



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

PAPEL DEL FUNÍCULO EN LA REGULACIÓN DEL FLUJO DE NUTRIENTES  
EN FRUTOS DE *PHASEOLUS VULGARIS* SOMETIDOS A ESTRÉS  
NUTRICIONAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:  
VERA ISABEL MARTÍNEZ BARRADAS

TUTOR PRINCIPAL

DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS  
[Facultad de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN  
[Facultad de Ciencias, UNAM](#)

DR. FELIPE CRUZ GARCÍA  
[Facultad de Química, UNAM](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Eleazar Martínez Barajas por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su asesoría durante la realización de este trabajo, y por su apoyo y dedicación en mi formación académica.

Al Dr. Felipe Cruz García y la Dra. Judith Márquez Guzmán por formar parte del comité tutor que supervisó el desarrollo de este trabajo.

Al Jurado de Examen conformado por: Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles, Dr. Luis Cardenas Torres, Dra. Alicia Gamboa de Buen, Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra, Dra. Sobeida Sánchez Nieto. Por sus revisiones que contribuyeron a mejorar la calidad de este trabajo.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán por permitirme utilizar el equipo para realizar los cortes histológicos durante el desarrollo de esta tesis, así como por su apoyo incondicional durante mi desarrollo académico.

Al Dr. Felipe Cruz García su apoyo para la realización de las inmunolocalizaciones.

A la Dra. Esther Zúñiga Sánchez por su apoyo constante en el laboratorio, por su apoyo en la extracción de RNA, y por la interminable cantidad de dudas que me ayudó a resolver durante la maestría.

Al M. en C. Alejandro Martínez Mena del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM por la asesoría en microscopia fotónica y toma de fotomicrografías.

Al Biól. José Antonio Hernández Gómez del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM por el procesamiento de imágenes.

A la M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco del Laboratorio de Desarrollo de Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM por su asesoría en el procesamiento de material para la obtención de cortes histológicos.

Al M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong del Laboratorio de Desarrollo de Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM por su asesoría en el procesamiento de material para la obtención de cortes histológicos.

A la Dra. Karina Jiménez Durán de la USAII, Facultad de Química, UNAM por la obtención de fotografías en el microscopio confocal, así como por su asesoría para la realización de las inmunolocalizaciones.

Al Q. Rafael Iván Puente Lee de la USAII, Facultad de Química, UNAM por la obtención de fotografías en el microscopio electrónico de barrido.

A la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias del Instituto de Biología, UNAM por su apoyo con la deshidratación del material para el microscopio electrónico de barrido, la obtención de fotografías, y su asesoría en el procesamiento del material.

Al Biól. Víctor Taracena Morales por su apoyo en el análisis estadístico.

Al Dr. Jorge Ramírez Salcedo de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por el apoyo en la realización del experimento de microarreglos, y la asesoría para el análisis de datos.

Al Dr. José Luis Santillán Torres de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por el apoyo en la realización del experimento de microarreglos.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para presentar los resultados de este trabajo en los congresos Plant Biology (2016), y Plant Molecular Physiology (2017).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

Este trabajo se realizó con el financiamiento otorgado por DGAPA-UNAM (proyectos IN 214314 y IN203017) y Facultad de Química-UNAM (PAIP 5000-9127).

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 El frijol en México.....	2
1.2 Anatomía y desarrollo del frijol.....	3
1.3 Floema.....	8
1.4 Calosa.....	13
1.5 Modelo de estudio.....	16
2. HIPÓTESIS.....	18
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo General.....	18
3.2 Objetivos Particulares.....	18
4. MÉTODOS.....	19
4.1 Material Biológico.....	19
4.2 Extracción y Separación de Proteína.....	19
4.3 Distribución de Sacarosa [ $U-^{14}C$ ] en Frutos.....	20
4.4 Cuantificación de Azúcares.....	22
4.5 Inmunolocalización de Calosa.....	23
4.6 Digestión de Citoplasma para Observación de placas Cribosas en el Microscopio Electrónico de Barrido .....	24
4.7 Análisis de Microarreglos.....	25
4.7.1 Extracción de RNA.....	25
4.7.2 Análisis de Datos.....	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1 Cuantificación y Separación de Proteína.....	27
5.2 Distribución de Sacarosa [ $U-^{14}C$ ] en Frutos.....	28
5.3 Cuantificación de Azúcares.....	30
5.4 Detección de Calosa en Haces Vasculares.....	36
5.5 Observación de Placas Cribosas al Microscopio Electrónico de Barrido.....	39
5.6 Análisis de Microarreglos.....	42

6. DISCUSIÓN.....	53
7. CONCLUSIONES.....	58
8. PERSPECTIVAS.....	59
9. BIBLIOGRAFÍA.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sección transversal de fruto de <i>P. vulgaris</i> . .....	4
<b>Figura 2.</b> Haces vasculares de la cubierta seminal. ....	5
<b>Figura 3.</b> Corte longitudinal de funículo de <i>P. vulgaris</i> .....	7
<b>Figura 4.</b> Esquema de elementos de tubo criboso maduros.....	10
<b>Figura 5.</b> Transporte a través del floema desde órganos fuente a órganos demanda.....	12
<b>Figura 6.</b> Estructura del $\beta$ -(1,3)-glucano (calosa). ....	14
<b>Figura 7.</b> Frutos de <i>P. vulgaris</i> a los 23 y 25 DDA, recién removidas de la planta (23 DDA y 25 DDA) y removidas al día 20 DDA y mantenidas en oscuridad por 3 (20+3 R) y 5 (20+5 R) días.. ..	17
<b>Figura 8.</b> Secciones de tejido utilizadas para la cuantificación de sacarosa [ $U-^{14}C$ ].....	21
<b>Figura 9.</b> Corte longitudinal del funículo mostrando las secciones utilizadas para el conteo de placas cribosas engrosadas. ....	24
<b>Figura 10.</b> Análisis por SDS-PAGE de las proteínas presentes en extractos de embriones de frijol. ....	27
<b>Figura 11.</b> Distribución de marca en metabolitos solubles en etanol al 80% en extractos de pericarpo. ....	29
<b>Figura 12.</b> Síntesis de almidón y proteínas en embriones de frutos de 23 DDA desarrollados en condiciones normales (control) o en frutos que fueron cortados de la planta 3 días antes de ser incubados por 2 días en una solución de sacarosa [ $U-^{14}C$ ].....	30
<b>Figura 13.</b> Determinación de la concentración de (A) sacarosa, (B) glucosa y (C) fructosa en secciones de pericarpo. ....	32
<b>Figura 14.</b> Determinación de la concentración de (A) sacarosa, (B) glucosa y (C) fructosa en secciones de funículo. ....	33
<b>Figura 15.</b> Determinación de la concentración de (A) sacarosa, (B) glucosa y (C) fructosa en cubiertas seminales. ....	34
<b>Figura 16.</b> Determinación de la concentración de (A) sacarosa, (B) glucosa y (C) fructosa en embriones. ....	35
<b>Figura 17.</b> Placas cribosas representativas del floema de funículos de semillas de 23 y 25 DDA. ....	37
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de placas cribosas engrosadas y normales.....	38
<b>Figura 19.</b> Distribución del grosor de las placas cribosas del floema de las secciones inferiores de funículos.....	38

<b>Figura 20.</b> Microfotografías al microscopio electrónico de barrido de placas cribosas representativas de funículos de semillas de 23 DDA .....	40
<b>Figura 21.</b> Distancia entre poros de las placas cribosas.....	41
<b>Figura 22.</b> Integridad del RNA purificado de funículos de semillas 20+3N y 20+3P.....	42
<b>Figura 23.</b> Procesos biológicos que presentan genes que aumentaron (A) o disminuyeron (B) su expresión en los funículos de las semillas 20+3P, con relación al nivel observado en los funículos de las semillas 20+3N. ....	46
<b>Figura 24.</b> Metabolismo de cianoaminoácidos.....	47
<b>Figura 25.</b> Cambios en la expresión de genes que participan en el metabolismo del ácido 2-oxocarboxílico en funículos de semillas pequeñas.....	49
<b>Figura 26.</b> Vía de síntesis de fenilpropanoides.....	50
<b>Figura 27.</b> Vía metabólica de la síntesis de diterpenos .....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen de la función biológica de las distintas calosas sintasas.....	15
<b>Tabla 2.</b> Composición de geles de poliacrilamida para electroforesis desnaturalizante.....	20
<b>Tabla 3.</b> Número de placas cribosas de cada tipo de funículo acorde a la relación área de flujo/área observada y porcentaje que representan con respecto al total para cada categoría.....	41
<b>Tabla 4.</b> Categorías funcionales de genes que incrementaron su expresión en funículos de semillas que después de 3 días no continuaron con su desarrollo en frutos que se cortaron de la planta a 20 DDA. ....	44
<b>Tabla 5.</b> Categorías funcionales de genes que disminuyeron su expresión en funículos de semillas que después de 3 días no continuaron con su desarrollo en frutos que se cortaron de la planta a 20 DDA. ....	44

