cuya duración puede cambiar por las condiciones de cultivo (Fernández de C. *et al.*, 1986).

Fase	Etapa		Evento con que se inicia cada etapa
	Código	Nombre	
Reproductiva	V0	Germinación	La semilla está en condiciones favorables para iniciar la germinación
	V1	Emergencia	Los cotiledones del 50% de las plantas aparecen al nivel del suelo
	V2	Hojas primarias	Las hojas primarias del 50% de las plantas están desplegadas
	V3	Primera hoja trifoliada	La primera hoja trifoliada del 50% de las plantas está desplegada
	V4	Tercera hoja trifoliada	La tercera hoja trifoliada del 50% de las plantas está desplegada
	R5	Prefloración	Los primeros botones o racimos han aparecido en el 50% de las plantas
	R6	Floración	Se ha abierto la primera flor en el 50% de las plantas
	R7	Formación de las vainas	Al marchitarse la corola, en el 50% de las plantas aparece por lo menos una vaina
	R8	Llenado de las vainas	Llenado de semillas en la primera vaina en el 50% de las plantas
	R9	Maduración	Cambio de color en por lo menos una vaina en el 50% de las plantas (del verde al amarillo uniforme o pigmentado)

Figura 2. Características de las etapas de desarrollo de las plantas de frijol. (Fernández de C. *et al.*, 1986).

En la Figura 3 se observa que el desarrollo de las vainas y de las semillas es asincrónico: la vaina alcanza su longitud máxima alrededor de los 15 días después de la floración y poco después inicia el crecimiento de las semillas.

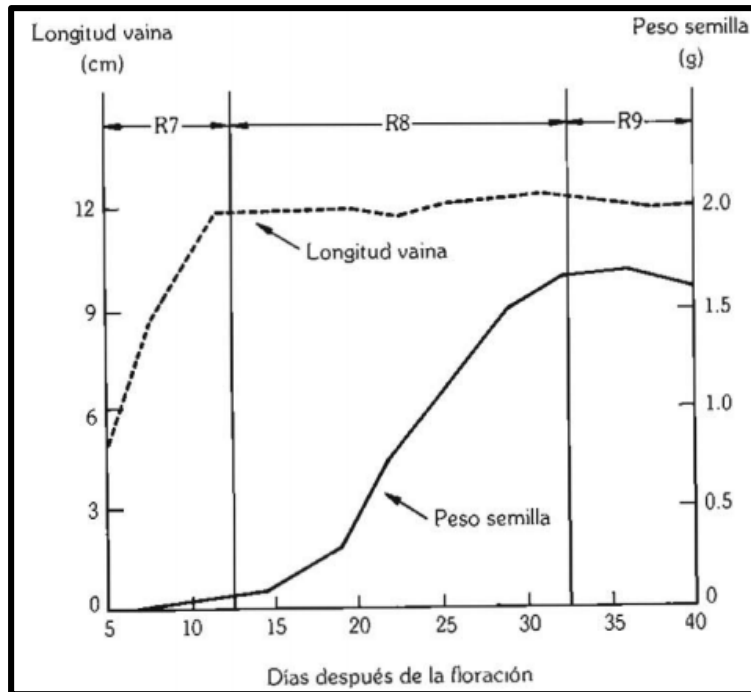


Figura 3. Cinética de crecimiento de vainas y semillas de frijol en la variedad Porrillo Sintético (Fernández de C. et al., 1986).

2.3 La vaina de frijol

2.3.1 Características y función

El fruto de frijol es una vaina con dos valvas, las cuales provienen del ovario comprimido. Esta es una característica que distingue a las leguminosas, aunque entre variedades puede haber muchas diferencias en tamaños y colores. Las valvas están unidas por 2 suturas, la dorsal, también llamada placentar y la ventral (Figura 4). Los óvulos, que son las futuras semillas, se alternan en la sutura placentar.

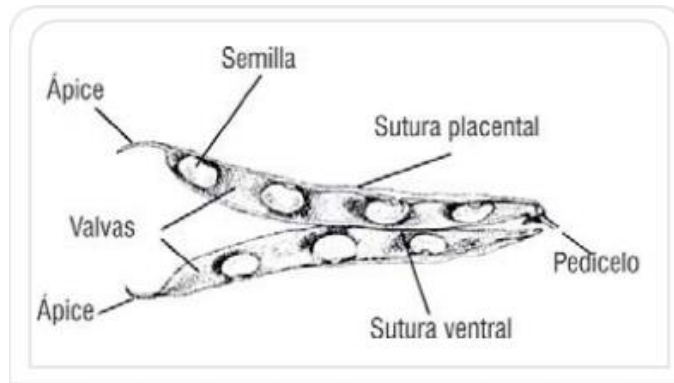


Figura 4. Fruto de la planta de frijol y sus componentes (Arias *et al.*, 2007).

Una vaina, es un órgano fotosintéticamente activo que una vez que la maduración de la semilla se completa, las valvas se separan longitudinalmente y liberan su contenido. Las vainas juegan un papel primordial en la supervivencia de una especie (Bennett *et al.*, 2011). No está claro si los fotoasimilados generados durante la fotosíntesis de la pared de vaina pueden ser reasignados a otras vainas. Tal mecanismo podría ser valioso, pues las vainas de la parte superior del dosel reciben una mayor cantidad de luz incidente y su actividad fotosintética es superior.

Se ha establecido que a partir de la anthesis la vaina se convierte en un órgano capaz de almacenar compuestos ricos en nitrógeno (N) y carbono (C). Parte de ellos son almacenados temporalmente y después removilizados a las semillas (Bennett *et al.*, 2011); por ejemplo, se estima que el 20% del N acumulado en las semillas de guisante proviene de material removilizado de la pared de vaina (Schiltz *et al.*, 2005).

Este reciclaje de nutrientes es esencial para la producción de semillas y supone la capacidad del floema para mantenerse funcional durante la senescencia (Feller y Fischer, 1994). A medida que el desarrollo avanza, hay un aumento en los compuestos exportados desde la pared de la vaina hacia las semillas, lo cual podría deberse en alguna medida a la actividad de sacarosa sintasa (SUS) en la pared de la vaina y el funículo, cuya presencia podría facilitar la carga del floema y descarga de solutos (Schjoerring *et al.*, 1995; Schiltz *et al.*, 2005, Fallahi *et al.*, 2008).

Los cambios en la anatomía de la vaina y en las concentraciones de clorofila durante la maduración de la vaina correlacionan con alteraciones en patrones de de

transcripción (Wagstaff *et al.*, 2009). De hecho, existe una fuerte asociación entre el desarrollo de la vaina y el tamaño de la semilla (Pechan y Morgan, 1985), y se ha sugerido de que la longitud de la vaina podría ser utilizado como un indicador del rendimiento del cultivo (Diepenbrock, 2000).

Recientes análisis de los perfiles de transcripción han proporcionado evidencia que apoyan la afirmación de que la pared de la vaina es en realidad una hoja modificada (Ma *et al.*, 2005; Scutt *et al.*, 2006; Wagstaff *et al.*, 2009), cuya actividad fotosintética puede generar hasta el 60% de los recursos que necesitan las semillas en desarrollo (Diepenbrock, 2000).

2.3.2 Estructura y desarrollo de la vaina

En pericarpio de las vainas se identifican tres capas celulares funcionales: exocarpio, mesocarpio y endocarpio. El exocarpio comprende una capa epidérmica unicelular que está poblada con estomas que facilitan el intercambio gaseoso, mientras que en el mesocarpio se encuentran capas de células de clorénquima que son ricas en cloroplastos (Sessions y Zambryski, 1995). Finalmente, el endocarpio consiste en dos capas celulares diferentes, la más externa formada por grandes células de paredes delgadas, mientras que la más interna está constituida de células pequeñas y compactas como resultado de varias divisiones anticlinales (Spence *et al.*, 1996). Las paredes de la vaina no son completamente uniformes y contienen una zona estrecha de dehiscencia (ZD), aproximadamente dos capas celulares de ancho, abarca la longitud de la vaina entre la válvula y el replum (Ferrándiz *et al.*, 1999; Ferrándiz, 2002). Tal diferenciación del pericarpio es necesaria para marcar la degradación celular de la laminilla media entre las células de la ZD, que permitirá que la vaina rompa y libere las semillas maduras (Meakin y Roberts, 1990).

2.3.3 El floema y el transporte desde la pared de la vaina

Los azúcares que se producen en las hojas durante la fotosíntesis, son cargados en el floema para su transporte a los órganos no fotosintéticos de la planta. Este sistema, a diferencia del xilema, que está especializado en el transporte de agua y cuyo flujo a lo largo del continuo tierra-planta-aire es impulsado por el gradiente que crea la transpiración (van Bel, 2003).

Además de agua, este sistema puede transportar a larga distancia una gran variedad de moléculas dentro de las que se encuentran carbohidratos (monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos de galactosa, alcoholes de azúcar), aminoácidos y minerales (van Bel, 2003), fitohormonas, RNAs pequeños, RNAs mensajeros y proteínas (Lucas *et al.*, 2013). Este tejido es también capaz de transmitir potenciales de acción de forma longitudinal a través de sus células (Furch *et al.*, 2007)

Se ha sugerido que la manipulación de la repartición de recursos entre semillas y vainas podría ayudar a maximizar el rendimiento de los cultivos (Wardlaw, 1990).

2.3.4 Descarga del floema en la vaina

Las semillas están bien adaptadas para la absorción de fotoasimilados translocados desde la pared de la vaina. En *Medicago truncatula*, la región micropilar de la cubierta de la semilla, una pequeña abertura en la epidermis externa del óvulo ubicado en un extremo de la semilla, contiene un sistema vascular por donde entran los nutrientes (Abirached-Darmency *et al.*, 2005).

Si bien hay una comprensión integral de cómo los recursos se transportan a través del xilema y el floema a la unión de la vaina, pasos posteriores del mecanismo de la transferencia del pecíolo de la vaina al funículo de la semilla todavía están poco definidos. La noción actual es que el transporte ocurre a través de la vía simplástica usando plasmodesmos y que es impulsado por difusión simple y/o flujo masivo (Benette *et al.*, 2011), como una consecuencia de las diferencias en la presión de la turgencia entre los órganos fuente y receptor (Patrick, 1997).

Sin embargo, los solutos deben translocarse posteriormente a través de una vía apoplástica selectivamente permeable y cuya presencia para conectar el tejido materno (vaina) y el floema ayudaría a prevenir pérdida de nutrimentos. Es probable que la vía apoplástica opere en paralelo a la vía simplástica que conecta al floema con los tejidos maternos (Figura 5). Los detalles exactos de los mecanismos que participan en el transporte de recursos a las semillas todavía están bajo revisión, (Patrick y Offler, 2001; Lalonde *et al.*, 2003).

Sin embargo, se propone que la concentración de productos de almacenamiento dentro de las semillas ayuda a regular la eficiencia con la que se transportan los recursos alrededor de la planta (Schulze *et al.*, 1994). Las vainas al actuar como órganos de demanda y reducir las concentraciones de sacarosa en el apoplasto (Patrick, 1997), contribuyen a extraer recursos de tejidos del entorno.

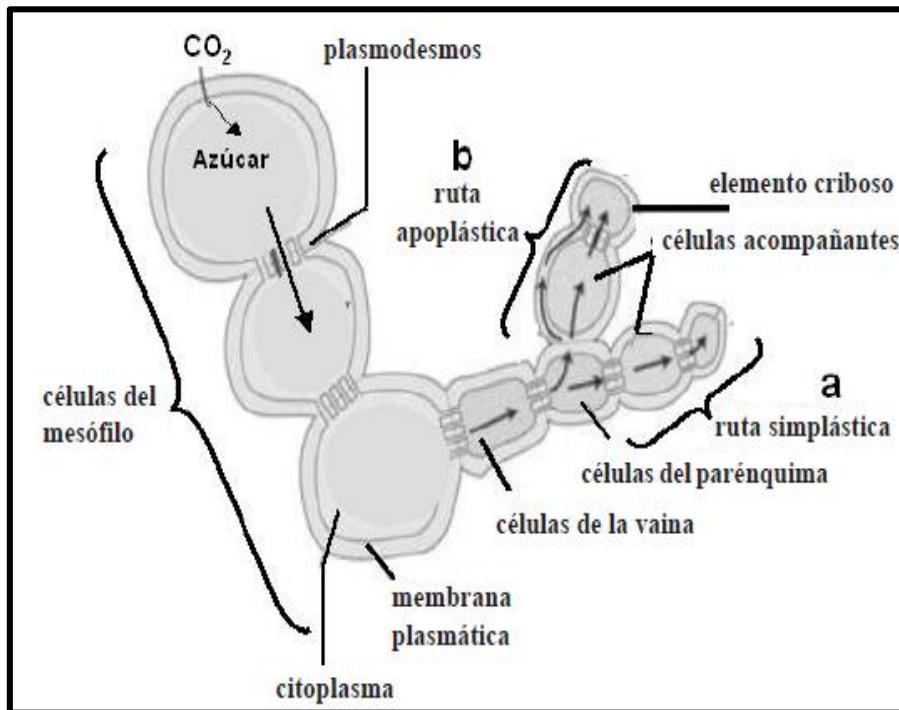


Figura 5. Esquema de la ruta de los azúcares en la carga del floema. Participación de las vías simplástica (a) y apoplástica (b) (Tomado de Chacón y Martínez, 2007).

2.4 Paredes celulares vegetales

La función de proteger a las semillas en desarrollo depende en gran medida de las características de las paredes celulares de la vaina; en ese sentido es de suma importancia conocer las características de sus principales componentes y si estas cambian durante el desarrollo de las semillas de frijol o como una respuesta a condiciones ambientales que no son las óptimas.

Las paredes celulares primarias son plásticas y pueden acomodarse a las necesidades de la expansión celular, son clave para definir la forma y el tamaño de las células. En contraste, las paredes secundarias, se depositan después de que la expansión celular ha cesado y tienen una composición química muy distinta (Franková y Fry, 2013).

Las paredes celulares primarias de las plantas constituyen un compartimento extraprotoplasmático flexible y metabólicamente activo; controlan la expansión celular variando su extensibilidad. Esta capacidad de cambiar biofísicamente depende de reacciones bioquímicas y reordenamientos moleculares que ocurren dentro de las paredes (*in muro*); cuya composición y estructura cambian continuamente durante el desarrollo de la planta (Stolle-Smits *et al.*, 1999; Franková y Fry, 2013)

Los polisacáridos constituyentes de las paredes celulares de las plantas son sintetizados, principalmente dentro del aparato de Golgi, excepto la celulosa y la calosa que se producen en la membrana plasmática. Después de la síntesis en el cuerpo de Golgi, los polisacáridos se transportan en vesículas a la membrana plasmática para ser depositados por exocitosis en la cara interna de la pared existente. *In muro*, los polisacáridos pueden sufrir modificaciones que son fisiológicamente relevantes, dentro de las que se incluyen transglicosilación (“corte y pegado” de moléculas), reticulación e hidrólisis (Franková y Fry, 2013).

2.4.1 Composición química de la pared celular primaria

En las plantas terrestres, los polisacáridos que constituyen la mayor parte de la masa seca de esta pared pueden agruparse en tres clases amplias: celulosa, hemicelulosas y pectinas. En paredes primarias de dicotiledóneas estas tres clases se encuentran en proporciones muy similares. La celulosa forma microfibrillas parcialmente cristalinas (entre las cuales hay moléculas de agua), constituye el esqueleto de la pared. Las hemicelulosas están unidas fuertemente por enlaces de hidrógeno a la celulosa y parte de ellas puede quedar atrapada dentro de las microfibrillas de celulosa. Junto con las pectinas, las hemicelulosas constituyen una matriz hidratada que ocupa el espacio entre microfibrillas (Scheller y Ulvskov, 2010; Albersheim *et al.*, 2011; Fry, 2011).