## ABREVIATURAS

cpm	cuentas por minuto
DDA	Días después de la antesis
DTT	Ditiotreitol
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Etilenglicol-bis (2-aminoetileter)-N,N, N', N'- ácido tetraacético
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
MEB	Microscopio electrónico de barrido
N	Normales
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
P	Pequeñas
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos
PF	Peso fresco
PGI	Fosfoglucosa isomerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
[U- <sup>14</sup> C]	uniformemente marcada con <sup>14</sup> C

## RESUMEN

La producción de semillas es una prioridad en las plantas anuales (como es el caso del frijol común, *Phaseolus vulgaris*), que se mantiene incluso en condiciones de estrés. Para investigar las características de los mecanismos involucrados en permitir que el desarrollo de las semillas continúe bajo condiciones adversas, en este trabajo se utilizaron como modelo experimental frutos de frijol que fueron removidos de la planta al día 20 después de la antesis. En ese momento las semillas se encuentran en etapa inicial del periodo de llenado. Normalmente, la pared del fruto no hace una aportación significativa de nutrientes a las semillas. Sin embargo, en los frutos se remueven, al interrumpir el flujo de nutrientes, se movilizan los materiales previamente almacenados en el fruto y se logra la formación exitosa de una o dos semillas por fruto. En este trabajo se evaluaron las concentraciones de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) en las semillas y en los tejidos del fruto asociados con ellas. Se encontró que en aquellas semillas que no se desarrollan en los frutos que fueron cortados de la planta, el suministro de nutrientes se suspende de manera total. Esos datos junto con los del análisis de la distribución de sacarosa [ $U-^{14}C$ ], permitieron identificar que el funículo -el tejido que une a la semilla con la placenta-, es el sitio en donde se interrumpe el flujo de nutrientes. El estudio anatómico del floema de los funículos: inmunolocalización de calosa y observaciones al microscopio electrónico de barrido de las placas cribosas muestran que la reducción en el flujo a través del floema en los funículos se debe a que la acumulación de calosa disminuye de manera muy importante el diámetro de los poros. .

Adicionalmente, por medio de la hibridación del RNA extraído de los funículos de semillas que continuaron o no su desarrollo en los frutos que fueron cortados de la planta, con un microarreglo del transcriptoma de *Arabidopsis thaliana*, se evaluaron los cambios en la expresión génica. Se encontró que la acumulación de calosa en las placas cribosas no se debe al incremento en la expresión de los genes responsables de su síntesis. Sin embargo, se identificaron cambios que podrían favorecer el reciclaje de diversos materiales, alteraciones en el estado redox y desbalances hormonales que podrían ser importantes en la regulación del proceso.

Se concluye que en frijol, el flujo del floema hacia las semillas que no se desarrollan es controlado en el funículo, donde, bajo condiciones de estrés nutricional severo, éste se reduce como consecuencia de la acumulación de calosa, la cual disminuye el diámetro de los poros de la placa cribosa.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El Frijol en México

El frijol común es una planta herbácea de ciclo anual que se clasifica dentro del género *Phaseolus* y de la familia *Leguminosae*. Este género tiene origen en el continente americano y, la riqueza genética presente en el área de México-Guatemala, hace que esta zona sea considerada uno de los centros de origen de la especie (Miranda-Colín, 1967). Con *Phaseolus vulgaris* (frijol común), coexisten especies del mismo género como *P. coccineus* (ayacote), *P. acutifolius* (frijol tépari) y *P. lunatus* (frijol lima), que en algunas regiones también son de importancia económica (Estrada *et al.*, 2007). Hoy en día, México es uno de los principales países productores y consumidores del cultivo. Zacatecas es el estado con la mayor producción, seguido de Durango, Sinaloa, Chihuahua, y Chiapas, cuya producción equivale al 71.4% de la producción nacional (SAGARPA, 2017). En el año 2016, el consumo anual per cápita de frijol fue de 8.4 kg (FIRA, 2016), y por la superficie sembrada, después de maíz, pastos y sorgo, el frijol es el cuarto cultivo más importante. Sin embargo, en el año 2015 de un total de 1.68 millones de hectáreas sembradas se cosechó el 92.6%, y de esta superficie, el 90.1% se cultivó en condiciones de temporal, donde temperaturas extremas y la baja disponibilidad de agua limitan seriamente la productividad. Este mismo año, el rendimiento promedio por hectárea en riego fue de 1.52 toneladas, mientras que en temporal fue de 0.58 toneladas. Generalmente, la producción nacional de frijol es deficitaria, y para cubrir el consumo nacional debe importarse en grandes cantidades (FIRA, 2016). En México existen más de 150 variedades mejoradas adaptadas a prácticamente todas las regiones del país. Sin embargo, en un escenario de cambio climático que podría modificar radicalmente las condiciones de cultivo, es necesario redoblar esfuerzos para obtener genotipos con mayor capacidad para enfrentar condiciones ambientales adversas. En México los trabajos para el mejoramiento genético del frijol iniciaron alrededor de la década de 1930. Las primeras etapas consistieron en seleccionar materiales nativos cultivados por los agricultores. Actualmente muchas variedades son producto de cruzamientos simples o complejos entre genotipos de diversas razas (Voysest, 2000). La gran dificultad para regenerar callos embriogénicos ha limitado el uso de la transformación genética (Collado *et al.*, 2015) y aún cuando se han reportado eventos de transformación exitosos (Aragão *et al.*, 2013), actualmente las mayores oportunidades para obtener nuevas variedades radican en el uso de la variabilidad genética disponible. Sin embargo, el uso eficiente de esos recursos genéticos exige un conocimiento profundo del efecto de condiciones adversas sobre sus características fenológicas, su

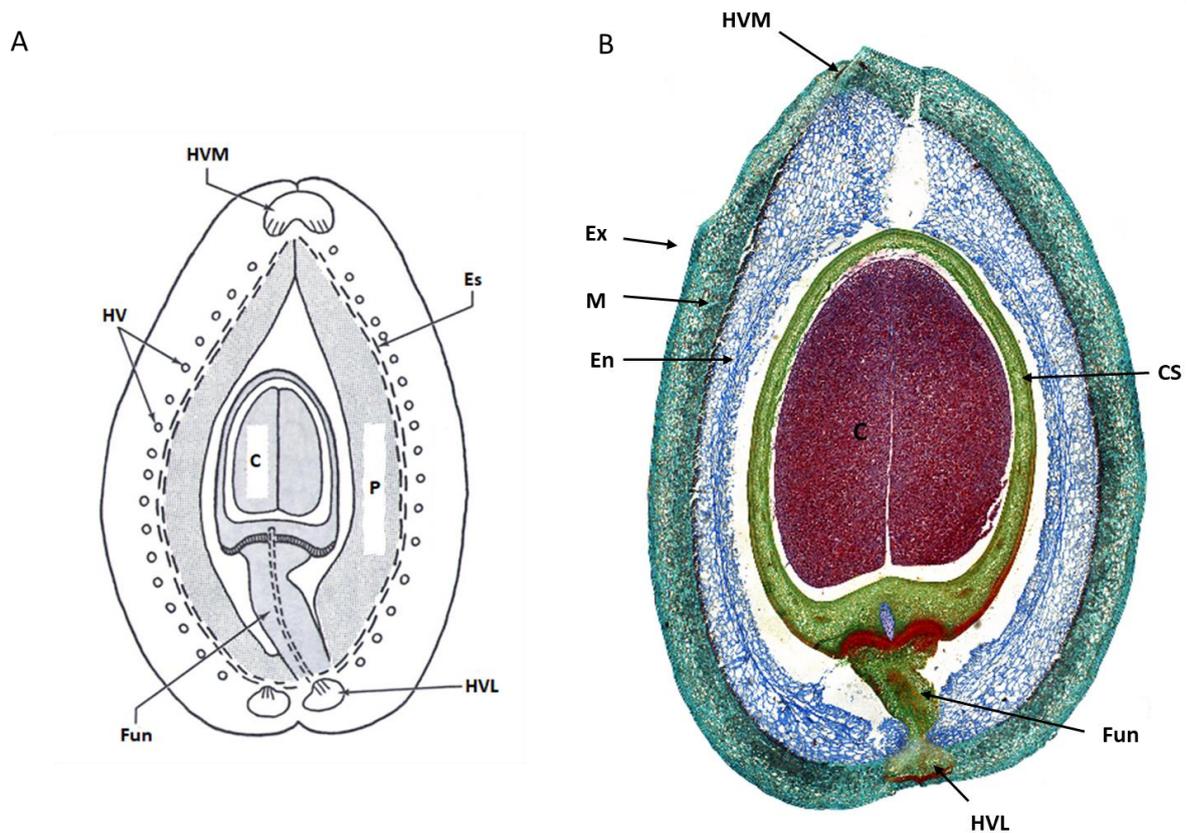
productividad y la eficiencia con la que regulan la distribución de su biomasa (Rosales-Serna *et al.*, 2000).

## 1.2 Anatomía y Desarrollo del Frijol

En *P. vulgaris* el fruto es una vaina sencilla, dehiscente, que se desarrolla a partir de un solo carpelo. Su forma es cilíndrica y se constriñe entre las semillas. El pericarpo, que es la pared del ovario maduro consiste de tres capas distintas: el exocarpo, mesocarpo y endocarpo. El exocarpo está compuesto por la epidermis y una región subepidérmica de una o dos capas de células, que en ambos casos tienen paredes gruesas. El mesocarpo, se ubica contiguo al exocarpo. Está formado de células parenquimáticas con numerosos gránulos de almidón, paredes ligeramente lignificadas y engrosadas tangencialmente (Nassar *et al.*, 2010). Es en esta región donde se encuentran embebidos los haces vasculares que nutren a la vaina, formando una red que interconecta dos haces vasculares laterales con un haz vascular medio (Esau, 1977). El endocarpo es la capa concéntrica ubicada en el interior de la vaina y está compuesta por parénquima cuyas células tienen paredes delgadas y alargadas en varios planos (Nassar *et al.*, 2010) (Figura 1).

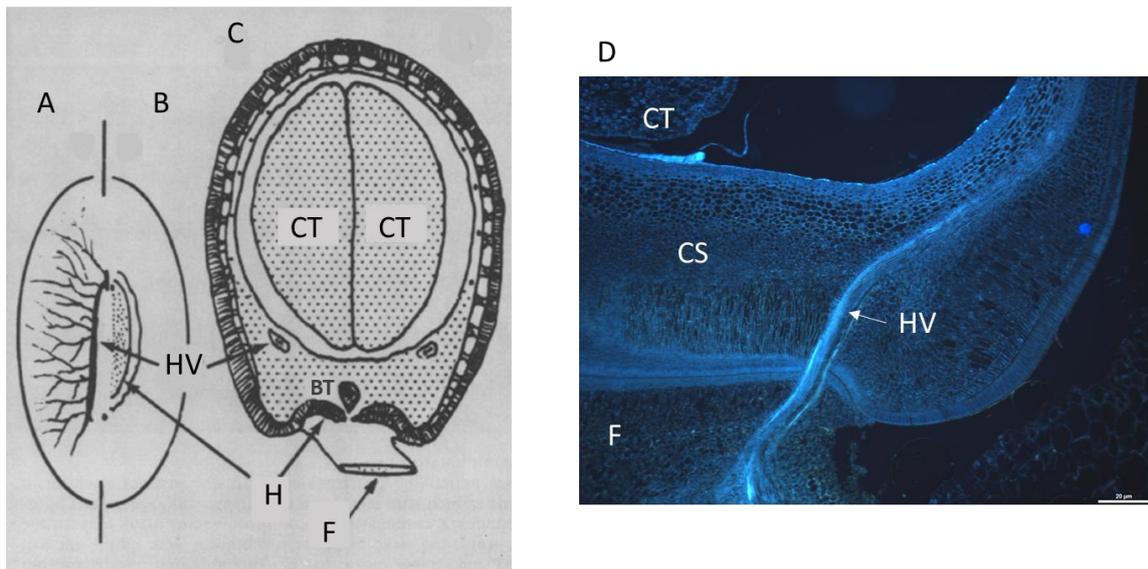
El gineceo de las flores de frijol tiene un carpelo, en el ovario hay solo un lóculo y la placentación es marginal. El ovario presenta dos haces vasculares en la placenta (haces dorsales), y uno en posición opuesta (el haz ventral) (Nassar *et al.*, 2010).

La polinización en *P. vulgaris* ocurre de 36-48 h antes de la antesis (Öpik, 1968), y a partir de ésta comienza la formación de la semilla. La cubierta seminal, producto de los tegumentos se diferencia en distintas capas a medida que el óvulo madura. La más externa (la epidermis), es uniseriada y compuesta por macroesclereidas con paredes engrosadas de forma desigual, las cuales se acomodan en empalizada, lo que constituye una característica típica de las semillas de leguminosas. Las células de la subepidermis se diferencian en células columnares, también llamadas células pilar o “reloj de arena”. Por debajo de la subepidermis se encuentran células parenquimáticas grandes y elongadas tangencialmente, estando las capas más internas comprimidas (Esau, 1977; Nassar *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Sección transversal de fruto de *P. vulgaris*. A: esquema modificado de Esau (1977). B: corte coloreado con Adobe Photoshop (obtenido durante la realización de este trabajo). C: cotiledón; CS: cubierta seminal; En: endocarpo; Es: esclerénquima; Ex: exocarpo; Fun: funículo; HV: haces vasculares; HVL: haces vasculares laterales; HVM: haz vascular medio; M: mesocarpo, P: parénquima.

La cubierta seminal tiene un sistema vascular bien desarrollado, que se extiende desde el haz vascular del funículo hasta la región calazal donde se ramifica. En la parte más interna de la cubierta seminal se encuentra la epidermis interna, con células ligeramente esbozadas y pobremente lignificadas (Esau, 1977; Nassar *et al.*, 2010) (Figura 2).



**Figura 2.** Haces vasculares de la cubierta seminal. A-C Esquema tomado de Thorne (1981). A: ramificaciones de un haz vascular en la cubierta seminal con respecto al hilo (B). C: Localización de los haces vasculares con respecto a la barra de traqueidas, el funículo y los cotiledones. D: Corte longitudinal de la región calazal de semilla de *P. vulgaris*, se aprecia la entrada del haz vascular del funículo a la cubierta seminal (corte obtenido durante la realización de este trabajo). BT: barra de traqueidas; CS: cubierta seminal; CT: cotiledón; F: funículo; H: hilo; HV: haz vascular.

En la región del hilo hay dos capas de parénquima en empalizada. La capa externa se deriva del funículo, y la interna de la cubierta seminal. En el punto medio de ésta región se observa un grupo de traqueidas compactas (Esau, 1977; Nassar *et al.*, 2010).

La cubierta seminal rodea al embrión que consiste de dos cotiledones, plúmula y radícula. Los cotiledones tienen células de pared delgada, ricas en gránulos de almidón de gran tamaño (Nassar *et al.*, 2010).

Al inicio de su desarrollo, los cotiledones del frijol presentan características propias de las células vegetales en proceso de desarrollo y diferenciación: las vacuolas se expanden, el retículo endoplásmico prolifera, la proporción de ribosomas unidos aumenta, y las mitocondrias y plástidos se multiplican poco antes de que inicie el periodo de almacenaje de reservas. En esa etapa, la acumulación del almidón sintetizado en los plastidios modifica la estructura membranal y eventualmente causa su desintegración. El almacenaje de proteínas inicia tiempo después de que comenzó el de almidón (Öpik, 1968).