El desarrollo de la planta implica una serie coordinada de procesos bioquímicos que, entre otras cosas, resultan en biosíntesis y degradación de componentes de la pared celular. Durante la expansión celular, actividades enzimáticas escinden los polímeros no celulósicos y la presión osmótica de la célula empuja los componentes fibrilares aparte. Nuevas microfibrillas y asociaciones de polímeros se depositan posteriormente en la superficie más interna de la pared, formando una gran estratificación y matriz reticulada (Carpita y Gibeaut, 1993). La Figura 6 presenta un modelo de la pared celular primaria.

La estructura de la pared celular garantiza el desarrollo de funciones que podrían parecer opuestas. Por un lado es responsable de la resistencia a la tensión, de dar forma a la célula y protegerla contra agentes patógenos; al tiempo que debe mantener una flexibilidad razonable contra las fuerzas de rompimiento y un grado mínimo de permeabilidad para que las moléculas señalizantes puedan entrar a la célula (Levy *et al.*, 2002).

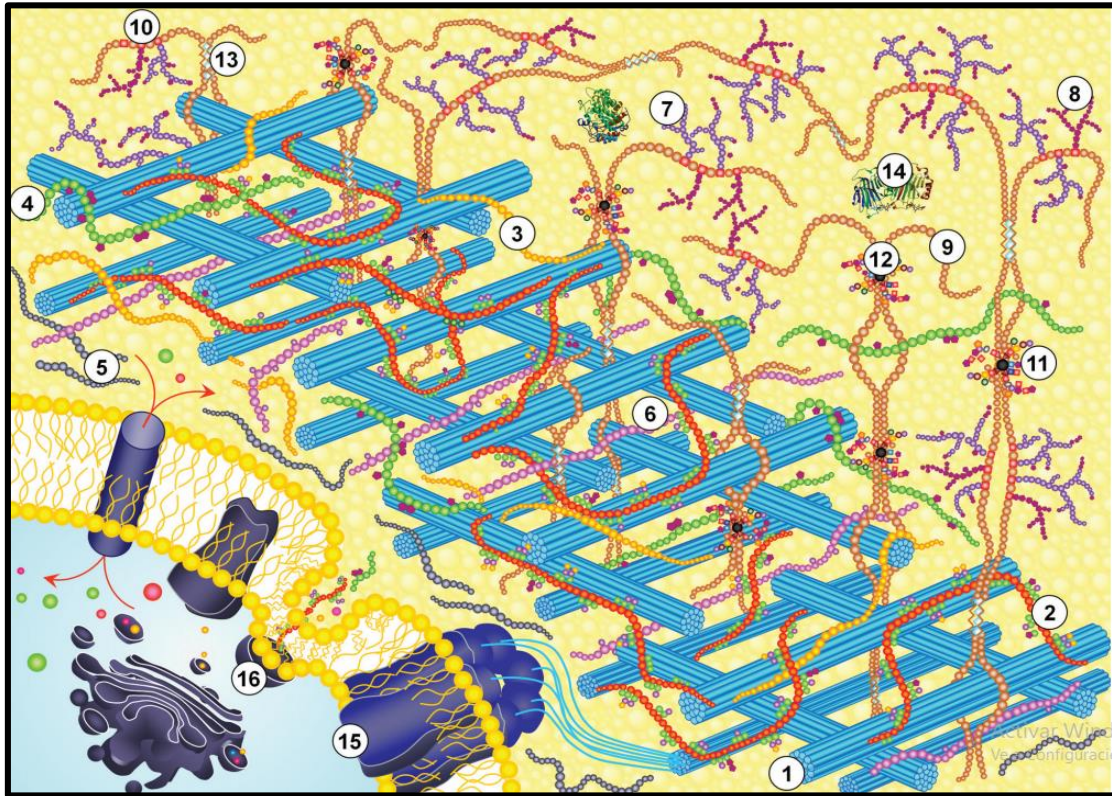


Figura 6. Modelo de pared celular vegetal: 1, microfibrillas de celulosa; 2-6, hemicelulosas: 2, xiloglucano; 3, glucano de enlace mixto; 4, xilano y heteroxilanos relacionados; 5, calosa; 6, manano y heteromanos relacionados; 7-11, Pectinas: 7, galactano; 8, arabinano; 9, homogalacturonano; 10, ramnogalacturonano I; 11, ramnogalacturonano II; 12, puente de boro; 13, 'caja de huevos' con puentes de calcio; 14-16, componentes no polisacáridos: 14, enzimas y proteínas estructurales; 15, complejo de celulosa sintasa; 16, vesículas de transporte. Tomado de Franková y Fry, (2013).

2.5 Celulosa

Está compuesta por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos β -1,4, que se estructuran en filamentos no ramificados (Levy *et al.*, 2002), los cuales son sintetizados por un complejo enzimático llamado celulosa sintasa (Brown y Saxena 2000). Durante su síntesis los filamentos de celulosa se ordenan en microfibrillas con un diámetro de 5 a 15 nm, las cuales pueden contener desde 36 hasta más de 1200 filamentos de celulosa (Levy *et al.*, 2002). La configuración del enlace β glucosídico facilita que la celulosa forme cadenas largas y lineales unidas

entre sí mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, lo que les da una estructura cristalina y organizada en donde hay regiones resistentes a la hidrólisis (Pérez *et al.*, 2002).

Las interacciones entre microfibrillas de celulosa y las moléculas de la matriz (particularmente hemicelulosas, pectina, y lignina), son de importancia crucial para el funcionamiento de la pared celular. La principal función de las fibrillas de celulosa es estructural; no obstante su orientación puede coordinar movimientos de sus órganos; así como la dispersión de sus semillas; como será visto a continuación (Burgert y Fratzl, 2009).

2.5.1 La orientación de las fibrillas de celulosa

Las plantas pueden adaptar sus propiedades materiales y la geometría de sus órganos durante el desarrollo (Niklas 1992). Los patrones de crecimiento adaptativo dependen principalmente de la formación de la pared celular vegetal. Debido a las fuertes diferencias en la rigidez entre las macromoléculas que forman la pared celular, su orientación dicta una amplia gama de propiedades de células individuales, tejidos y órganos (Burgert y Fratzl, 2009).

La orientación de las fibrillas de celulosa proporciona un cierto grado de anisotropía de la pared celular y contribuye a determinar la forma final de la célula (Baskin, 2005). Mientras que la orientación de fibrillas de celulosa que se depositan en células que han alcanzado su forma y tamaño final, se refleja en las propiedades mecánicas de los órganos (Burgert y Fratzl, 2009).

La pared celular primaria puede tener un espesor de solo 0.1 μm , pero es lo suficientemente resistente como para soportar las altas tensiones derivadas de la presión hidrostática y cargas externas (Cleland, 1971; Taiz, 1984). Al mismo tiempo, es fácilmente modificable para permitir la ampliación de la superficie, la cual durante el crecimiento de las células puede incrementarse hasta en 100 veces (Veytsman y Cosgrove, 1998).

En términos generales, las fibrillas de celulosa se depositan perpendicularmente al eje del crecimiento inicial (Fry-Wyssling 1953), pues esa orientación facilita la expansión de la pared (Baskin, 2005). Esto se muestra esquemáticamente en la Figura 7.

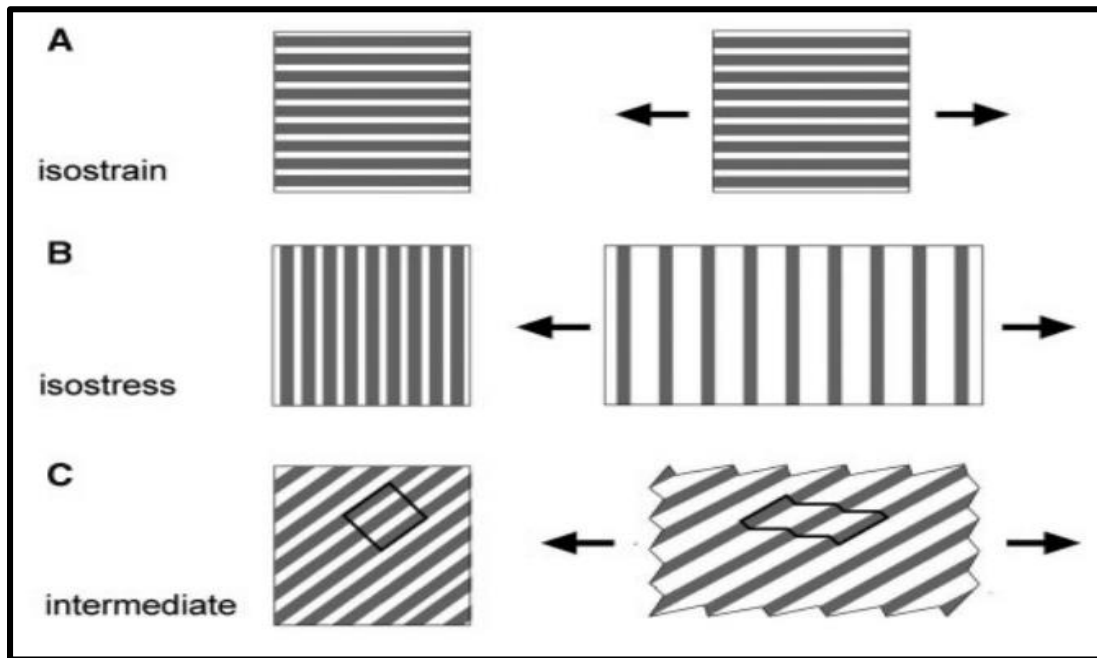


Figura 7. Modelo esquemático de la deformación por tracción de un compuesto hipotético formado de fibrillas extremadamente rígidas (esencialmente no deformables) (gris) en una matriz blanda (blanco). (A) Cuando las fibrillas y la matriz se someten a la misma tensión tanto las fibrillas como la matriz están tensas por igual, lo que significa que no es posible una extensión, (B) fibrillas y matriz se tensan por igual y la extensión se debe al estiramiento de la matriz blanda. (C) Caso intermedio: la deformación se produce por estiramiento de la matriz; la rigidez del compuesto depende del ángulo de las fibrillas con respecto a la dirección de estiramiento. El compuesto en el caso intermedio es mucho más rígido que el del caso (B) y su rigidez real depende de la orientación de las fibrillas con respecto a la dirección de estiramiento. Tomada de Burgert y Fratzl, (2009).

2.5.2 Movimiento activado por la humedad

El contenido de humedad permite el movimiento de las fibrillas de celulosa. Sin embargo, esta propiedad es dependiente del alineamiento de las fibrillas de celulosa en capas de tejido posteriores. La deformación anisotrópica de la pared de la célula

debida a la entrada y salida de agua, es consecuencia de la incapacidad de las fibrillas de celulosa para hincharse en su dirección axial. Como resultado, tras la captación de agua se produce una hinchazón preferentemente en la dirección perpendicular a las fibrillas que deforma la pared celular. La presencia de paredes celulares donde las fibrillas de celulosa tienen diferentes orientaciones facilita movimientos complejos a nivel de órgano (Burgert y Fratzl, 2009).

Este principio es ampliamente utilizado por una gran variedad de especies para controlar la dispersión de semillas, y esporas de algunos musgos (Ingold, 1959; Haupt, 1977).

2.6 Pectinas

Las pectinas forman una matriz similar a un gel y sus características influyen en la adhesión celular y porosidad de la pared. Las características de las pectinas están espacial y temporalmente reguladas, sugiriendo una participación importante en la adquisición de las propiedades de la pared celular que demanda el desarrollo de la planta (Saffer, 2018).

2.6.1 Estructuras moleculares e interacciones de pectinas

Las pectinas son una clase compleja de polisacáridos dentro de los que se incluyen homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano-I (RG-I) y ramnogalacturonano-II (RG-II). Todas las pectinas contienen ácido galacturónico, con estructuras muy diferentes. En varias de ellas la columna vertebral de ácido galacturónico está decorada con diferentes cadenas laterales. Las paredes celulares tienen pequeñas cantidades en donde la columna de HG está decorada con residuos de xilosa (xilogalacturonano) (Zandleven *et al.*, 2007), cuya función no se ha establecido. El RG-II es un HG complejo altamente sustituido, con al menos doce monosacáridos distintos presentes en hasta seis cadenas laterales (Pabst *et al.*, 2013; Ndeh *et al.*, 2017). El RG-I también contiene ácido galacturónico, pero es estructuralmente distinto de HG y RG-II. En este caso, la cadena principal consiste en una repetición del disacárido (1,2)- α -L-ramnosa-(1,4)-D-ácido galacturónico;

muchos de los residuos de ramnosa se encuentran sustituidos con cadenas laterales de azúcares neutros como arabinosa y galactosa, o con arabinogalactanos (Atmodjo *et al.*, 2013). En ocasiones también la fucosa se incluye entre los sustituyentes (Saffer, 2018, Figura 8A).

El HG es típicamente la pectina más abundante, seguida por RG-I y luego RG-II; sin embargo, RG-I es la pectina con mayor heterogeneidad estructural, cuya abundancia y composición de las cadenas laterales varía considerablemente entre tipos celulares, etapas de desarrollo y especies (Verhertbruggen *et al.*, 2009).

La organización precisa de los dominios de pectina en la pared no está del todo clara, pero una mezcla de interacciones covalentes y no covalentes combina las pectinas en una matriz reticulada. Las pectinas están posiblemente unidas covalentemente entre sus cadenas principales, y es probable que se requiera de actividades enzimáticas para separar los dominios HG y RG-I (Nakamura *et al.*, 2002) (Figure 8B).

RG-II se dimeriza formando enlaces cruzados de borato-diéster, lo cual es importante para su función (O'Neill, 2001). El calcio también puede promover interacciones no covalentes entre grupos carboxilo de moléculas HG desmetilesterificadas ("caja de huevos"), la cual también promueve la formación de un gel que está presente en paredes celulares *in vivo* (Saffer, 2018).

2.6.2 La interacción de las pectinas con otros componentes de la pared celular

Los estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) no detectaron interacciones sustanciales entre celulosa y xiloglucanos, pero identificaron interacciones extensas entre celulosa y pectinas (Bootten *et al.*, 2004). Probablemente se encuentren a una distancia menor que un nanómetro, lo que facilita que la mitad de la celulosa esté en contacto con las pectinas.