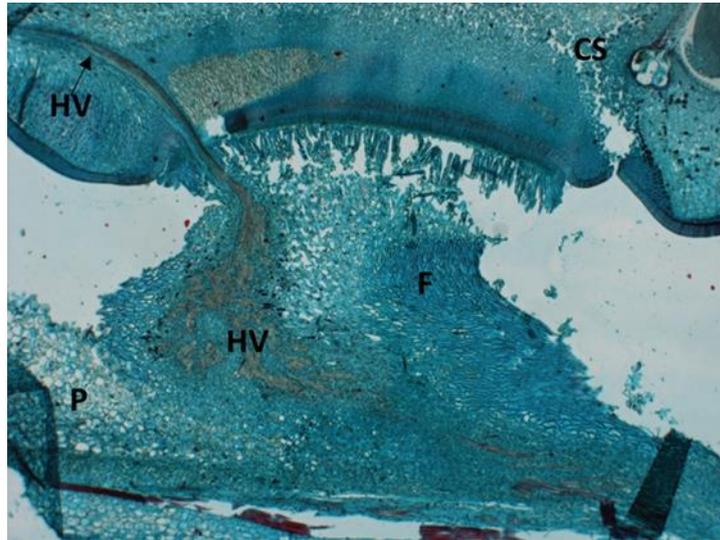
A los 16 días después de anthesis (DDA), el embrión se encuentra suspendido en endospermo líquido, y las capas más externas de los cotiledones (tres a cinco) son de células

meristemáticas. Los cotiledones tienen plastidios que almacenan grandes cantidades de almidón, y los haces vasculares se pueden observar con claridad. A partir de los 19 DDA el crecimiento del embrión le permite alcanzar a la cubierta y el endospermo líquido desaparece. Las células epidérmicas continúan en división, pero las internas comienzan la etapa de expansión. A los 25 DDA comienza la etapa de maduración; la división celular se detiene, y las células continúan en expansión. Los cotiledones aumentan las cantidades de material de reserva y los gránulos de almidón aumentan su tamaño. Las reservas se distribuyen uniformemente exceptuando la epidermis y subepidermis. La expansión celular en los cotiledones termina a los 34 DDA (Öpik, 1968), y es entonces cuando comienza la deshidratación de la semilla (Mawson *et al.*, 1994).

Existe una estrecha relación entre el desarrollo de la vaina y el de la semilla. Independientemente del genotipo, al alcanzar la vaina su longitud máxima, las semillas pasan por una transición fisiológica importante; finaliza la etapa de división celular, y comienza la de expansión, etapa que a su vez representa el momento de demanda máxima de nitrógeno y fotoasimilados por parte de la semilla (Clavijo-Michelangeli *et al.*, 2013).

Sin embargo, la conexión entre la semilla y la vaina no ocurre directamente; el funículo es el tejido que conecta a la semilla en desarrollo con el tejido materno del fruto, y todos los nutrientes son canalizados a través de él (Hardham, 1976), por lo que su funcionamiento es indispensable para el desarrollo de la semilla (Fountain *et al.*, 1989).

Los haces vasculares del funículo tienen una organización distinta a la que comúnmente se observa en las ramificaciones de los tallos, en vez de observarse la separación de un único haz vascular del sistema vascular principal de la vaina, el procámbium del funículo se divide y diferencia en un núcleo concentrado de tejido vascular cercano a la vasculatura de la vaina, con una organización entrecruzada. La cantidad de tejido vascular disminuye a medida que se acerca a la semilla (Mawson *et al.*, 1994) (Figura 3).



**Figura 3.** Corte longitudinal de funículo de *P. vulgaris* (Obtenido durante la realización de este trabajo). CS: cubierta seminal; F: funículo; HV: haz vascular; P: pericarpo.

Así como existe una relación entre el desarrollo de la semilla y la vaina, también se ha descrito que la maduración de haces vasculares del funículo es gradual y acoplada al desarrollo de la semilla. En la etapa proembrionaria, el funículo está formado de parénquima cortical, procámbium y unos pocos haces vasculares. Posteriormente, el procámbium dará origen a nuevas células de xilema y floema. Generalmente, las células del xilema se ubican en la región central del procámbium, mientras que el floema ocupa la parte exterior. Estas divisiones celulares continúan durante la etapa globular y de corazón del embrión, y disminuyen al entrar la semilla en la etapa cotiledonaria; lo que se traduce en el aumento en el número de elementos vasculares maduros y del tamaño del funículo. Después de esta etapa, el crecimiento del funículo se debe a expansión celular y a la maduración de haces vasculares. Al comenzar la etapa de maduración de la semilla (aproximadamente a los 21-23 DDA), el tejido vascular está completamente desarrollado, y el funículo ha alcanzado su máximo tamaño. Las células parenquimáticas se mantienen metabólicamente activas hasta que comienza la etapa de deshidratación de la semilla, proceso durante el cual el funículo se contrae y colapsa (Mawson *et al.*, 1994).

### 1.3 Floema

Durante el curso de la evolución, las plantas terrestres desarrollaron un sistema para distribuir los fotoasimilados. 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, no utiliza las fuerzas físicas generadas por las diferencias de potencial del agua a lo largo del continuo tierra-planta-aire, sino que en este caso, el flujo es impulsado por el agua en contra del gradiente de transpiración (van Bel, 2003).

Este sistema brinda la posibilidad de 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).

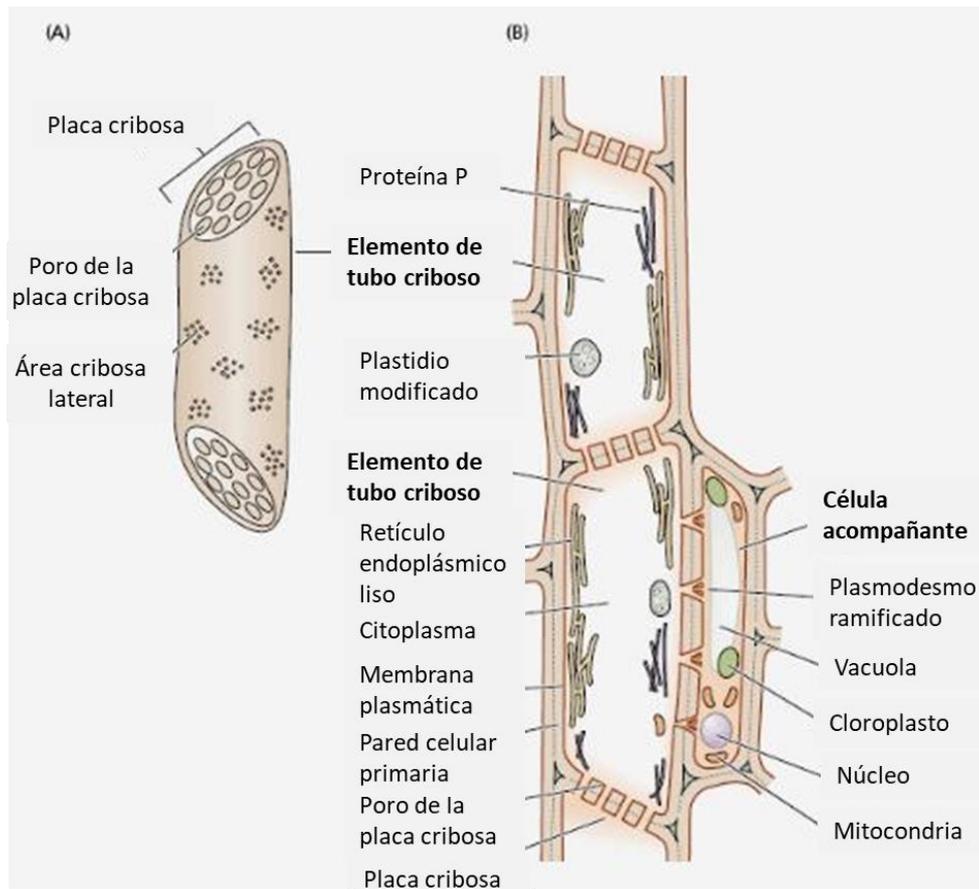
Los elementos de conducción del floema son los tubos cribosos, compuestos por células individuales llamadas elementos de tubo criboso acomodadas en serie longitudinalmente. Los elementos de tubo criboso son las células más especializadas del floema. Se les distingue por ser alargadas y enucleadas, cuyos protoplastos han sido modificados ontogenéticamente para tener una actividad metabólica restringida. Se conectan con los elementos de tubo criboso contiguos por medio de áreas porosas (placas cribosas), creando un continuo simplástico a lo largo de todo el cuerpo de la planta (Cheadle y Whitford, 1941; Esau, 1950; Esau, 1977) (Figura 4).