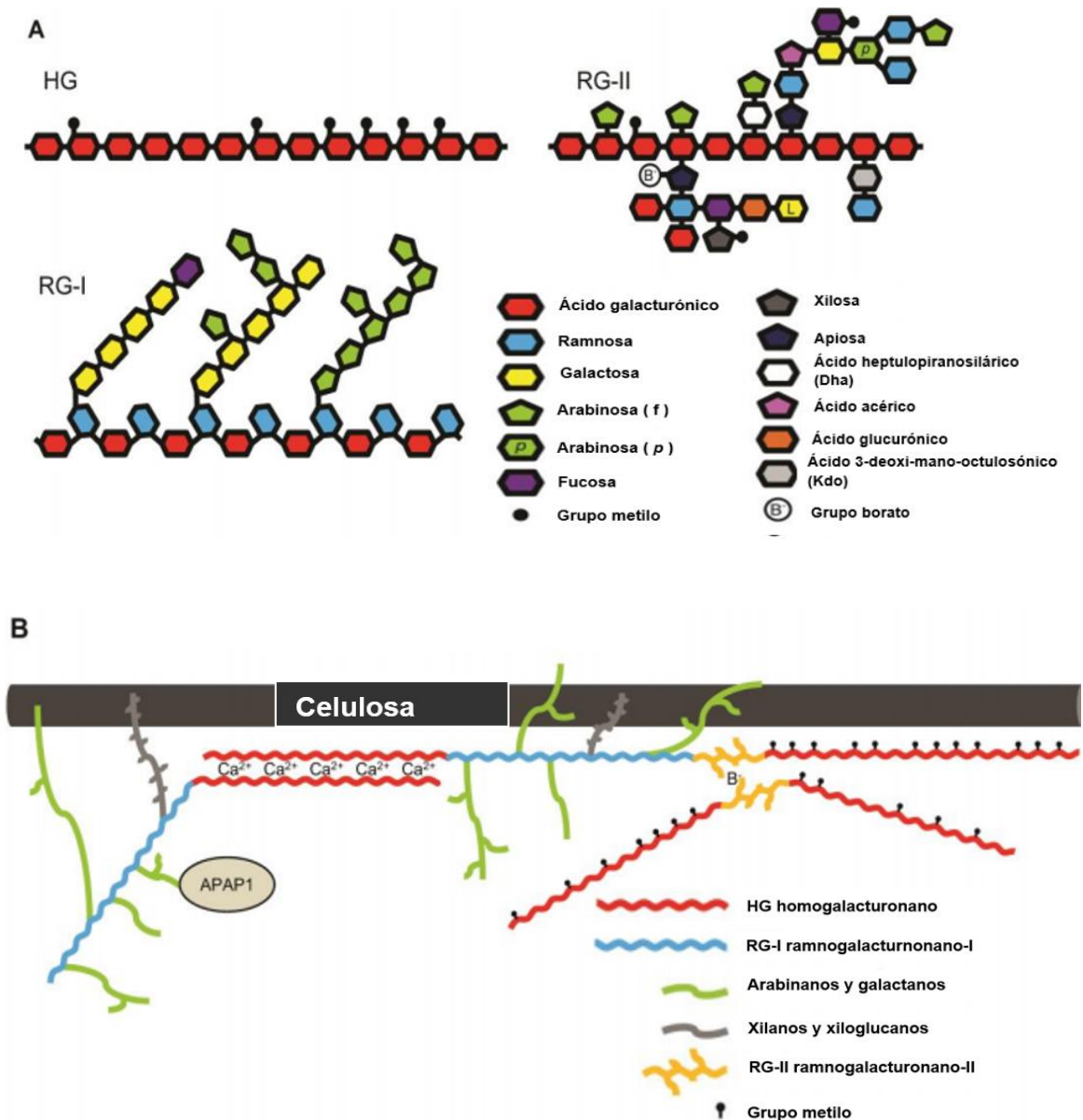


Figura 8. Estructura de HG, RG-I Y RG-II y sus interacciones. (A); HG es un polímero de ácido galacturónico que puede ser modificado por metilesterificación; RG-I tiene una cadena principal de ácido galacturónico y ramnosa, y varias cadenas laterales ricas en arabinosa y galactosa. RG-II es un HG complejo sustituido con seis cadenas laterales que incluyen al menos 12 monosacáridos diferentes y forma un dímero mediado por borato (B^-). La arabinosa en la pared celular puede estar en forma de furanosa (f) o de piranosa (p). La mayoría de la galactosa en la pared celular es D-galactosa, pero RG-II también contiene un solo residuo L-galactosa. **(B);** los dominios de pectina están unidos covalentemente a través de sus cadenas principales. La dimerización de RG-II mediada por borato y las interacciones mediadas por calcio entre moléculas de HG desmetilesterificadas promueven la reticulación. RG-I tiene arabinano y galactano

y posiblemente algunas cadenas laterales de xilano y xiloglucano que pueden interactuar con la celulosa, y las cadenas principales de pectina también pueden estar en estrecha asociación con la celulosa. Muchas moléculas de RG-I podrían estar conectadas a la proteína de arabinogalactano APAP1. Tomado de Saffer, (2018).

El HG no une celulosa *in vitro*, pero las pectinas que son ricas en cadenas laterales neutras de arabinano y galactano si lo hacen, aunque no tan fuertemente como xiloglucano (Saffer, 2018).

La pared celular está densamente llena de polisacáridos, y tanto el atrapamiento de polisacáridos de la matriz en microfibrillas de celulosa nacientes y las restricciones de espacio físico podrían afectar las interacciones celulosa-pectina.

La existencia de interacciones pectina-celulosa plantea la posibilidad de que las pectinas puedan modificar la dinámica de las microfibrillas de celulosa durante la síntesis de celulosa y la expansión celular. La extracción de las pectinas de paredes celulares de apio provocó un aumento en el tamaño de las microfibrillas de celulosa, implicando a las pectinas en la prevención de la agregación de las microfibrillas de celulosa (Thimm *et al.*, 2009). Estas interacciones también podrían facilitar la incorporación de celulosa recién sintetizada en la pared.

Las mutantes de *Arabidopsis* que afectan la dimerización de RG-II o la síntesis de xiloglucano resultan en hipocótilos cuyas paredes celulares tienen menor rigidez y resistencia a la tracción (Ryden *et al.*, 2003; Cavalier *et al.*, 2008; Abasolo *et al.*, 2009), lo que de alguna manera confirma que tanto las pectinas como los xiloglucanos contribuyen a las propiedades mecánicas de la pared celular.

Las relaciones compensatorias que se observan entre las pectinas y el xiloglucano respaldan la propuesta de que algunas de sus funciones son redundantes. Las plántulas etioladas que carecen de xiloglucanos tienen una disminución sustancial en la fracción de residuos de ramnosa sustituida con una cadena lateral (Cavalier *et al.*, 2008), lo que supone que, la remodelación de la estructura de RG-I compensa los efectos de la ausencia de xiloglucanos. Curiosamente, una mutante anormal con xiloglucano empobrecido en galactosa tiene un efecto mucho más severo sobre el

crecimiento que la ausencia total de xiloglucanos (Kong *et al.*, 2015), revelando así que los cambios compensatorios no son desencadenados por xiloglucanos disfuncionales. Del mismo modo, en plantas con HG de bajo peso molecular anormal, los xiloglucanos se vuelven más rígidos (Phyo *et al.*, 2017).

2.6.3 Las funciones celulares de las pectinas

La metilesterificación de HG es clave para determinar las propiedades de la pared celular. La mayoría de HG es sintetizado en una forma metilesterificada, y luego puede ser des-metilesterificado por las acciones de enzimas pectin metilesterasa (Wolf *et al.*, 2009).

El HG es generalmente importante para promover el crecimiento y la expansión celular. Mutantes de *Arabidopsis* que afectan la síntesis de HG son pequeñas y su capacidad de alargamiento también es reducida (Saffer, 2018). El tamaño de HG también está asociado con la expansión celular, la sobreexpresión de poligalacturonasa produce moléculas de HG más pequeñas y aumenta la expansión celular, mientras que los mutantes de poligalacturonasa tienen moléculas de HG más grandes y una disminución en la expansión celular (Xiao *et al.*, 2014; Rui *et al.* 2017).

Muchos polisacáridos de la pared celular también se modifican por acetilación. Tanto HG como RG-I a menudo están acetilados en sus residuos de ácido galacturónico. La sobreexpresión en el tabaco de una pectin acetilesterasa que elimina los grupos acetilo de las pectinas resulta en una disminución de la elongación celular en órganos florales y otros defectos del desarrollo (Gou *et al.*, 2012; Saffer, 2018).

La reticulación RG-II tiene un papel central en el fortalecimiento de la pared celular y mutantes deficientes en fucosa tienen defectos en la estructura y dimerización de RG-II que se traducen en inflorescencias y tallos frágiles, al igual que una disminución de la fuerza y rigidez de los hipocótilos.

Los mutantes con cambios drásticos en la estructura RG-II pueden ser inviables, quizás como resultado del crecimiento defectuoso del tubo polínico, en cuya elongación se requiere RG-II (Saffer, 2018).

2.7 Hemicelulosas

Son polímeros complejos de heteropolisacáridos, formados principalmente por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa), usualmente acetiladas, que forman cadenas ramificadas; a las que se unen moléculas de ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, generalmente por enlaces glucosídicos β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3 (Pérez *et al.*, 2002).

En contraste con la celulosa, la hemicelulosa posee ramificaciones laterales cortas formadas de distintos azúcares que la hacen menos recalcitrante. Por su composición se clasifica en xilanos, xiloglucanos, mananos, glucomananos y glucanos unidos por enlaces β -1,3 o β -1,4. El xilano es el componente más abundante en la hemicelulosa (constituye con más del 70% de esta fracción) y está formado por moléculas de D-xilosa unidas por enlaces β -1,4. Puede tener diversas sustituciones, y originar los arabinoxilanos (si contiene arabinosa) como los presentes en los pastos; o los glucuronoxilanos y glucuronoarabinoxilanos (si contiene residuos glucosa y glucosa-arabinosa, respectivamente). Además de la xilosa, los xilanos pueden contener ácido glucurónico o 4-O-metil éter-ácido glucurónico, ácido acético, ferúlico o ácidos p-coumáricos. La composición y frecuencia de las ramificaciones dependen del origen de la hemicelulosa (Martínez *et al.*, 2005; Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011). La Figura 9 presenta las estructuras de las principales hemicelulosas encontradas en paredes celulares de plantas.

Las hemicelulosas son polisacáridos multifuncionales, además de su papel estructural, también pueden reciclarse y usarse como reservas de carbono en momentos de suministro reducido de carbono por fotosíntesis, o retraerse del tejido maduro antes de la abscisión (por ejemplo, de

hojas de especies caducifolias). El grado en que las hemicelulosas constituyen fuentes internas de carbono de la planta depende del tipo de tejido y de su composición química (Hoch, 2007).

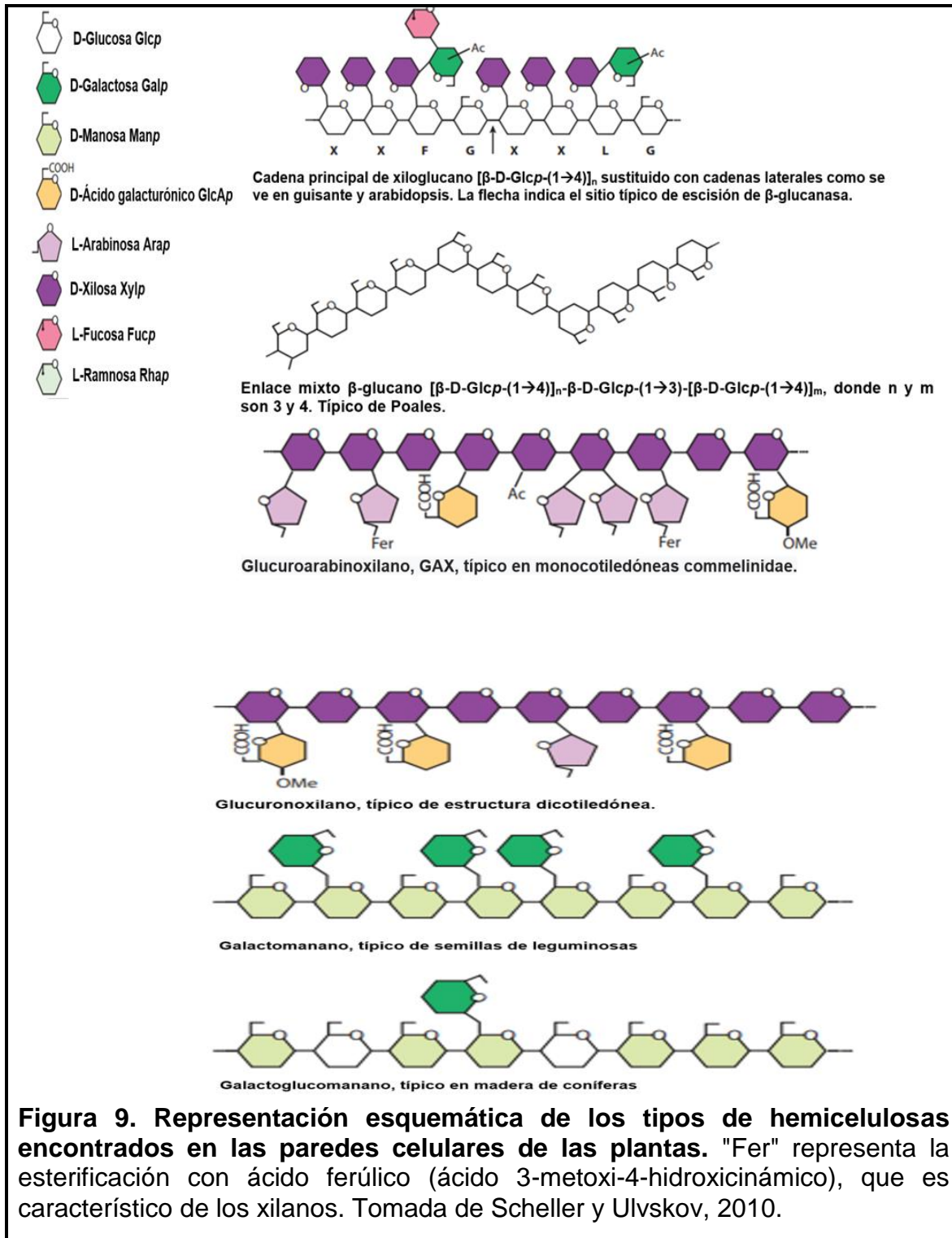


Figura 9. Representación esquemática de los tipos de hemicelulosas encontrados en las paredes celulares de las plantas. "Fer" representa la esterificación con ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico), que es característico de los xilanos. Tomada de Scheller y Ulvskov, 2010.

2.7.1 Hemicelulosas como compuestos de almacenamiento en semillas

Las hemicelulosas también han sido reclutadas para el almacenamiento de hidratos de carbono de semillas y en algunos casos su importancia es comparable a la del almidón. Sin embargo hay grandes diferencias, el xiloglucano es abundante en semillas de capuchina y tamarindo; los galactomananos son importantes en semillas de plantas de interés económico, por ejemplo, coco, guar y algarrobo. Son especialmente abundantes en el endospermo de las leguminosas y en semillas de otras especies. También están presentes en la planta konjak (*Amorphophallus konjac*); en la cual el órgano de almacenamiento es un corno y no la semilla. Por su parte, los arabinoxilanos están presentes en semillas de dicotiledóneas como el lino y el psilio, así como en el endospermo de cereales (Scheller y Ulvskov, 2010).

Los polisacáridos de las paredes celulares de semillas pueden ser usados durante la germinación. Ese tipo de polisacáridos también en las paredes celulares de los tejidos no reproductivos cuyas paredes celulares pueden estar engrosadas como consecuencia de la acumulación de hemicelulosa.

Las hemicelulosas (especialmente galactomananos hidrofílicos y ricos en galactosa) también pueden almacenar agua y prevenir la desecación de semillas que están germinando (Reid y Bewley, 1979).