Una placa cribosa es una pared celular, rica en poros cuyo tamaño puede modificarse por la deposición de calosa (Cheadle y Whitford, 1941; Esau, 1950). Los poros de las placas cribosas se forman a partir de plasmodesmos presentes en los tubos cribosos inmaduros. A través de estos plasmodesmos pasa el retículo endoplásmico y un desmotúbulo. Antes de que el protoplasto sufra ningún cambio, se sintetiza calosa alrededor de cada plasmodesmo, excepto en la región de la lámina media. Cuando el núcleo comienza a degenerar, los plasmodesmos que se encuentran en las paredes que se convertirán en la futura placa cribosa aumentan de tamaño. Una vez que alcanzan su diámetro final, el retículo endoplásmico que cruzaba el canal y el desmotúbulo se remueven; a partir de este momento, el tubo está abierto y los contenidos de los tubos cribosos forman un continuo con las células vecinas (Esau, 1977).

Los elementos de tubo criboso son incapaces de llevar a cabo los procesos metabólicos que caracterizan a la mayoría de las células (Hammes, 2016). Sin embargo, forman un complejo con una o más células acompañantes. Las células acompañantes y los elementos de tubo criboso tienen un mismo origen ontogenético pues ambas provienen de una célula madre del protofloema la cual sufrió dos divisiones asimétricas. En la primera se originan dos células y, la de menor tamaño se convertirá en una célula acompañante. La más grande, pasará por otra división asimétrica y, nuevamente, la célula más pequeña se convertirá en otra célula acompañante. La célula de mayor tamaño es un elemento de tubo criboso del protofloema que se dividirá simétricamente para dar origen a dos elementos del tubo criboso (Eleftheriou, 1985).

Las células acompañantes son células parenquimáticas con cierto grado de especialización que están asociadas funcionalmente con los elementos de tubo criboso; se encuentran altamente comunicadas por medio de plasmodesmos comúnmente ramificados en la porción correspondiente a la célula acompañante. Sus protoplastos son metabólicamente activos, y su núcleo y nucléolo son relativamente grandes. Presentan plastidios (generalmente diferenciados en cloroplastos), numerosas mitocondrias, retículo endoplásmico y abundantes ribosomas. Es común que sus paredes celulares tengan la ultraestructura de células secretoras, con ondulaciones que aumentan su superficie y facilitan el transporte de solutos a corta distancia (Esau, 1977) (Figura 4).

El tercer componente del floema son células parenquimáticas. Éstas son importantes en el cargado de solutos a los elementos de tubo criboso. Comúnmente su pared celular presenta modificaciones similares a las observadas en las células de transferencia. En algunos casos también provienen de las mismas células a partir de las cuales se diferenciaron los elementos de tubo criboso (Esau, 1977).

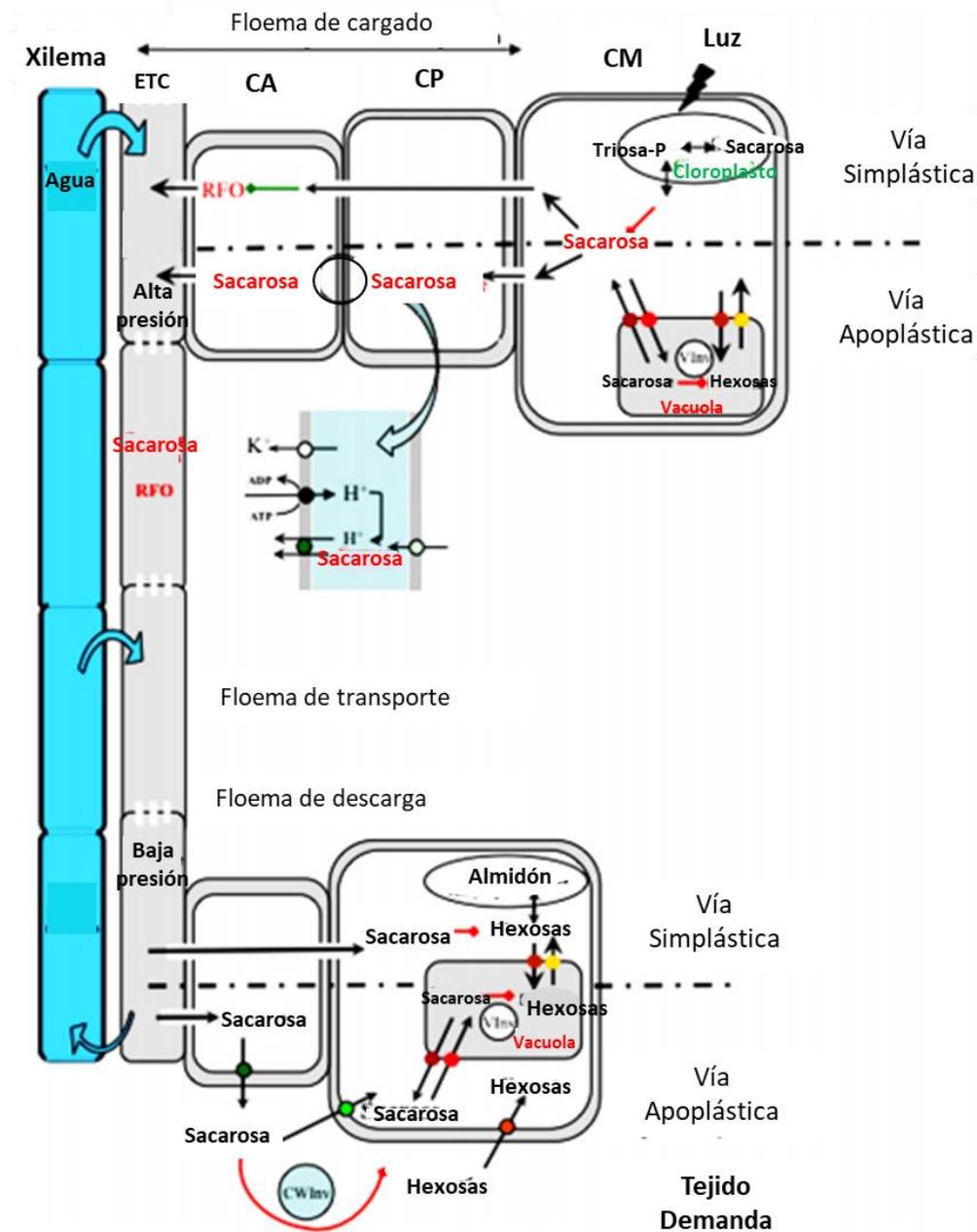


**Figura 4.** Esquema de elementos de tubo criboso maduros A: vista externa de un elemento de tubo criboso. B: sección longitudinal, mostrando dos elementos de tubo criboso, unidos formando un tubo criboso. Cada elemento de tubo criboso está asociado con una o más células acompañantes. Modificado de Taiz y Zeiger (2010).

El cargado del floema se da en las venas menores de las hojas. Este proceso puede llevarse a cabo de tres maneras distintas: en forma activa, mediado por transportadores de membrana, cuya actividad es dirigida por el flujo de protones; o de manera pasiva, mecanismo en el que las moléculas se mueven por difusión facilitada. De este último existen dos variantes: una en la que el transporte se lleva a cabo de forma pasiva (dependiente de las diferencias en la concentración), y otra, llamada de atrapamiento de polímero en el cual, los azúcares son cargados a células acompañantes especializadas, llamadas células intermediarias y son convertidos a grandes oligosacáridos de rafinosa y estaquiosa; estas moléculas son más grandes que la sacarosa y no pueden difundir nuevamente al mesófilo a través de los plasmodesmos (Rennie y Turgeon, 2009; Lucas *et al.*, 2013). Las especies que llevan a cabo un cargado activo del floema tienden a tener concentraciones más altas de azúcares en sus haces vasculares y se encuentra representado en monocotiledóneas y plantas de crecimiento

herbáceo, mientras que aquellas con un cargado pasivo generalmente tienen menores concentraciones de azúcares y son de crecimiento arbóreo (Davidson *et al.*, 2011, Jensen *et al.*, 2013; Lucas *et al.*, 2013).