Los xiloglucanos también desempeñan un papel como fuente de moléculas señalizadoras. Se ha observado que los productos de su degradación (oligosacarinas) contrarrestan la expansión celular inducida por auxinas. Es notable que la concentración óptima para la actividad inhibitoria sea tan baja como 1 nM (Scheller y Ulvskop, 2010).

2.8 El almacenamiento y la movilidad de los componentes de la pared celular

Las plantas almacenan materiales que pueden movilizarse para apoyar el crecimiento u otras funciones de la planta. En el caso particular de los acumulados en las paredes celulares, su reciclaje les otorga una función fisiológica distinta a la original.

2.8.1 Movilidad

El término "movilidad" se usa para describir la facilidad con la que un compuesto puede ser degradado y los recursos obtenidos son usados para la síntesis de nuevas moléculas en otros órganos o para la respiración. Por lo tanto, los compuestos móviles son reservas de carbono que se utilizan cuando la demanda interna de carbono es mayor a lo que la actividad fotosintética puede aportar (Chapin *et al.*, 1990).

El almidón es un compuesto ampliamente usado para el almacenamiento de carbono. Es un polímero de glucosa [unida por enlaces α (1 \rightarrow 6) y α - (1 \rightarrow 4)] cuya síntesis y degradación son rápidas y económicas, por lo resulta ideal para el almacenamiento de carbono a corto y mediano plazo. Algunas plantas superiores también almacenan en sus vacuolas cantidades importantes de fructanos (Meier y Reid, 1981). Muchas especies vegetales acumulan altas concentraciones de lípidos neutros (triacilgliceroles) en semillas y en tejidos no reproductivos (Kozlowski y Pallardy 1997). Sin embargo, su síntesis y movilización es mucho más costosa que la del almidón y son usados para el almacenamiento de carbono a largo plazo (Hoch y Körner, 2003).

Compuestos de bajo peso molecular como los azúcares libres (mono-, di- y oligosacáridos), alcoholes y ácidos orgánicos cuya función original puede ser la regulación osmótica, también pueden reciclarse y promover el crecimiento de las plantas (Hoch, 2007).

2.8.2 Compuestos estructurales de la pared celular y su movilidad

Por mucho tiempo los componentes de la pared celular se consideraron "compuestos estructurales" y, por lo tanto exentos del proceso de movilización (Luo *et al.*, 2006). Sin embargo, se han descrito actividades enzimáticas que pueden modificar los polisacáridos de las paredes celulares. Gracias a ello, los polisacáridos de la pared celular también pueden ser movilizados durante períodos de mayor demanda de carbono. La Figura 10, presenta el grado de movilidad de los componentes estructurales de las paredes celulares.

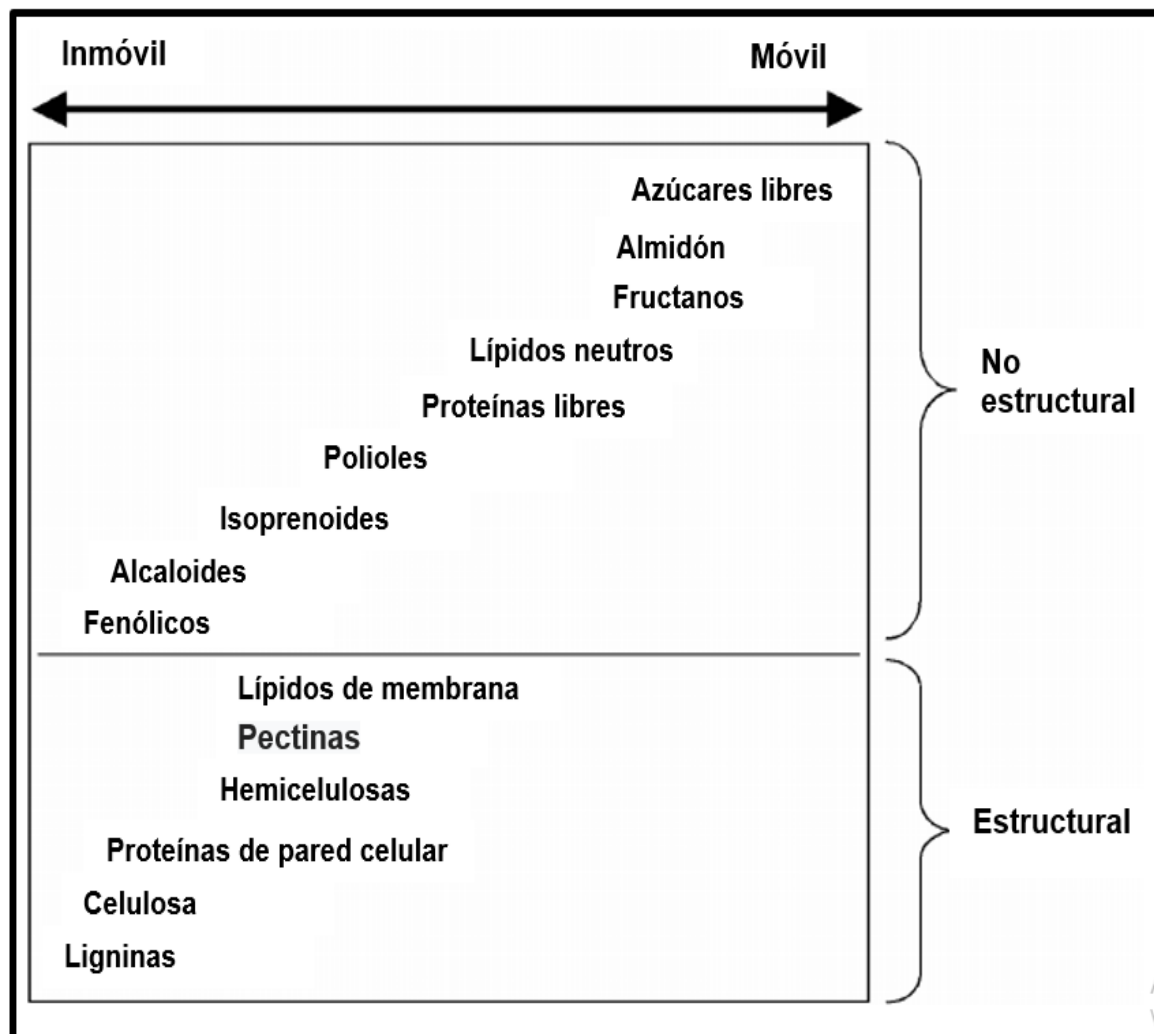


Figura 10. Movilidad de los componentes celulares. Tomada de Hoch, 2007.

2.9 Expansinas y enzimas que remodelan las paredes celulares

Las expansinas son proteínas que están involucradas en la remodelación de la pared celular vegetal. Ellas inducen la extensibilidad y el relajamiento de las paredes celulares. Están presentes en monocotiledóneas (arroz, maíz), dicotiledóneas (*Arabidopsis*), helechos y musgos. No tienen actividad hidrolítica (glucosidasa), por lo que es probable que rompan enlaces no covalentes (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011). De hecho, se ha sugerido que actúan sobre los puentes de hidrógeno que se encuentran entre los filamentos de celulosa o entre la celulosa y otros polisacáridos (xiloglucanos), mediante un mecanismo no enzimático (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011).

Además de las expansinas, otras enzimas también participan en la remodelación de las paredes celulares. Las actividades enzimáticas que "cortan y pegan" enlaces glicosídicos (transglicanasas, por ejemplo, endotransglucosilasa de xiloglucano) pueden crear nuevos enlaces entre polisacáridos, reclutar los recién secretados y contribuir al ensamblaje de paredes. Las hetero-transglicanasas al transferir parte de un polisacárido a otro, son también muy importantes para el ensamblaje de la pared (Franková y Fry, 2013)

Una enzima que cataliza la hidrólisis de poli y / u oligosacáridos se clasifican en exo y endo-glicosil hidrolasa se denominan "glicosidasas" y "glucanasas", respectivamente. Ejemplos de glicosidasas son α -xilosidasas; mientras que las celulasas son ejemplos de glucanasas. Además, las pectin metilesterasas, pectin acetilesterasas y las hemicelulasas también tienen un papel muy importante en la remodelación de la pared celular (Franková y Fry, 2010).

3 Problema

El frijol es uno de los cultivos de mayor importancia en México. Se cultiva en todo el país; la escasa disponibilidad de humedad y de nutrimentos son las principales limitantes para su producción. Esta situación se agudiza en los estados de Zacatecas, Durango, San Luis Potosí y Chihuahua, donde la precipitación fluctúa entre 400 y 450 mm anuales (Herrera et al., 2012). Ante la imposibilidad para dotar a esas regiones de infraestructura de riego, es necesario buscar estrategias para mejorar la producción de semillas cuando las condiciones ambientales no son las óptimas. En una cumbre mundial organizada por la ONU en 2008 para buscar alternativas de solución a la crisis alimentaria, se estimó que para satisfacer las demandas del crecimiento poblacional, en 2030 será necesario aumentar la producción de alimentos en 50%. Los efectos negativos del cambio climático introducen presiones adicionales, y optimizar el rendimiento de los cultivos es una tarea de primordial importancia. Los análisis del crecimiento y desarrollo de la vaina, así como la evaluación de su contribución a la formación de semillas bajo condiciones adversas pueden contribuir al logro de esos objetivos (Bennett *et al.*, 2011)

4 Hipótesis

Si los frutos de frijol son sometidos a un estrés que restringe el suministro de nutrimentos (p. ej. cortar los frutos de la planta), entonces componentes acumulados en las paredes celulares de las vainas serán reciclados y se convertirán en fuente de nutrimentos para el crecimiento de algunas semillas.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar si componentes acumulados en paredes celulares (celulosa, hemicelulosa y pectina) de vainas de los frutos de frijol, son reciclados y usados en el desarrollo de las semillas cuando los frutos se cortan de la planta y se someten a una fuerte restricción de nutrimentos.

5.2 Objetivos específicos

- Estandarizar un método para la determinación de celulosa, ácido galacturónico y hemicelulosa en los frutos de frijol.
- Determinar si el estrés nutricional induce cambios en los componentes de las paredes celulares de las vainas de frutos que son removidos de la planta.
- Analizar la capacidad de 2 genotipos de frijol para reciclar componentes de la pared celular de la vaina de los frutos, cuando se presenta una restricción severa en la disponibilidad de nutrimentos.

6 Metodología

6.1 Material biológico

Se sembraron al menos 25 semillas de los genotipos G-15 y OTI (Figura 11); las cuales se lavaron secuencialmente con etanol, cloro y agua desionizada. Posteriormente se pusieron a germinar sobre papel húmedo durante 72 h; pasado ese tiempo, las semillas germinadas se plantaron en macetas que contenían 3 L de agrolita. Las plantas se colocaron en un invernadero con iluminación natural y temperaturas promedio durante el día de 20-25°C y 15-18°C por la noche. Las plantas se regaron alternadamente con agua y solución nutritiva (Miracle-Gro®).

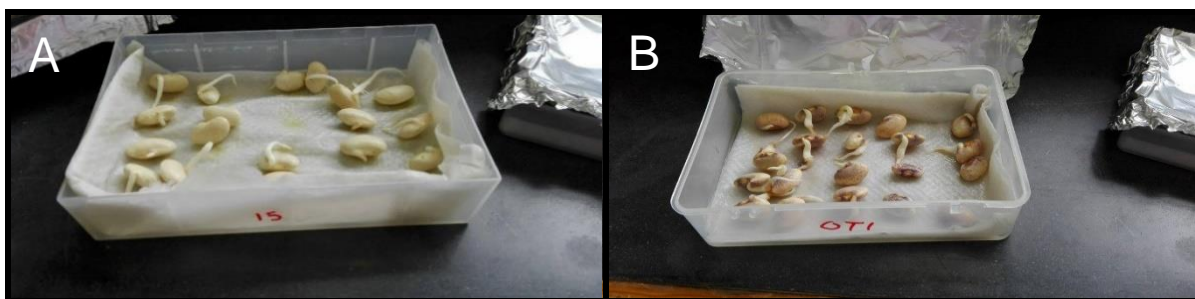


Figura 11. Germinación de semillas. Genotipos G-15 (A) y OTI (B).

Para establecer la edad de los frutos, las flores se etiquetaron el día en que aparecieron totalmente expuestas (Antesis, Figura 12).

Las plantas tardaron aproximadamente 7 semanas para llegar al punto en que los frutos pudieran ser usados. Se seleccionaron frutos de 20 DDA (días después de antesis), momento en el cual ha concluido el crecimiento de la vaina y comienza el desarrollo de las semillas. Un grupo de frutos se pusieron a secar inmediatamente después de que fueron cortados y otros se incubaron en oscuridad por 20 días. Estos materiales se compararon con aquellos que cumplieron su desarrollo en la planta. La Figura 13 presenta las características de las muestras analizadas.



Figura 12. Crecimiento de las plantas. Las semillas germinadas fueron sembradas en macetas rellenas de agrolita (A y B). Las flores se etiquetaron al momento de la antesis (C y D) y se llevó un registro de los frutos que se desarrollaron.

Tratamientos	Genotipo OTI	Genotipo G-15
1	Vainas secas de frutos de 20 dda	
2	Vainas que cumplieron su desarrollo en la planta	
3	Vainas de frutos cortados de la planta a los 20 dda e incubadas en oscuridad aproximadamente 20 días	

Figura 13. Características de los materiales analizados.

6.2 Purificación de las paredes celulares (Stolle-Smits *et al.*, 1999)

Un gramo de tejido de vaina seco se molió en un mortero con 30 mL etanol al 96% v/v. El extracto se colocó en tubos Falcón de 50 mL y se dejó sedimentar. El sobrenadante se eliminó con una pipeta Pasteur. Posteriormente, el material se suspendió en 30 mL de etanol al 80% v/v y se agitó durante 1 hora. Nuevamente el material se dejó sedimentar y el sobrenadante se desechó. Posteriormente el material se lavó dos veces más con 30 mL de acetona 100% v/v hasta que la

muestra quedo incolora y se dejó secar por una noche. El material obtenido se conoce como residuo insoluble en alcohol (RIA). Para eliminar el almidón, el RIA se suspendió en 30 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) al 90% v/v a 30°C durante 16 h. Posteriormente, la suspensión se centrifugó (7,000 g durante 15 min) y el sedimento se lavó dos veces con 90% (v/v) DMSO y tres veces con etanol al 80% (v/v). El sobrenadante, que contenía predominantemente almidón, se descartó.

El material purificado se utilizó para realizar las determinaciones de celulosa, hemicelulosa y ácido galacturónico.

6.3 Determinación de celulosa, método tomado y modificado de Updegraff (1969)

Se pesaron aproximadamente 10 mg de paredes celulares. Para eliminar lignina y hemicelulosa el material se hidrolizó agregando 1 mL de reactivo ácido nítrico: ácido acético (preparado mezclando 90 mL de ácido acético al 80% v/v y 10 mL de ácido nítrico concentrado) y mezclando bien en un vortex. Después de mezclar, la muestra se calentó a 100°C durante 30 minutos. Cuando el material se enfrió, se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 1 mL de agua desionizada; y el sobrenadante se eliminó después de centrifugar. Finalmente la pastilla se resuspendió en 1 mL de ácido sulfúrico al 67%, y se incubó 1 h a temperatura ambiente. El contenido de celulosa se determinó con el método de fenol-ácido sulfúrico cuantificando los azúcares liberados.

6.3.1 Cuantificación de azúcares

Para la cuantificación de azúcares por método de fenol-ácidosulfúrico se siguieron las indicaciones propuestas por Updegraff (1969) adecuando las cantidades usadas a nuestros experimentos: 1 mL del reactivo (preparado mezclando 10 µL de fenol por cada mL de ácido sulfúrico concentrado) se mezcló con 50 µL de muestra y se calentó a 93°C durante 20 minutos; transcurrido el tiempo, el producto de la reacción se leyó a 490 nm frente a un blanco de reactivos. Para cada muestra se realizaron

cuatro determinaciones. Usando este método se realizaron curvas de calibración en las que se observó una respuesta lineal en un rango de 0 a 0.54 mg de glucosa.

6.4 Determinación de hemicelulosa (Vetten y Huber, 1990)

Se pesaron aproximadamente 10 mg de paredes celulares y se agregó 1 mL de una disolución KOH 4 M que contiene 158 mM de NABH₄. Después de mezclar se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación constante. Posteriormente se neutralizó con ácido acético glacial; utilizando papeles indicadores para seguir los cambios de pH. Finalmente, el contenido de hemicelulosa se determinó a partir de la cuantificación de glucosa por el método de fenol-ácido sulfúrico descrito anteriormente.

6.5 Determinación de ácido galacturónico (Zhu *et al.*, 2016)

El método usado se basó en indicaciones previamente reportadas por Zhu *et al.*, (2016). Para ello se pesaron 10 mg de paredes celulares; se agregó 1 mL de agua y después de mezclar, se calentó a 100°C durante 1 hora; posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante que contiene a las pectinas, se recuperó en tubos de ensayo de 16x100; este procedimiento se realizó 2 veces más y los sobrenadantes se juntaron.

Posteriormente se tomaron 200 µL de la solución de pectinas que se mezclaron con 1 mL de H₂SO₄ al 98% el cual contenía NaB₄O₇ 0.0125 M y se incubó a 100 °C por 5 minutos e inmediatamente después las muestras se colocaron en hielo. Cuando las muestras se enfriaron, se agregaron 20 µL de 3-fenilfenol para intensificar el color y después de mezclar se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. El contenido de pectinas se cuantificó midiendo la absorbancia a 520 nm y usando ácido galacturónico como referencia. Se hicieron curvas de calibración usando ácido galacturónico en un intervalo de 0 a 0.03 mg.

6.6 Análisis estadístico

Para establecer si los contenidos de celulosa, ácido galacturónico y hemicelulosa se ven afectados por el genotipo, las condiciones de desarrollo o la interacción de ambas, se realizó un análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo con ayuda de Excel.

Para determinar entre qué pares de medias existía diferencia significativa se hizo un prueba de comparación de pares de medias 'a posteriori'. Para ello se determinó la diferencia mínima significativa y una prueba t-student; se consideró como significativa una $p \leq 0.05$ (Montgomery, 2016).

7 Resultados

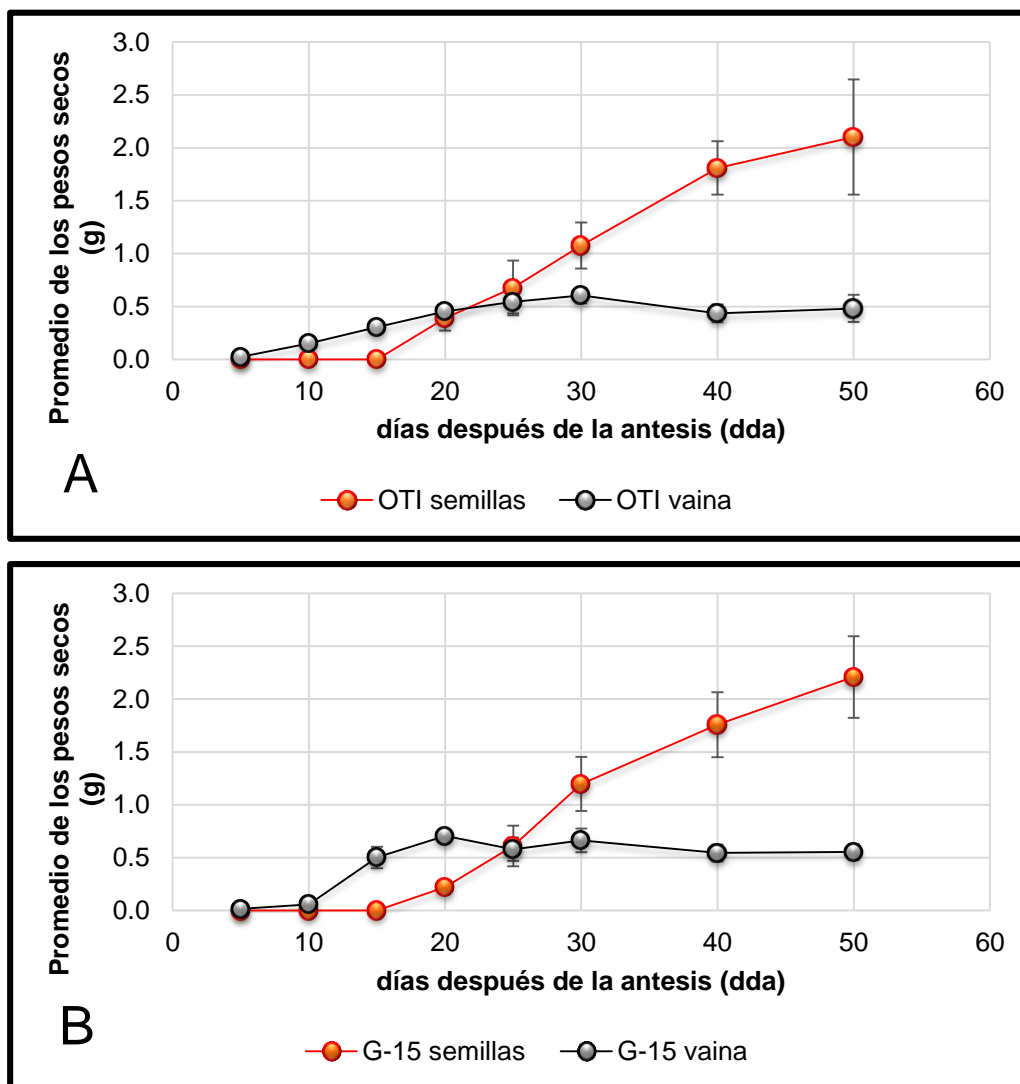


Figura 14. Cinética de crecimiento de los frutos de frijol genotipos OTI (A) y G-15 (B). En ambos genotipos se observa que a partir de los 20 dda la vaina ha alcanzado un desarrollo adecuado para comenzar con el llenado de las semillas. Los puntos corresponden a promedios de al menos 9 mediciones \pm DE. Las desviaciones en el peso seco de la vaina son muy pequeñas en ambos genotipos.

En una primera etapa se analizó la cinética de crecimiento de las vainas y semillas en condiciones normales (Figuras 14 A y B); se observa que el peso seco promedio de la vaina tiene una ganancia lineal durante los primeros veinte dda, al término de

los cuales alcanza un desarrollo óptimo y cuenta con los recursos necesarios para comenzar el llenado de las semillas.

El llenado de las semillas comienza después de los 15 dda y su ganancia en peso continúa durante todo el periodo de desarrollo. En términos generales los 2 genotipos analizados se comportaron de manera muy similar. Estos resultados sugieren que en condiciones normales las semillas obtienen los recursos metabólicos necesarios de la planta y no de la vaina. Por otro lado, los 20 dda son una edad crucial en el desarrollo de los frutos; la vaina prácticamente culmina su desarrollo y comienza el de la semilla.

Una vez que se estableció que 20 dda es una edad adecuada para investigar si materiales acumulados en las paredes celulares de los frutos podrían ser reciclados y contribuir al desarrollo de las semillas, se cortaron frutos de 20 dda de un nuevo ciclo. Una parte se puso a secar, mientras que otros fueron incubados en oscuridad a temperatura ambiente esto con el fin de determinar si continuaba el desarrollo de las semillas aún cuando los frutos fueron cortados. Los resultados de ambos tratamientos se compararon con los de frutos que completaron su ciclo de manera normal.

En la Figura 15 A y B se presenta el efecto de la falta de nutrimentos sobre el desarrollo de la semilla; para ambos genotipos se presentan características similares de las semillas de los distintos tratamientos; las semillas de frutos que cumplieron su desarrollo en la planta presentaron las mejores; mayor tamaño y peso, un color brillante y con buena nitidez, mientras que la de los frutos que se cortaron a los 20 dda y su desarrollo fue interrumpido presentaron las peores; semillas sin el color característico de la especie, inviables y de menor tamaño y peso; lo interesante fue que las vainas que fueron cortadas a los 20 dda e incubadas en oscuridad presentaron buenos frutos. A diferencia de las semillas del primer grupo éstas eran de menor tamaño y peso, tenían un color opaco y una menor nitidez sin embargo éstas semillas eran también viables.

Éstos resultados sugieren que en los frutos cortados e incubados en oscuridad la vaina podría tener un papel más allá que el de ser una barrera protectora, su composición es rica en polímeros que podrían proveer una fuente de nutrientes para el desarrollo de la semillas; no obstante éstos recursos estarían limitados a cierto número de semillas; en la Figura 15 C y D se observa que no todas las semillas se desarrollan, solamente de 1-3 semillas/fruto pudieron crecer exitosamente, esto ocurre en ambos genotipos; de alguna manera el fruto distribuye los recursos sólo a algunas y la posición de la semilla en el fruto no determina las probabilidades de éxito.



Figura 15. Semillas y frutos de frijol de los genotipos OTI y G-15. El panel **A** corresponde a semillas del genotipo OTI y **B** corresponde a semillas del genotipo G-15; en ambos casos **a**, son semillas de frutos que cumplieron su desarrollo en la planta; **b**, semillas que se desarrollaron en frutos que fueron removidos a los 20 dda y que fueron incubados en oscuridad; **c**, semillas en las que su desarrollo se interrumpió. Los paneles **C** y **D** presentan los frutos de OTI y G-15 respectivamente que fueron incubados en oscuridad, se observa que no todas las semillas se desarrollaron.

En la figuras 16 y 17 se muestran los efectos de la falta de nutrimentos sobre los pesos secos promedio de vainas y semillas en frutos de plantas de los genotipos OTI y G-15, respectivamente.

En el caso de OTI (Figura 16) el peso seco de las vainas sufre pocos cambios en el periodo que va de los 20 dda hasta la culminación de su desarrollo en la planta. En ese mismo periodo el peso de las semillas se incrementa notablemente. En los frutos que fueron removidos de la planta a los 20 dda e incubados en oscuridad se aprecia un aumento importante en el peso de las semillas el cual coincide con una reducción importante en el peso seco de la vaina; esto sugiere que los recursos con los que se desarrolla la semilla bajo una severa restricción de nutrimentos provienen de la vaina y de una manera muy importante ya que su peso seco promedio disminuye hasta en un 50% en comparación con frutos con un desarrollo normal.

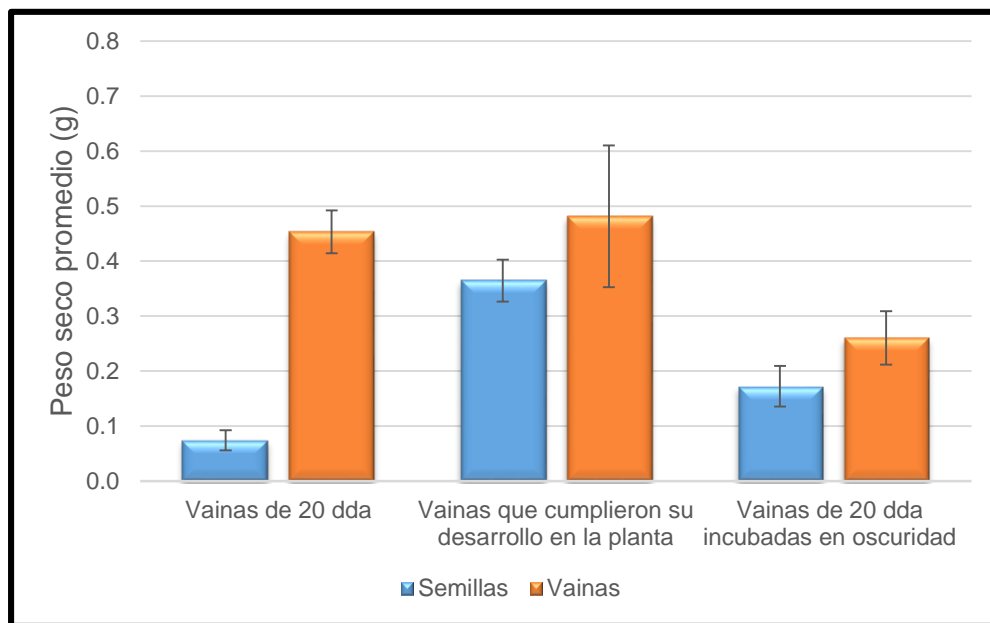


Figura 16. Efecto de la falta de nutrimentos sobre los pesos secos de vainas y semillas de frutos del genotipo OTI. Pesos secos promedio de vainas y semillas en el cual se observa que los frutos removidos a los 20 dda e incubados en oscuridad presentan una disminución en el peso de las vainas el cual coincide con una ganancia en peso de sus semillas. No hay mucha diferencia entre los pesos secos promedio de vainas de 20 dda y vainas que culminaron su desarrollo; los puntos corresponden a promedios de 19 mediciones \pm DE.

El comportamiento del genotipo G-15 fue similar (figura 17); sin embargo se aprecia que en condiciones normales parte del material acumulado en las vainas de 20 dda podría ser usado en el desarrollo de las semillas. En los frutos que fueron removidos e incubados en oscuridad el peso seco de la vaina también se reduce drásticamente. En comparación con el genotipo OTI, G-15 tiene vainas y semillas con un peso seco promedio mayor, lo que sugiere que este genotipo tenga una mayor habilidad de captar y distribuir recursos en una condición extrema.

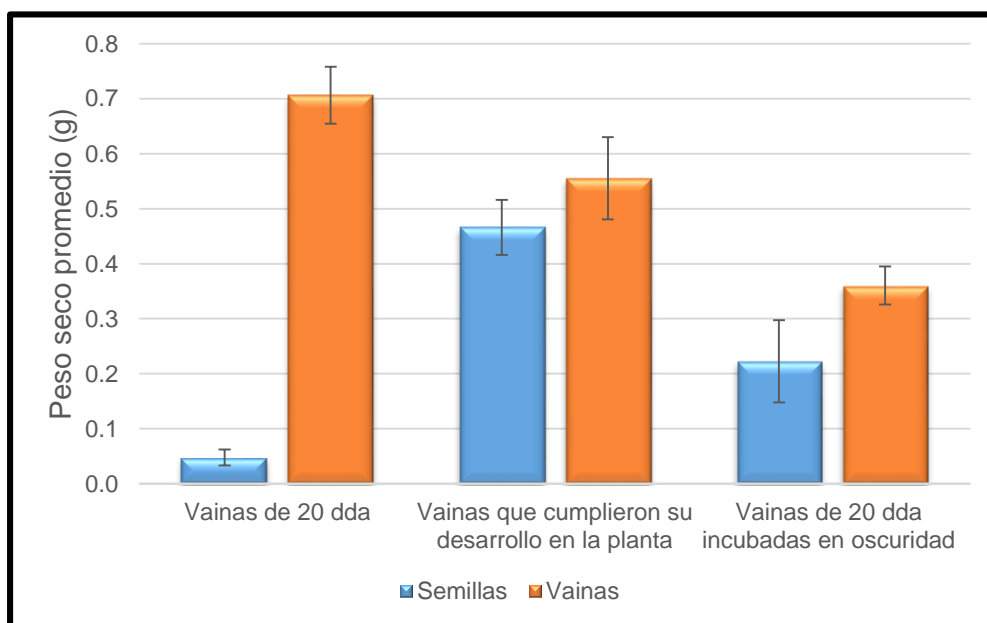


Figura 17. Efecto de la falta de nutrimentos sobre los pesos secos de vainas y semillas de frutos del genotipo G-15. El peso seco de las vainas alcanza su valor máximo a los 20 dda; se observa que los frutos que se removieron a los 20 dda e incubados en oscuridad presentan una disminución en el peso de las vainas el cual coincide con una ganancia en peso de sus semillas. Los puntos corresponden a promedios de 9 mediciones \pm DE.