Una vez que los azúcares se encuentran cargados en el floema, éstos deben distribuirse hacia los órganos no fotosintéticos de la planta. La hipótesis más aceptada para explicar el transporte de fotosintatos fue propuesta en 1930 por Ernst Münch. De acuerdo con ella, el transporte a lo largo del floema es el producto de las diferencias osmóticas generadas entre la presión de los tejidos fuente y los tejidos demanda, sin que haya requerimiento de energía (Knoblauch *et al.*, 2016). Las diferencias osmóticas entre el elemento de tubo criboso y las células circundantes dependen de los potenciales osmóticos en cada extremo del sistema del floema. Estas diferencias son consecuencia del metabolismo de carbohidratos en los tejidos que circundan el floema, así como de la actividad de transportadores, bombas y canales en las membranas de las mismas. De acuerdo con este mecanismo de flujo de nutrientes, el floema puede dividirse en tres zonas funcionales: la primera también conocida como floema de cargado, es donde los fotoasimilados producidos en el mesófilo de las hojas, se cargan en las venas menores en el complejo de elemento de tubo criboso-célula acompañante; la segunda, denominada floema de transporte, comprende al localizado en las venas mayores, peciolo, tallos y raíces hasta los órganos demanda. Finalmente, el floema de descarga, es el sitio en donde los fotoasimilados son liberados, y se localiza en tejidos en crecimiento o especializados en la síntesis y almacenamiento de sustancias de reserva (van Bell y Hafke, 2011) (Figura 5). Sin embargo, debe considerarse que la descarga del floema no se da exclusivamente en órganos lejanos al sitio de carga, sino que a lo largo del floema existe una continuidad simplástica entre las células acompañantes y el elemento de tubo criboso (Ayre *et al.*, 2003).



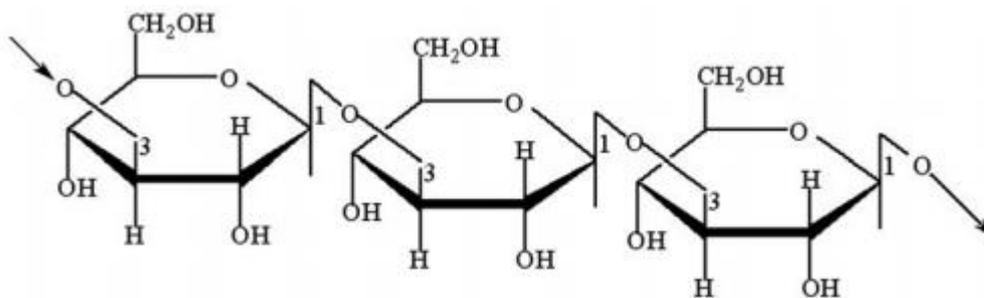
**Figura 5.** Transporte a través del floema desde órganos fuente a órganos demanda. La sacarosa se exporta desde las células del mesófilo (CM) en las hojas, y alcanza los elementos de tubo criboso a través de plasmodesmos o es convertida a moléculas más grandes como los oligosacáridos de rafinosa (RFO) en las células acompañantes (CA). Al cargarse los azúcares en el elemento de tubo criboso se genera una alta presión hidrostática y se atrae agua del xilema. La sacarosa y RFOs se transportan a lo largo del tubo criboso hasta los órganos demanda, donde la presión hidrostática es menor, y se descargan vía simplástica o apoplástica. La sacarosa en el tejido demanda es metabolizada (tejidos en crecimiento), almacenada como almidón, o transportada a la vacuola y convertida a hexosas por invertasas vacuolares (VInv). CA: célula acompañante; CP: célula parenquimática; CM: célula del mesófilo; ETC: elemento de tubo criboso; RFO: oligosacáridos de rafinosa ; CWInv: invertasa de pared celular; VInv: invertasa vacuolar. Modificado de Lemoine *et al.*, 2013.

La conductividad del floema, es decir la capacidad de un fluido de moverse a lo largo de este tejido (Hammes, 2016), está regulada por varios factores. Uno de ellos es la presencia de organelos. Se estima que mitocondrias y plastidios ocupan 30% en *Arabidopsis thaliana* y 35% en *Nicotiana tabacum* del lumen celular del elemento de tubo criboso. Si bien se localizan en la zona cercana a la membrana celular, su presencia reduce el espacio por el cual se puede dar el flujo (Froelich *et al.*, 2011). Otro elemento muy importante es el diámetro de las placas cribosas y el de los poros. La placa cribosa es un conjunto de poros individuales en paralelo, y se estima que el 50% de su superficie está compuesta por poros, cuyo tamaño y distribución pueden ser muy variables entre especies (Jensen *et al.*, 2012). Generalmente, el radio del elemento de tubo criboso es de 10  $\mu\text{m}$ , mientras que el de los poros es de  $\approx 1 \mu\text{m}$ . Sin embargo, puede haber grandes diferencias en el diámetro de los poros aún dentro de una misma placa cribosa (Jensen *et al.*, 2012). El modelado del flujo a través del elemento de tubo criboso indica que la velocidad es mayor cerca de la placa. Sin embargo, el flujo a través del elemento de tubo criboso se afecta por una resistencia hidráulica generada por la pared celular de la placa cribosa y del lumen celular (Jensen *et al.*, 2012). La posición de los poros no juega un papel determinante en la resistencia hidráulica (Jensen *et al.*, 2012); pero se ha reportado que cambios anatómicos como incrementos en la inclinación de las placas cribosas y formación de placas compuestas, aumentan la conductividad del floema (Knoblauch *et al.*, 2016). Sin embargo, el aumento en el diámetro de los poros es probablemente la forma más efectiva para compensar la resistencia que la placa cribosa genera al flujo (Knoblauch y Peters, 2010).

#### 1.4 Calosa

La calosa es un  $\beta$ -(1,3)-glucano con ramificaciones (1,6) sintetizado por embriofitas, en las cuales cumple diversas funciones en procesos relacionados con la fertilidad y división celular, al mismo tiempo que se usa ampliamente para reforzar estructuras (Ellinger y Voigt, 2014). Se sintetiza en paredes especializadas, o etapas particulares del desarrollo, entre las que destacan: la formación de la placa celular durante la citocinesis (Hong *et al.*, 2001, Thiele *et al.*, 2009), el aislamiento de las tétradas de microsporas, y formación de la exina en el grano de polen (Dong *et al.*, 2005); así como el crecimiento del tubo polínico (Dong *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2010) y la formación de las placas cribosas en los elementos de vaso en el floema (Esau, 1978; Barrat *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2011). Además, este polímero es un agente aislante muy efectivo. En situaciones de estrés biótico o abiótico se deposita en la región de la pared celular adyacente a la membrana plasmática (Stone, 2009). Su deposición en las placas cribosas del

floema puede bloquear el flujo de savia (Furch *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2011). También se puede acumular en los plasmodesmos, donde contribuye a regular la comunicación celular (Botha *et al.*, 2000; Koh, 2012). La síntesis de calosa ante distintos tipos de estrés está muy extendida entre las plantas, y se ha reportado en respuesta a salinidad (Sun *et al.*, 2004), daño mecánico (Nakashima *et al.*, 2003), temperaturas elevadas (Furch *et al.*, 2007), exposición a metales pesados (Peterson y Rauser, 1979; Sivaguru *et al.*, 2000) y a la presencia de patógenos (Hao *et al.*, 2008; Luna *et al.*, 2011).



**Figura 6.** Estructura del  $\beta$ -(1,3)-glucano (calosa). Tomado de Chen y Kim (2009).

Este polímero es sintetizado por la enzima calosa sintasa, que utiliza como sustrato UDP-glucosa, y es la subunidad catalítica de un complejo enzimático que se encuentra asociado a la membrana plasmática. Otros componentes de este complejo son la sacarosa sintasa, que provee de UDP-glucosa a la UDP-glucosa transferasa (UGT1), que a su vez es responsable de transferir la UDP-glucosa a la calosa sintasa. La proteína Rop1 (Rho like-protein) también se ha identificado como parte de este complejo, ésta interactúa con UGT1 y posiblemente participa en su regulación (Hong *et al.*, 2001). Se ha reportado que este complejo se activa por  $\text{Ca}^{2+}$  (Aidemark *et al.*, 2009).

La calosa sintasa está codificada por una familia de genes, que fue descrita simultáneamente por dos grupos, por lo que aún conserva dos anotaciones distintas *Glucan Synthase Like* (1-12) y *Callose synthase* (1-12) (Verma y Hong, 2001). Se ha propuesto que podría haber redundancia funcional entre los miembros de la familia (Tabla 1). Sin embargo, hasta la fecha, la calosa sintasa 7 (CalS7/ GSL7) se ha identificado como responsable de la deposición de calosa en el floema (Barrat *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2011).

**Tabla 1.** Resumen de la función biológica de las distintas calosas sintasas de acuerdo a la notación de Richmond y Summerville, 2000<sup>1</sup> y Verma y Hong 2001<sup>2</sup>. Tomado de Ellinger y Voigt, 2014.