Con base en los resultados de la figura 16 y 17 podemos sugerir que la disminución en peso seco de la vaina en los frutos que se incubaron en oscuridad corresponde a un reciclaje de los componentes de la pared celular de la vaina y así contribuir en el desarrollo de la semilla.

Con el fin de establecer si en las vainas de los frutos que fueron removidos hay componentes de las paredes celulares que fueran reciclados para favorecer el

desarrollo de las semillas, se purificaron paredes celulares y se hicieron determinaciones de sus principales componentes celulosa, pectina como ácido galacturónico y hemicelulosas.

7.1 Contenido de celulosa

La determinación de celulosa se basó en la cuantificación de glucosa. En la figura 18 se presenta un ejemplo de una curva de calibración que tuvo un comportamiento lineal en un rango de 0 a 0.6 mg de glucosa.

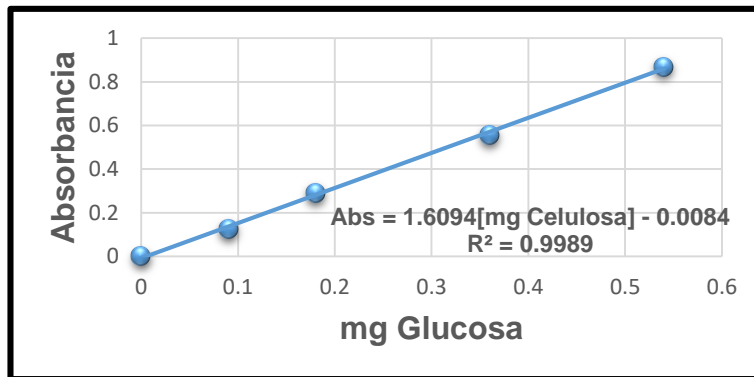


Figura 18. Curva de calibración de glucosa para la determinación de celulosa. Se hicieron curvas de calibración usando el método fenol-ácido sulfúrico; para leer las muestras se usó una $\lambda = 490$ nm (Updegraff, 1969).

En la Figura 19 se muestran los resultados de la cantidad de celulosa (mg/g peso seco de vaina). Para ambos genotipos las vainas que fueron incubadas en oscuridad presentaron el mayor contenido de celulosa por gramo de tejido; de acuerdo a lo planteado, esto iría en contra de lo previsto ya que se esperaba que en vainas con una severa restricción de nutrientes los componentes de sus paredes celulares pudieran fungir como un compuesto móvil; para el caso de celulosa parece ser que no cumple tal rol; no obstante, es interesante ver como cambia el contenido de celulosa bajo diferentes circunstancias, mientras que en condiciones normales no varía mucho, en una condición extrema el contenido de celulosa por gramo de tejido se incrementó esto sugiere que las paredes pudieran volverse más rígidas y duras con el fin de salvaguardar su contenido.

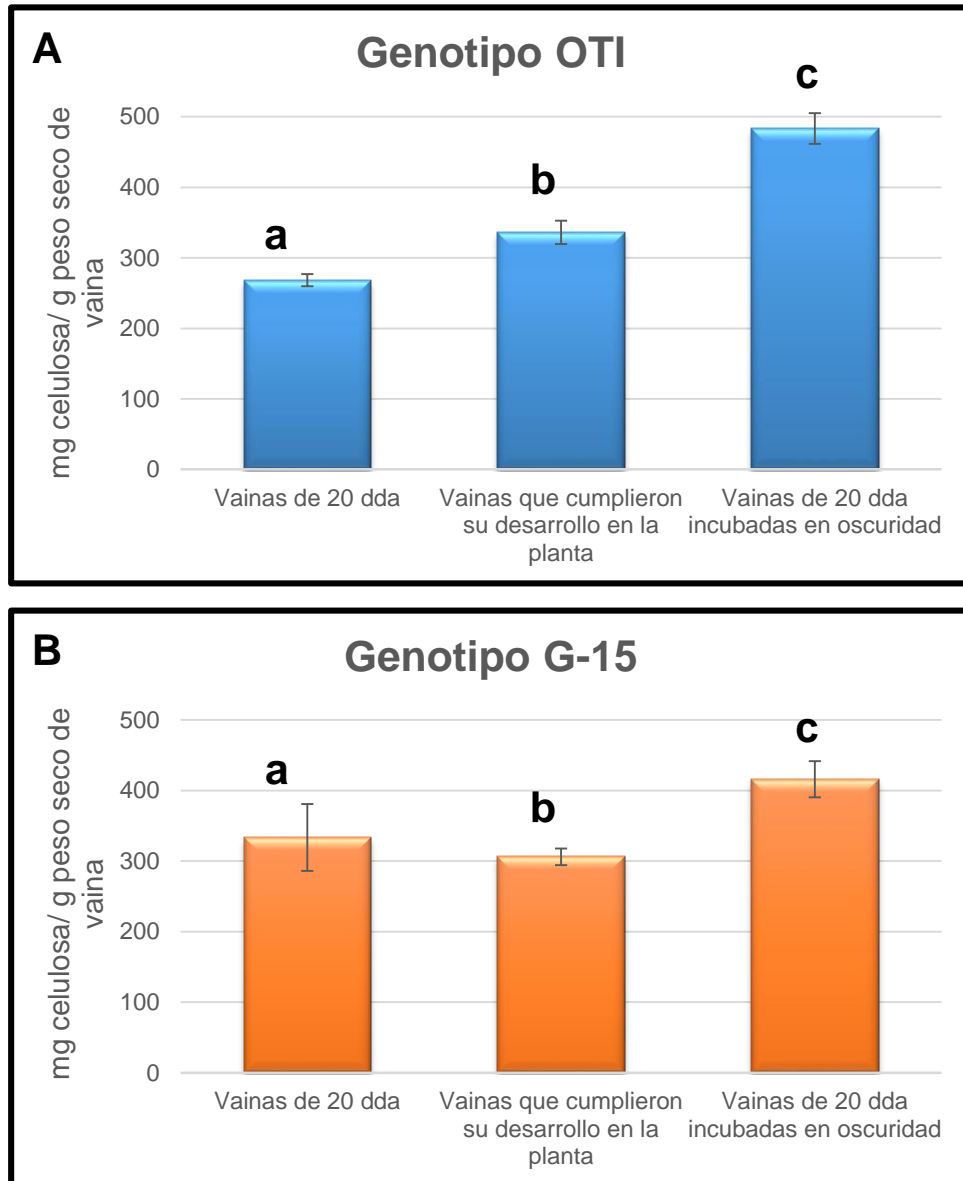


Figura 19. Contenido de celulosa en vainas de los genotipos OTI (A) y G-15 (B). En ambos casos se observa que el contenido de celulosa cambia poco en el periodo que va de los 20 DDA hasta que los frutos terminan su desarrollo. Sin embargo, en las vainas de los frutos que fueron removidos las cantidades de celulosa fueron superiores. Los puntos corresponden a promedios de 4 mediciones \pm DE. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

7.2 Contenido de Ácido Galacturónico

Para la cuantificación de pectina se determinó como ácido galacturónico; en la Figura 20 se muestra una de las curvas de calibración que se hicieron con ese fin.

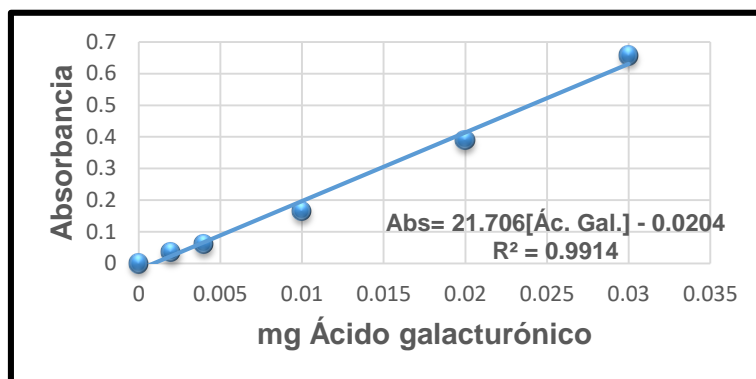


Figura 20. Curva de calibración para la determinación de pectinas. El contenido de ácido galacturónico se cuantificó midiendo la absorbancia a 520 nm y usando ácido galacturónico como referencia en un intervalo de 0 a 0.03 mg (Zhu *et al.*, 2016).

En la Figura 21 se presentan los contenidos de pectina como mg ácido galacturónico por gramo de tejido; a diferencia de la celulosa las pectinas son compuestos con una mayor dinámica y se sabe que son parcialmente móviles, se esperaría que en las vainas incubadas en oscuridad se tuviera un menor contenido de ácido galacturónico si éste es usado como una fuente de carbono; una vez más nos encontramos con todo lo contrario; en ambos genotipos, pero especialmente en el genotipo G-15 se aprecia un aumento en el contenido de ácido galacturónico, para el caso de OTI no hay diferencia significativa entre vainas con un desarrollo completo y aquellas incubadas en oscuridad; por lo que en este genotipo las pectinas podrían no tener un papel importante bajo una situación extrema, caso contrario a G-15, donde el contenido de ácido galacturónico aumenta en aquellas vainas bajo una severa restricción de nutrimentos parece ser que podrían cumplir alguna función en la pared celular que ayude a salvaguardar a las semillas.

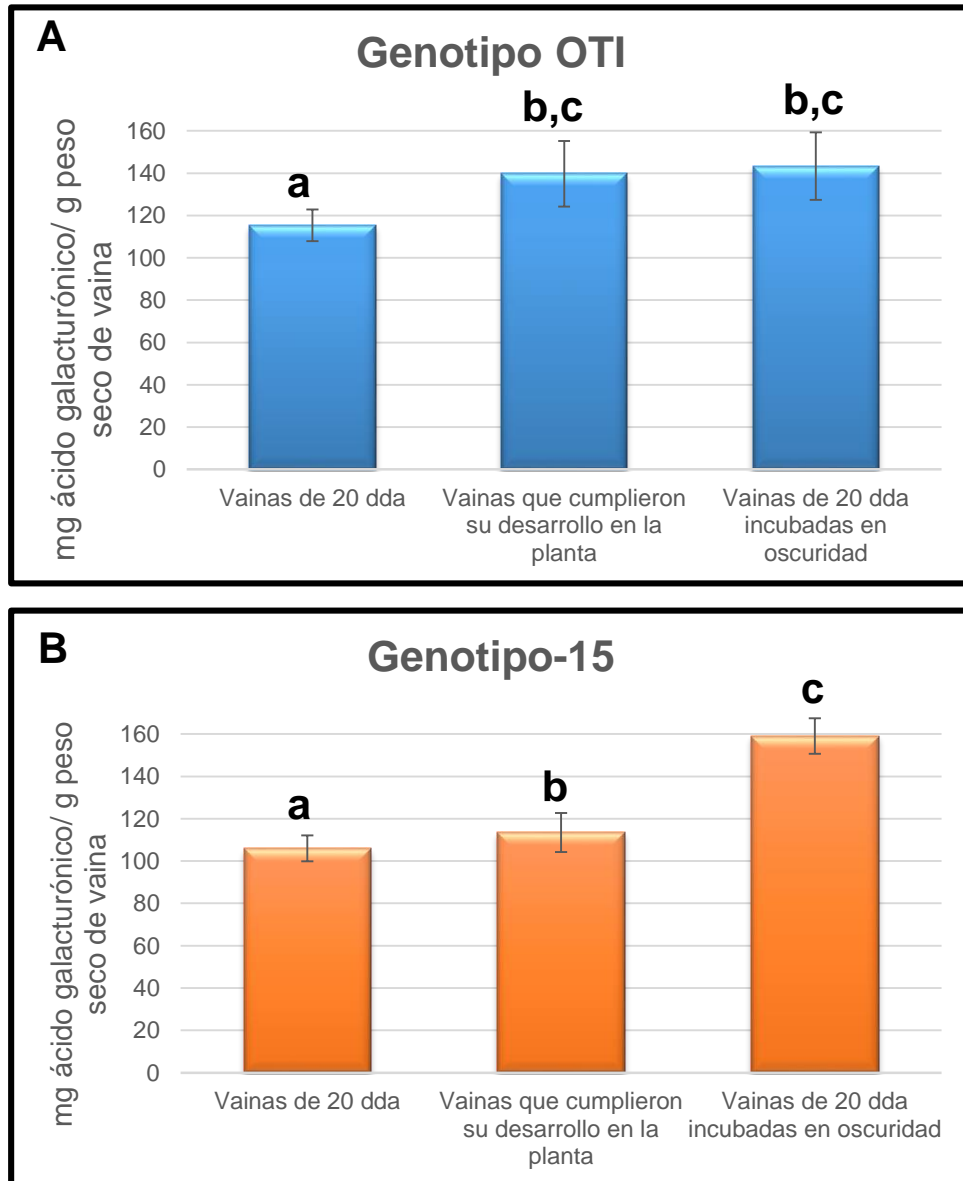


Figura 21. Contenido de ácido galacturónico en vainas de los genotipos OTI (A) y G-15 (B). En ambos genotipos el contenido de ácido galacturónico tiende a ser mayor en las vainas de los frutos que se cortaron a 20 dda y se incubaron en la oscuridad; para el caso de OTI no hay diferencia significativa entre vainas de 20 dda y vainas incubadas en oscuridad. Los puntos corresponden a promedios de 6 mediciones \pm DE. Las columnas que no comparten letras son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

7.3 Contenido de hemicelulosa

Para la determinación de hemicelulosa se realizaron curvas de calibración utilizando glucosa como estándar (Figura 22).

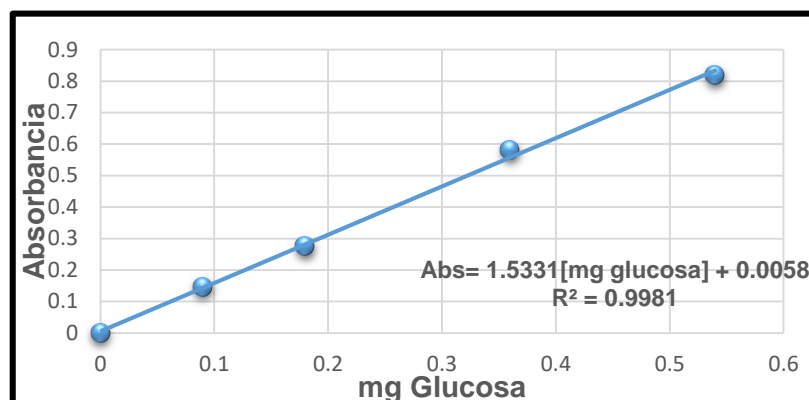


Figura 22. Curva de calibración para la determinación de hemicelulosa. Se hicieron curvas de calibración usando el método fenol-ácido sulfúrico; para leer las muestras se usó una $\lambda = 490\text{ nm}$ (Updegraff, 1969; Zhu *et al.*, 2016).