	<b>GSL<sup>1</sup></b>	<b>CaS<sup>2</sup></b>	<b>Función Biológica</b>
<b>Fertilidad y división celular</b>	GSL1	CaS11	Desarrollo del polen y fertilidad
	GSL2	CaS5	Etapas tardías del desarrollo del grano de polen y tubo polínico
	GSL6	CaS1	Deposición de calosa durante la formación de la placa celular
	GSL8	CaS10	Desarrollo del gametofito masculino y crecimiento de la planta, entrada de las microsporas a mitosis, síntesis de calosa durante la formación de la placa cribosa, formación de patrones de estomas y deposición en los plasmodesmos.
	GSL10	CaS9	Desarrollo del gametofito masculino y crecimiento de la planta. Junto con GSL8, entrada de las microsporas a mitosis.
<b>Refuerzo estructural</b>	GSL5	CaS12	Síntesis de calosa en heridas y papilas en respuesta a patógenos fúngicos. Formación de exina y patrones de la pared del grano de polen.
	GSL7	CaS7	Deposición de calosa en el floema.
	GSL12	CaS3	Deposición de calosa en plasmodesmos.
<b>Función desconocida</b>	GSL3	CaS2	Función desconocida
	GSL4	CaS8	Función desconocida
	GSL9	CaS4	Función desconocida
	GSL1	CaS2	Función desconocida

## 1.5 Modelo de estudio

Generalmente las plantas producen un número elevado de frutos y óvulos, lo que les permite maximizar las posibilidades reproductivas. Sin embargo, condiciones de desarrollo adversas, inevitablemente reducen el número de frutos y óvulos que se desarrollan exitosamente, pues la demanda nutricional de la reproducción excede la capacidad del gineceo o de la planta para satisfacer la demanda energética de todos los óvulos (Lee y Bazzaz, 1986; Nakamura 1986; Sun *et al.*, 2004). Una respuesta general de las plantas a condiciones ambientales desfavorables es suspender el desarrollo de gametofitos, embriones y granos de polen, así como promover la abscisión de flores y frutos jóvenes (Stephenson 1981; Sun *et al.*, 2004). De allí que el fenotipo de aborción dependa de la intensidad del estrés y del momento del desarrollo en que se experimentó (Sun *et al.*, 2004).

La concentración de azúcares es uno de los factores que regulan la aborción (Schussler y Westgate, 1995), y al aumentar la capacidad enzimática de los órganos de demanda para degradar la sacarosa, se puede modificar su distribución de fotosintatos e incrementar el número de óvulos que llegarán a formar semillas maduras (Xu *et al.*, 2012).

La aborción es un mecanismo muy efectivo para ajustar el número de semillas que podrán desarrollarse con los recursos disponibles. De manera normal existe una etapa límite para el fenómeno de la aborción de semillas, a partir de la cual todas aquellas semillas que sobrevivieron tienen una alta probabilidad de formarse exitosamente. En leguminosas se le denomina como la última etapa de aborción de semillas, y coincide con el momento en el que la vaina alcanza su tamaño máximo y se inicia el llenado de la semilla (Pigeaire 1986). Si pasado este punto del desarrollo (entre los días 15 y 25 después de la anthesis), los frutos de *P. vulgaris* se remueven de la planta, algunas semillas podrán continuar su desarrollo, madurar y ser viables, cosa que no ocurre si los frutos se remueven antes (Fountain *et al.*, 1989). En los frutos que se cortan de la planta, el desarrollo de las semillas depende totalmente de los materiales previamente almacenados en la vaina, los cuales al degradarse generan recursos que son usados por las semillas en desarrollo. Sin embargo, éstos no son suficientes para satisfacer las necesidades de todas las semillas y el reciclaje de materiales acumulados en la vaina se complementa con una distribución no equitativa de los nutrientes generados. Algunas semillas reciben lo suficiente y continúan con un desarrollo aparentemente normal, mientras que otras dejan de recibirlos y eventualmente mueren (Coello y Martínez-Barajas, 2014 y 2016).

El objetivo de este trabajo se enfocó en entender el mecanismo que regula la distribución de nutrientes entre las semillas de frutos de *P. vulgaris* cuándo éstos se cortan de la planta 20

DDA. Una de las principales diferencias entre las semillas que continúan con su desarrollo en los frutos cortados de la planta y las que no, son los niveles de sacarosa. En los embriones de las primeras, la concentración de sacarosa es similar a las que se desarrollan en condiciones normales, mientras que en las segundas los valores son muy cercanos a cero (Coello y Martínez-Barajas 2016). Dado que la sacarosa se transporta a través del floema, en este trabajo analizamos si este tejido participa en la regulación de su flujo entre las semillas de los frutos que se cortan de la planta. El análisis se centró en evaluar si la acumulación de calosa podría disminuir el tamaño de los poros en las placas cribosas del floema para reducir el flujo de nutrientes a través del funículo a algunas semillas e incrementar las posibilidades de desarrollo de otras.



**Figura 7.** Frutos de *P. vulgaris* a los 23 y 25 DDA, recién removidas de la planta (23 DDA y 25 DDA) y removidas al día 20 DDA y mantenidas en obscuridad por 3 (20+3 R) y 5 (20+5 R) días. Se aprecia el desarrollo diferencial de las semillas. N: semillas desarrolladas normalmente; P: semillas cuyo crecimiento se detuvo.

## **2. HIPÓTESIS**

En frutos de frijol sometidos a un déficit severo de nutrientes se favorece la deposición de calosa en las placas cribosas del floema de algunos funículos, lo que impide la distribución equitativa de nutrientes entre las semillas.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo General**

Analizar si en frutos de *P. vulgaris* sometidos a un estrés nutricional severo, la acumulación de calosa en los haces vasculares del funículo corresponde con la distribución de sacarosa entre las semillas.

### **3.2 Objetivos particulares**

- Evaluar la concentración de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) y la distribución de sacarosa ( $U-^{14}C$ ) en pericarpo, funículo, cubierta seminal y embriones de frutos desarrollados normalmente y en los removidos de la planta a 20 DDA.
- Identificar el sitio en donde se interrumpe el flujo de sacarosa a las semillas que no se desarrollan en los frutos cortados de la planta a 20 DDA.
- Hacer un análisis estructural del floema de los funículos, evaluar la acumulación de calosa y establecer si la deposición de calosa se correlaciona positivamente con la concentración de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) y la distribución de sacarosa ( $U-^{14}C$ ).
- Analizar los cambios en la expresión genética del funículo por medio de un microarreglo heterólogo e identificar procesos que pudieran estar relacionados directa o indirectamente con el control del flujo de sacarosa por esta estructura.

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Material Biológico

Semillas de *P. vulgaris*, variedad V8025, (crecimiento arbustivo, tipo I) se lavaron con etanol (96%) y después de enjuagarlas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% (v/v) durante 12 min. Posteriormente se lavaron con agua desionizada y se germinaron en papel húmedo a temperatura ambiente (18-25°C). Una vez germinadas se les trasplantó a recipientes con agrolita (350 cm<sup>3</sup>) y se regaron cada tercer día con solución de Hoagland (3mM KNO<sub>3</sub>, 2mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.004 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.023mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.0004 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.00015 mM CuSO<sub>4</sub>, 0.00005 mM H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> y 5 g L<sup>-1</sup> de FeEDTA y 0.5 mmol L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Las plantas se mantuvieron en un invernadero en donde las temperaturas promedio fueron 22-24°C en el día y 20°C durante la noche. Las flores se marcaron el día de la antesis y la edad de los frutos se estableció por el número de días transcurridos después de ese evento (DDA). La colecta de los frutos a partir de los 20 DDA se realizó según el siguiente esquema:

- Vainas control. Removidas 20, 23 y 25 DDA.
- Vainas cortadas el día 20 DDA y almacenadas en obscuridad a temperatura ambiente por 3 y 5 días (20+3 y 20+5 DDA, respectivamente). En este caso, las semillas se separaron de acuerdo con su tamaño: normales (N, aquellas cuyo crecimiento continuó y su tamaño era similar al que tenían las que siguieron unidas a la planta) y pequeñas (P, aquellas cuyo desarrollo se interrumpió y su tamaño era mucho menor con respecto a las semillas normales).