En la figura 23 se presentan los contenidos de hemicelulosa en mg hemicelulosa por gramo de vaina. De los principales componentes de las paredes celulares vegetales las hemicelulosas son reconocidas como compuestos móviles; por lo que estos compuestos sí podrían ser usados como fuentes de carbono y energía, sobretodo en una situación extrema; de acuerdo a esa lógica en las vainas incubadas en oscuridad se esperaría que el contenido de hemicelulosa fuera menor; pero nuevamente los resultados presentan que en ambos genotipos el contenido de hemicelulosa parece aumentar en aquellas vainas que fueron cortadas y sometidas a una disminución importante de nutrimentos; así que al igual que la celulosa y las pectinas, la hemicelulosa podría cumplir con algunas funciones esenciales para proteger las semillas de la vaina. En ambos genotipos también puede observarse que el contenido de hemicelulosa cambia de acuerdo a las condiciones en que se encuentra la vaina. Dado su naturaleza química, la cual es muy compleja, se sugiere que es posible que no se hayan cuantificado hemicelulosas que ya hayan cumplido alguna función como compuesto móvil y/o estructural.

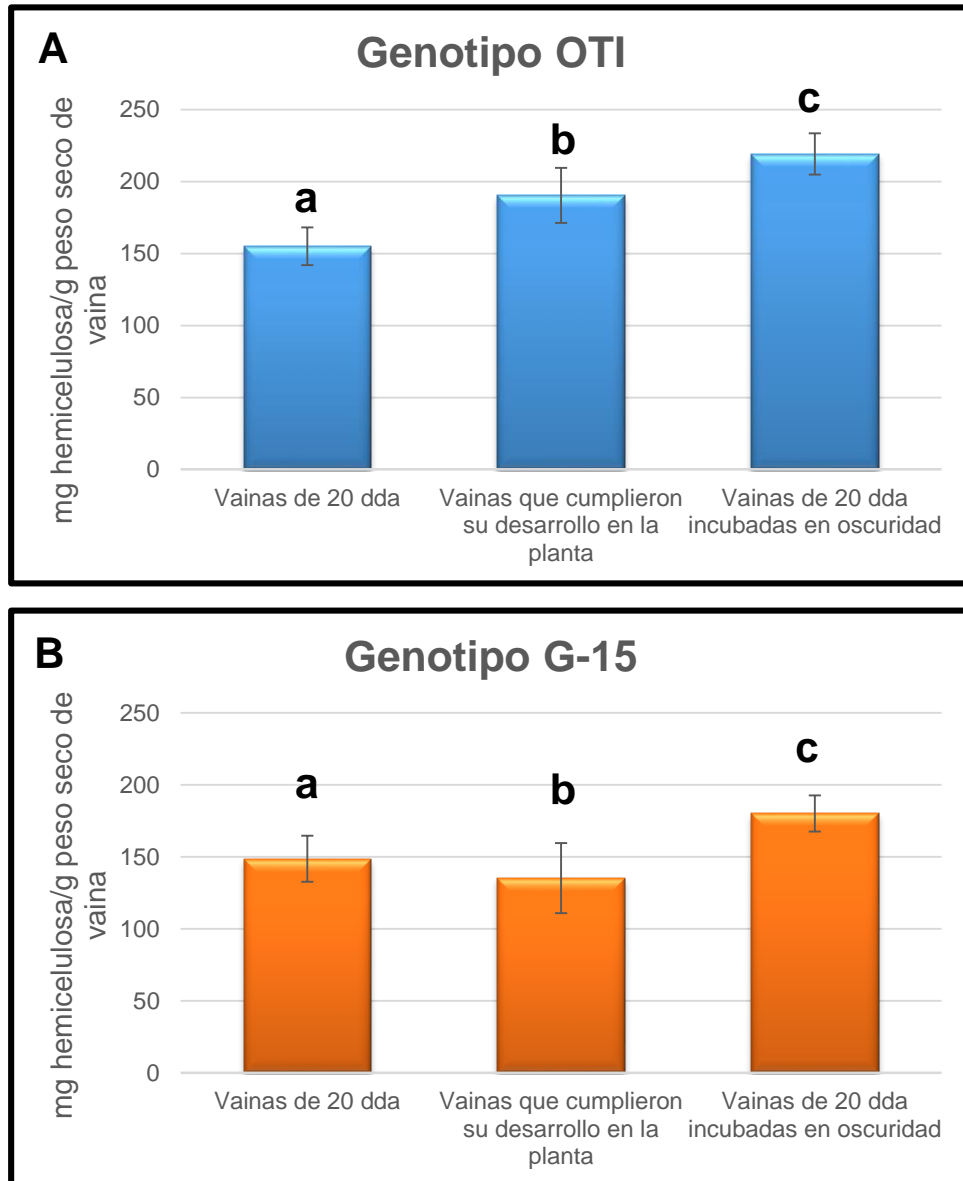


Figura 23. Contenido de hemicelulosa en vainas de los genotipos OTI (A) y G-15 (B). En ambos genotipos se observa que en las vainas de los frutos de 20 dda que se incubaron en oscuridad los contenidos de hemicelulosa son los mayores; el contenido de hemicelulosa cambia de acuerdo a las condiciones de desarrollo de la vaina. Los puntos corresponden a promedios de 4 mediciones \pm DE. Las columnas que no comparten letras son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

Con base a lo presentado en las Figuras 19, 21 y 23 los resultados indican que las vainas incubadas en oscuridad presentan un mayor contenido de los principales componentes de la pared celular; resultado que contradice lo propuesto en la hipótesis planteada.

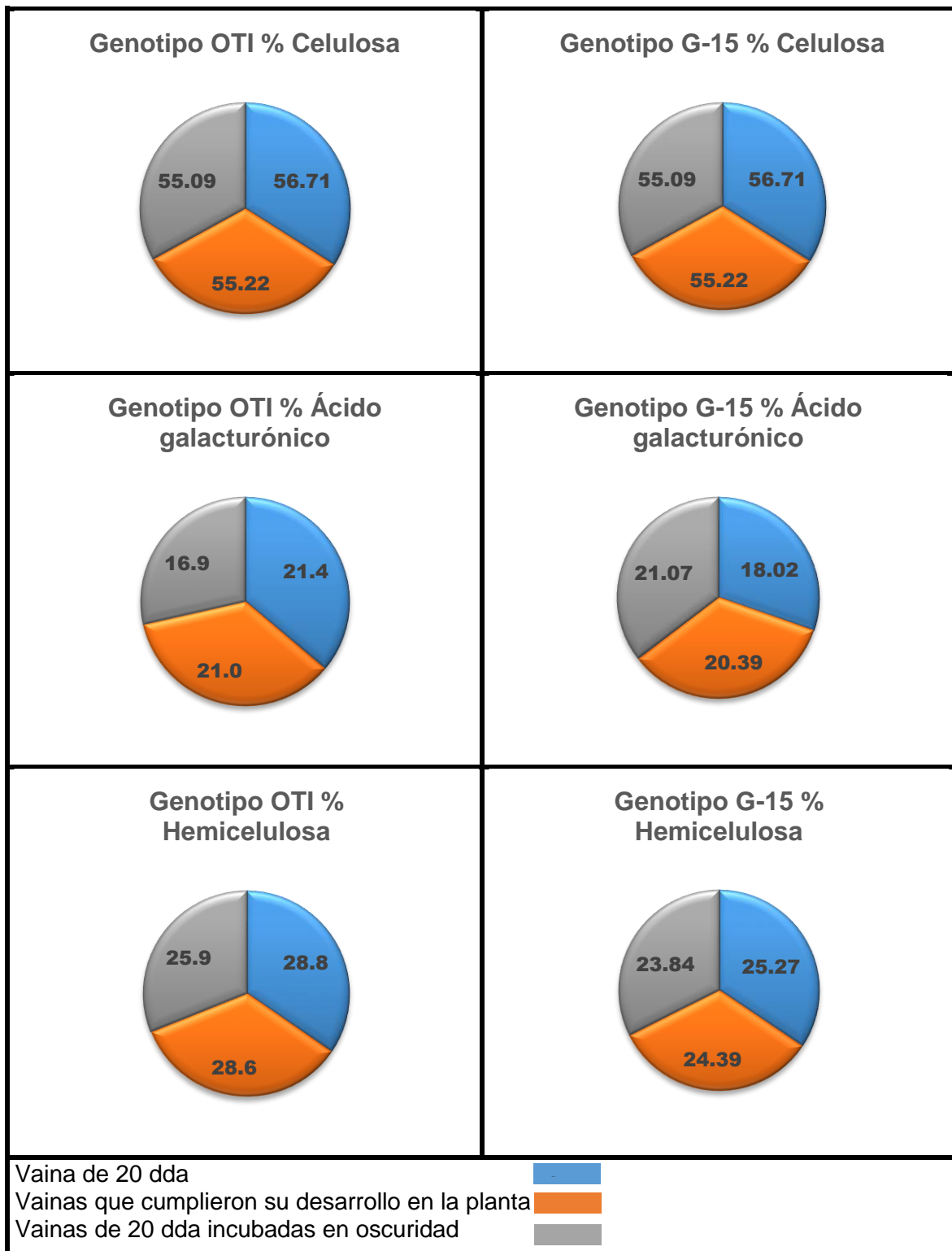


Figura 24. Composición relativa de celulosa, ácido galacturónico y hemicelulosa en las muestras analizadas. Se observa que en ambos genotipos la composición relativa no cambia entre vainas de 20 dda y vainas de 20 dda incubadas en oscuridad.

Al observar que el contenido de los diferentes compuestos analizados aumentaba en aquellas vainas sometidas a estrés se decidió sumar el promedio de cada compuesto por cada tratamiento para determinar la composición relativa de cada uno de los materiales y determinar si existía alguna variación comparándolo con las vainas con un desarrollo normal; la Figura 26 muestra la composición relativa de celulosa, ácido galacturónico y hemicelulosa de cada uno de los tratamientos en la cual, para ambos genotipos no se observa alguna diferencia importante; por lo que se sugiere que la pared celular cumple funciones similares en cualquier tratamiento y que la removilización de nutrimentos de su estructura para utilizarlos como fuente de carbono para el desarrollo de las semillas podría ser muy bajo.

8 Análisis de resultados.

En el frijol el desarrollo de la vaina y el de las semillas esta desfasado; esto se observa en ambos genotipos de acuerdo a la cinética de crecimiento de la Figura 14, la vaina alcanza un desarrollo óptimo a los 20 dda y puede llevar a cabo su principales funciones (como lo es el proteger las semilla) con normalidad y poco después de alcanzar ese estado comienza el llenado de las semillas. Esto indica que en condiciones normales la principal fuente de nutrimentos para la semilla no va a provenir de la vaina, sino de la actividad fotosintética de la hoja más cercana, no obstante cabe destacar que la vaina por si sola puede generar hasta el 60% de los recursos que necesitan las semillas (Chapin *et al.*, 1990; Diepenbrock, 2000). También la Figura 14 mostró que después de los 20 dda el peso seco promedio de las vainas cambia muy poco en ambos genotipos; se decidió que 20 dda era una buena edad para poner a prueba la capacidad de las paredes celulares de fungir como fuente de nutrimentos bajo una severa restricción de nutrimentos.

Los resultados obervados en las Figuras 15 A y 15 B revelaron el impacto que tenía la restricción de nutrimentos sobre las semillas; además apoyan la teoría de que en una situación crítica las vainas pueden desempeñar un rol como fuente de nutrimentos. De acuerdo a Chapin *et al.*, (1990) existen compuestos móviles, los cuáles se pueden reciclar para ser utilizados en el crecimiento o la respiración; los componentes de las paredes celulares tienen cierto grado de movilidad por lo que podrían ser utilizados para suplir la demanda de nutrimentos que requieren las semillas; no obstante las Figuras 15 C y D revelan que las vainas no pudieron desarrollar más de tres semillas, así que este reciclaje debe estar limitado para que la pared celular pueda seguir cumpliendo sus funciones.

Al evaluar el peso seco promedio de vainas y semillas de 20 dda y aquellas vainas incubadas en oscuridad (Figuras 16 y 17) se determinó que existe una reducción marcada en el peso de las vainas que estuvieron limitadas de recursos; esta reducción coincide con un aumento en el peso seco de sus semillas. Lo que inicialmente sucede es la degradación de las grandes cantidades de almidón que las vainas acumulan y que bajo esas condiciones se degrada eficientemente (Hoch,

2007), conforme pasó el tiempo las reservas de almidón se consumieron, aunado a esto la nula actividad fotosintética de la vaina obligaron a la vaina a extraer recursos probablemente de sus paredes celulares; el desarrollo de la planta implica una serie coordinada de procesos bioquímicos que, entre otras cosas, resultan en biosíntesis y degradación de componentes de la pared celular; entre sus principales componentes la hemicelulosa resalta debido a que son polisacáridos multifuncionales, que pueden reciclarse y usarse como reservas de carbono en momentos de suministro reducido de carbono por fotosíntesis además es el compuesto con mayor movilidad de la pared celular (Chapin *et al.*, 1990; Carpita y Gibeaut, 1993). No podemos descartar el papel que puedan llegar a tener la celulosa y la pectina como compuestos móviles. Así que la disminución del peso seco de las vainas incubadas en oscuridad puede deberse a que se extraen recursos de sus paredes celulares.

Con lo anteriormente planteado se evaluaron los contenidos de celulosa, pectina y hemicelulosa de las vainas de 20 dda, de las vainas que cumplieron un desarrollo normal y de las incubadas en oscuridad (Figuras 19, 21 y 23); los resultados esperados eran que se presentara una disminución de los componentes de pared celular en las vainas de 20 dda que fueron incubadas en oscuridad sin embargo ocurrió lo contrario, presentaron un mayor contenido en las vainas sometidas a estrés; éstos resultados van en contra de nuestra hipótesis, y son indicadores claros de que la reducción en el peso seco de las vainas que se observa en los frutos que se cortaron e incubaron en oscuridad (figuras 16 y 17), no involucra el reciclaje de componentes de la pared celular o su reciclaje es mínimo. Por otro lado, se ha descrito que durante el desarrollo de los frutos las paredes celulares cambian continuamente su composición y su arreglo estructural (Stolle-Smits *et al.*, 1999; Franková y Fry, 2013). El incremento que se observa en sus componentes sugiere que en respuesta al estrés nutricional el metabolismo de la pared no se detuvo y que la acumulación de más material dio como resultado una pared celular más resistente. Sin embargo, también es posible que ese incremento sea producto de la removilización de materiales que no se cuantificaron en este trabajo; no obstante, nuestros resultados no permiten distinguir entre ambas posibilidades.

Los compuestos que se sugiere pudieran haber contribuido al desarrollo de la semilla debido a que son compuestos con una mayor movilidad son los azúcares libres, fructanos, lípidos neutros, proteínas libres, polioles entre otros; los cuales no fueron cuantificados y se desconoce si realmente son productos de un reciclaje o son inducidos por la vaina. También debido a la complejidad de su naturaleza química, es probable que no se hayan cuantificado en su totalidad hemicelulosas y pectinas.

Este trabajo es la base de posteriores experimentos que permitan establecer si el incremento en el material acumulado en la pared celular que se observa en los frutos que se sometieron a una deficiencia nutricional severa, se debe a que su síntesis se incrementó o a que materiales que no cuantificamos fueron reciclados. Igualmente es importante establecer si dichos cambios afectan la funcionalidad de la pared celular.

También es necesario investigar si la deficiencia nutricional afecta la actividad de enzimas involucradas en la síntesis y el remodelado de la pared celular.

9 Conclusiones

- Se estableció una metodología para la determinación de celulosa, ácido galacturónico y hemicelulosa en paredes celulares de frutos de frijol.
- La deficiencia nutricional severa que resulta de cortar los frutos a 20 dda no promueve la degradación y el reciclaje de componentes de la pared celular.
- En los frutos que se sometieron a una deficiencia nutricional severa, los componentes de la pared celular se incrementaron lo que probablemente resulta en una estructura más resistente.

10 Bibliografía

- Abasolo, W., Eder, M., Yamauchi, K., Obel, N., Reinecke, A., Neumetzler, L., Dunlop, J.W.C., Mouille, G., Pauly, M., Höfte, H., y Burgert, I. (2009). Pectin may hinder the unfolding of xyloglucan chains during cell deformation: implications of the mechanical performance of *Arabidopsis* hypocotyls with pectin alterations. *Molecular Plant*, 2: 990–999.
- Abirached-Darmency, M., Abdel-gawwad, M.R., Conejero, G., Verdeil, J.L., y Thompson, R. (2005). In situ expression of two storage protein genes in relation to histo-differentiation at mid-embryogenesis in *Medicago truncatula* and *Pisum sativum* seeds. *Journal of Experimental Botany*, 56: 2019–2028.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., y Staehelin, A. (2011). *Plant cell walls: from chemistry to biology*. New York: Garland Science.
- Anderson, J.W., y Gustafson, N.J. (1988). Hypocholesterolemic effects of oat and bean products. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 48(3): 749-753.
- Arías, J.H., Rengifo, T., Jaramillo, M. (2007). Manual Técnico: Buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de frijol voluble. 30 de septiembre de 2018, de FAO Sitio web: <http://www.fao.org/3/a-a1359s.pdf>
- Atmodjo, M.A., Hao, Z., y Mohnen, D. (2013). Evolving views of pectin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 64: 747–779.
- Baskin, T.I. (2005). Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21:203–22.
- Bennett, E.J., Roberts, J.A., y Wagstaff, C. (2011). The role of the pod in seed development: strategies for manipulating yield. *New Phytologist*, 190: 838–853.
- Bootten, T.J., Harris, P.J., Melton, L.D., y Newman, R.H. (2004) Solid-state ¹³C-NMR spectroscopy shows that the xyloglucans in the primary cell walls of mung bean (*Vigna radiata* L.) occur in different domains: A new model for xyloglucan-cellulose interactions in the cell wall. *Journal of Experimental Botany*, 55: 571–583.
- Brown, R.M. Jr, y Saxena, I.M. (2000). A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38:57–67.
- Burgert, I., y Fratzl, P. (2009). Plant control the properties and actuation of their organs through the orientation of cellulose fibrils in their cell walls. *Integrative and comparative biology*, 49(1): 69-79.
- Carpita, N.C., y Gibeaut, D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*, 3: 1–30.
- Cavalier, D.M., Lerouxel, O., Neumetzler, L., Yamauchi, K., Reinecke, A., Freshour, G., Zabolina, O.A., Hahn, M.G., Burgert, I., Pauly, M., Raikhel, N.V., y Keegstra, K. (2008). Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *The Plant Cell*, 20: 1519–1537.

- Chacón, D., Martínez, E. (2007). Factores Involucrados En La Distribución De Azúcares En Las Plantas Vasculares: Comunicación Entre Los Tejidos Fuente Y Tejidos Demanda. *Revista de educación bioquímica*, 26(3): 99—105.
- Chapin, F.S., Schulze, E.D. y Mooney, H.A. (1990). The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21, 423–447.
- Cleland, R.E. (1971). Cell wall extension. *Annual Review of Plant Physiology*, 22:179–222.
- Diepenbrock, W. (2000). Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus L.*): a review. *Field Crops Research*, 67: 35–49.
- Fallahi, H., Scofield, G.N., Badger, M.R., Chow, W.S., Furbank, R.T., y Ruan, Y-L. (2008). Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development. *Journal of Experimental Botany*, 59: 3283–3295.
- Feller, U., y Fischer, A. (1994). Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Science*, 13: 241–273.
- Fernández de Córdova, F., Gepts, P.L., López-Genes, M. (1986). Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Co. 33p.
- Ferrándiz, C. (2002). Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2031–2038.
- Ferrándiz, C., Pelaz, S., y Yanofsky, M.F. (1999). Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annual Review of Biochemistry*, 68: 321–354.
- Franková, L., y C.Fry, S. (2013). Biochemistry and physiological roles of enzymes that 'cut and paste' plant cell-wall polysaccharides. *Journal experimental botany*, 64(12), 3519–3550.
- Fry, S.C. (2011). Cell wall polysaccharide composition and covalent cross-linking. In: P Ulvskov ed. *Annual plant reviews: plant polysaccharides, biosynthesis and bioengineering*, 41. Oxford: Blackwell Publishing, pp 1–42.
- Fry-Wyssling, A. (1953). Submicroscopic morphology of protoplasm. *Amsterdam: Elsevier*. p. 279–92.
- Furch, A.C., Hafke, J.B., Schulz, A., y van Bel, A.J. (2007). Ca²⁺-mediated remote control of reversible sieve tube occlusion in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany*, 58(11): 2827-2838.
- Gou, J-Y., Miller, L.M., Hou, G., Yu, X-H., Chen, X-Y., y Liu, C-J. (2012). Acetyltransferase-mediated deacetylation of pectin impairs cell elongation, pollen germination, and plant reproduction. *The Plant Cell*, 24: 50–65.
- Haupt, W. (1977). Bewegungsphysiologie der Pflanzen. Stuttgart: *Thieme Verlag*. p. 406.
- Herrera T.S., Ortíz, J., Delgado, A., y Acosta, J.A. (2012). Crecimiento y contenido de prolina y carbohidratos de plántulas de frijol sometidas a estrés por sequía. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(4): 713-725.

- Hoch, G. (2007). Cell wall hemicellulose as mobile carbon stores in non-reproductive plants tissues. *Functional technology*, 21: 823-834.
- Hoch, G., Richter, A. y Körner, C. (2003). Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant Cell and Environment*, 26:1067–1081.
- Ingold, C.T. (1959). Peristome teeth and spore discharge in mosses. *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh*, 38:76–88.
- Kong, Y., Peña, M.J., Renna, L., Avci, U., Pattathil, S., Tuomivaara, S.T., Li, X., Reiter, W.D., Brandizzi, F., Hahn, M.G., Darvill, A.G., York, W.S., y O'Neill, M.A. (2015) Galactose-depleted xyloglucan Is dysfunctional and leads to dwarfism in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 167: 1296–1306.
- Lalonde, S., Tegeder, M., Throne-Holst, M., Frommer, W.B., y Patrick, J.W. (2003). Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell & Environment*, 26: 37–56.
- Lara, M., Revista Digital Universitaria. *El cultivo de frijol en México*. [En línea] (Actualizado al 15 de febrero de 2015) Disponible en:
<http://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art09/#> [último acceso el 13 de Agosto de 2018]
- Levy, I., Shani, Z., y Shoseyov, O. (2002). Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4-beta-glucanase and cellulose-binding domains. *Biomolecular Engineering*, 19(1):17-30.
- Lucas, W.J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S.R., Helariutta, Y., X. He., H. Fukuda., J. Kang., S.M., Brady, J.W., Patrick, J., Sperry, A., Yoshida, A.F., López-Millán, M.Grusak., y Kachroo, P. (2013) The plant vascular system: evolution, development and Functions. *Journal of integrative plant biology*, 55(4): 294-388.
- Luo, Z.B., Calfapietra, C., Liberloo, M., Scarascia-Mugnozza, G. y Polle, A. (2006) Carbon partitioning to mobile and structural fractions in poplar wood under elevated CO₂ (EUROFACE) and N fertilization. *Global Change Biology*, 12: 272–283.
- Ma, L., Sun, N., Liu, X., Jiao, Y., Zhao, H., y Deng, X.W. (2005). Organ-specific expression of Arabidopsis genome during development. *Plant Physiology*, 138: 80–91.
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., y Guillén, F. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8(3):195-204.
- Meakin, P.J., y Roberts, J.A. (1990). Dehiscence of fruit in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany*, 41: 1003–1011.
- Montgomery, D.C. (2016). Diseño y análisis de experimentos. México: 2ª. Ed. Limusa.
- Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Takao, T., y Nagamatsu, Y. (2002) Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*; 66: 1301–1313.

- Ndeh, D., Rogowski, A., Cartmell, A., Luis, A.S., Baslé, A., Gray, J., Venditto, I., Briggs, J., Zhang, X., Labourel, A., Terrapon, N., Buffetto, F., Nepogodiev, S., Xiao, Y., Field, R.A., Zhu, Y., O'Neil, M.A., Urbanowicz, B.R., York, W.S., Davies, G.J., Abbott, D.W., Ralet, M.C., Martens, E.C., Henrissat, B., y Gilbert, H.J. (2017) Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. *Nature*, 544: 65–70.
- Niklas, K.J. (1992). *Plant biomechanics*. Chicago: The University of Chicago Press.
- O'Neill MA, Eberhard S, Albersheim P, Darvill AG (2001) Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth. *Science*, 294: 846–849.
- Pabst, M., Fischl, R.M., Brecker, L., Morelle, W., Fauland, A., Köfeler, H., Altmann, F., y Léonard, R. (2013) Rhamnogalacturonan II structure shows variation in the side chains monosaccharide composition and methylation status within and across different plant species. *The Plant Journal*, 76: 61–72.
- Patrick, J.W. (1997). Phloem unloading: sieve element unloading and postsieve element transport. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 191–222.
- Patrick, J.W., y Offler, C.E. (2001). Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds. *Journal of Experimental Botany*, 52: 551–564.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., y Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2):53-63.
- Phyto, P., Wang, T., Kiemle, S.N., O'Neill, H., Pingali, S.V., Hong, M., y Cosgrove, D.J. (2017) Gradients in wall mechanics and polysaccharides along growing inflorescence stems. *Plant Physiology*, 175: 1593–1607.
- Quiroz-Castañeda, R., y Folch-Mallol, J. (2011). Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *Biotecnología aplicada*, 28:194-204.
- Reid, J.S.G. y Bewley, J.D. (1979). Dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum L.*), an endospermic leguminous seed. *Planta*, 147:145–150.
- Rui, Y., Xiao, C., Yi, H., Kandemir, B., Wang, J.Z., Puri, V.M., y Anderson, C.T. (2017) POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION3 functions in seedling development, rosette growth, and stomatal dynamics in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, 29: 2413–2432.
- Ryden, P., Sugimoto-Shirasu, K., Smith, A.C., Findlay, K., Reiter, W-D., y McCann, M.C. (2003) Tensile properties of Arabidopsis cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. *Plant Physiology* 132: 1033–1040.
- Saffer, A.M. (2018). Expanding roles for pectins in plant development. *Journal of Integrative Plant Biology*. doi [10.1111/jipb.12662].
- Scheller, H.V., y Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 263–289.

- Schiltz, S., Munier-Jolain, N., Jeudy, C., Burstin, J., y Salon, C. (2005). Dynamics of exogenous nitrogen partitioning and nitrogen remobilization from vegetative organs in pea revealed by ^{15}N in vivo labeling throughout seed filling. *Plant Physiology*, 137: 1463–1473.
- Schjoerring, J., Bock, J., Gammelvind, L., Jensen, C., y Mogensen, V. (1995). Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant and Soil*, 177: 255–264.
- Schulze, W., Schulze, E., Stadler, J., Heilmeier, H., Stitt, M., y Mooney, H. (1994). Growth and Reproduction of *Arabidopsis thaliana* in relation to storage of starch and nitrate in the wild-type and in starch deficient and nitrate uptake deficient mutants. *Plant, Cell & Environment*, 17: 795–809.
- Scutt, C.P., Vinauger-Douard, M., Fourquin, C., Finet, C., Dumas, C. (2006). An evolutionary perspective on the regulation of carpel development. *Journal of Experimental Botany*, 57: 2143–2152.
- Sessions, R.A., y Zambryski, P.C. (1995). Arabidopsis gynoecium structure in the wild type and in ettin mutants. *Development*, 1532: 1519–1532.
- Spence, J., Vercher, Y., Gates, P., y Harris, N., (1996). Pod shatter in *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* and *B. juncea*. *Journal of Microscopy*, 181: 195–203.
- Stolle-Smits, T., Beekhuizen, J., Kok, M., Pijnenburg, M., Recourt, K., Derksen, J., y Voragen, A., (1999). Changes in Cell Wall Polysaccharides of Green Bean Pods during Development. *Plant Physiology*, 121, 363–372.
- Taiz, L. (1984). Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Annual Review Plant Physiology*, 35:585–657.
- Thimm, J.C., Burritt, D.J., Ducker, W.A., y Melton, L.D. (2009) Pectins influence microfibril aggregation in celery cell walls: An atomic force microscopy study. *Journal of Structural Biology*, 168: 337–344.
- Updegraff DM (1969) Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry* 32: 420-424.
- van Bel, A.J. (2003). The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell & Environment*, 26 (1): 125-149.
- Verhertbruggen, Y., Marcus, S.E., Haege, A., Verhoef, R., Schols, H.A., McCleary, B.V., McKee, L., Gilbert, H.J., y Knox, J. (2009) Developmental complexity of arabinan polysaccharides and their processing in plant cell walls. *The Plant Journal*, 59: 413–425.
- Vetten, N.C., Huber, D.J. (1990). Cell wall changes during the expression and senescence of carnation (*Dianthus caryophyllus*) petals. *Physiology Plant*. 78: 447-454.
- Veytsman, B.A. y Cosgrove, D.J. (1998). A model of cell wall expansion based on thermodynamics of polymer networks. *Biophysical Journal*, 75:2240–50.

- Wagstaff, C., Yang, T.J., Stead, A.D., Buchanan-Wollaston, V. y Roberts, J.A. (2009). A molecular and structural characterization of senescing *Arabidopsis* siliques and comparison of transcriptional profiles with senescing petals and leaves. *Plant Journal*, 57: 690–705.
- Wardlaw, B. (1990). The control of carbon partitioning in plants. *New Phytologist*, 116: 341–381.
- Wolf, S., Mouille, G., y Pelloux, J. (2009) Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular Plant*, 2: 851–860.
- Xiao C, Somerville C y Anderson C.T. (2014) POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION1 functions in cell elongation and flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26: 1018– 1035.
- Zandleven J, Sørensen SO, Harholt J, Beldman G, Schols HA, Scheller HV y Voragen AJ (2007) Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 68: 1219–1226.
- Zhu, C.Q., Zhu, X.F., Hu, A.Y., Wang C., Wang B., Dong, X.Y. y Shen, R.F. (2016). Differential Effects of Nitrogen Forms on Cell Wall Phosphorus Remobilization Are Mediated by Nitric Oxide, Pectin Content, and Phosphate Transporter Expression. *Plant Physiology*, 171:1407–1417