### 4.2 Extracción y separación de proteína

En cada una de las etapas, los embriones se disectaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. Para el análisis se utilizaron tres muestras de cada una de las etapas. Se pesaron cantidades similares de tejido (100-200 mg) y se maceraron por separado con 1 mL de buffer de extracción (50 mM Tricina pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM NaF, 10 % glicerol, 0.02 % Brij 35, 1 mM DTT, 1 mM benzamidina, 0.1 mM PMSF). Los extractos se centrifugaron durante 10 min a 12,000 rpm y se separó el sobrenadante. Éste se diluyó en una proporción 1:4 con agua desionizada (25 µL muestra, 75 µL agua), se agregaron 200 µL de reactivo de Bradford y se cuantificó su absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan FC). Las lecturas se extrapolaron con los resultados de una curva patrón realizada con cantidades conocidas de albúmina de suero bovino. Por último, se calcularon los

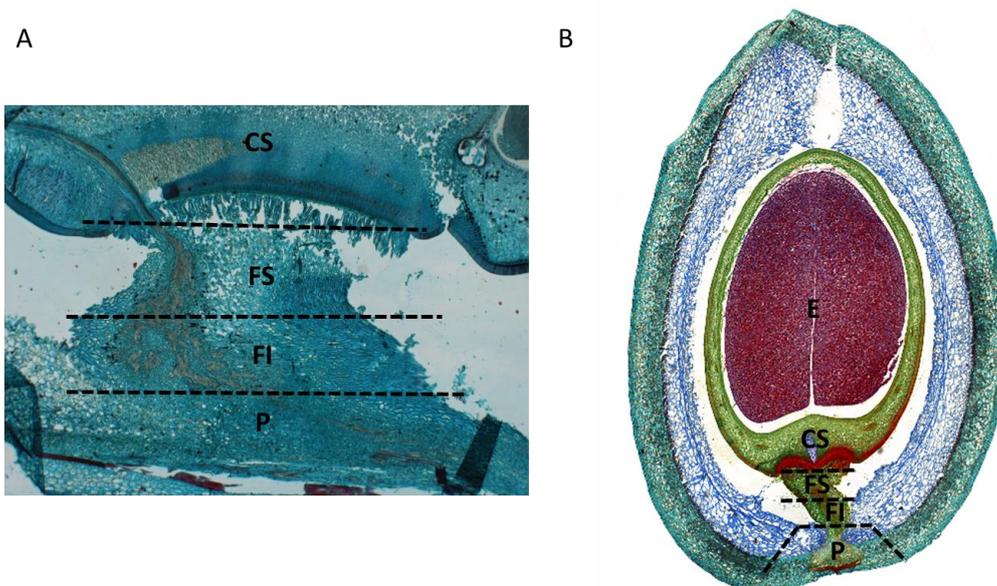
promedios y desviaciones estándar y la cantidad de proteína se expresó por gramo de peso fresco. Se tomaron los volúmenes necesarios para tener 100 µg de proteína de cada extracto y se llevaron todas a un volumen de 50 µL con agua. Se agregaron 25 µL de buffer de muestra con SDS 3x. Finalmente, las muestras se calentaron durante 15 min a 70°C y se tomaron 10 µL de cada muestra para cargar un gel de poliacrilamida desnaturalizante (Tabla 2). La corrida se hizo a 100 V usando un amortiguador compuesto de 25 mM Tris-base, 0.192 mM Glicina y 0.1% SDS. El gel se tiñó con una solución 0.125% (p/v) Azul de Coomassie, 50% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético; y se destiñó en una solución 10% (v/v) metanol, 7% (v/v) ácido acético. El gel se digitalizó en el sistema ChemiDoc de BioRad con el software Image Lab.

**Tabla 2.** Composición de geles de poliacrilamida para electroforesis desnaturalizante

	Gel separador 10%	Gel apilador
Acilamida 30%: Bis acilamida 0.8%	3.34 mL	1 mL
Amortiguador separador (4X) pH 8.8	2.5 mL	-
Amortiguador apilador (4X) pH 6.8	-	1.25 mL
SDS 20%	50 µL	25 µL
H <sub>2</sub> O	4.16 mL	2.75 mL
TEMED	5 µL	3 µL
Persulfato de amonio 10%	50 µL	20 µL

#### 4.3 Distribución de Sacarosa [U-<sup>14</sup>C] en Frutos

Frutos de 23 DDA que se removieron de la planta tres días antes y frutos de 23 DDA que se cortaron de la planta al momento de realizar el experimento se sumergieron en un recipiente con agua y con una navaja filosa se les removió el extremo cercano al pedicelo (aproximadamente 0.5 cm). Después se colocaron de manera vertical, con el corte sumergido en 10 mL de una solución 10 mM de sacarosa adicionada con sacarosa [U-<sup>14</sup>C] (actividad específica: 2µCi/mM) por dos días. Pasado ese tiempo, se disectaron y se obtuvieron secciones de pericarpio, funículo inferior, funículo superior, cubierta seminal y embrión (Figura 8), las cuales se congelaron en N líquido y se almacenaron a -70°C.



**Figura 8.** Secciones de tejido utilizadas para la cuantificación de sacarosa [ $U-^{14}C$ ]. A: corte longitudinal del pericarpo, funículo y parte de la semilla. B: corte transversal de fruto y semilla. Las líneas punteadas indican los sitios donde se realizaron los cortes. CS: cubierta seminal; E: embrión; FI: funículo inferior; FS: funículo superior; P: pericarpo

Aproximadamente 20 mg de cada una de las secciones de tejido (excepto los funículos para los cuales se usaron aproximadamente 5 mg), se molieron con 500  $\mu$ L de etanol al 80%. El extracto se centrifugó 10 min a 10,000 rpm. Se tomaron 100  $\mu$ L de sobrenadante, se mezclaron con 3 mL de líquido de centelleo (Ultima Gold XR, Perkin Elmer) y la reactividad incorporada en esta fracción que corresponde a azúcares y metabolitos solubles en etanol se midió en un contador de centelleo Beckman LS 6500.

La incorporación en almidón y proteínas se cuantificó únicamente en las muestras de cotiledones. Para la cuantificación de la sacarosa [ $U-^{14}C$ ] incorporada en almidón, el material insoluble en etanol al 80% se resuspendió en 250  $\mu$ L de agua y se incubó 4h a 80°C. Una vez que éste alcanzó la temperatura ambiente, se agregaron 250  $\mu$ L de una solución 0.2 M de acetato de sodio pH 4.5 con 36 unidades de amiloglucosidasa y se incubó durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente las muestras se resuspendieron y centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min. Se separaron 250  $\mu$ L de sobrenadante y se mezclaron en viales con 3 mL de líquido de centelleo y se cuantificó la marca incorporada.

Para cuantificar la incorporación de sacarosa [ $U-^{14}C$ ] en proteína, la pastilla restante después de separar la fracción correspondiente a almidón, se resuspendió en 250  $\mu$ L de una solución 50

mM de HEPES pH 8 con 100 unidades pronasa (5.1 U/mg) y se incubó durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 min, y el sobrenadante se mezcló con 3 mL de líquido de centelleo para su cuantificación. Las lecturas obtenidas en cada uno de los casos se reportaron como cuentas por minuto (cpm) por gramo de peso fresco de tejido.

Se analizaron tres repeticiones de cada tejido. Para los frutos removidos a 23 DDA, una repetición correspondió a un fruto. Para los que se cortaron con anterioridad (20+3), las muestras estuvieron formadas por grupos de tres frutos, ya que en éstas el material obtenido se separó en semillas normales y pequeñas. Para el análisis de los cotiledones se hicieron seis repeticiones.

#### **4.4 Cuantificación de Azúcares**

Se obtuvieron secciones de pericarpo, funículo, cubierta seminal y embrión de frutos de 23 DDA, 25 DDA, así como de frutos de 20+3 DDA y 20+5 DDA (en estos últimos casos se hizo la distinción entre semillas normales y pequeñas, y se tomaron las muestras correspondientes). El material seleccionado se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C. Para el análisis el tejido se pesó (aproximadamente 70 mg embrión, 40 mg pericarpo, 50 mg cubierta, 10 mg funículos), y se homogenizó en un mortero con 500 µL de etanol al 80%. Los extractos fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se separaron, y para eliminar pigmentos se les agregó una pizca de carbón activado. Después de mezclar, se centrifugaron nuevamente por 5 min a la misma velocidad. Se probaron distintas diluciones del sobrenadante, las cuales se mezclaron con 200 µL de una solución de reacción (HEPES 50 mM (pH 7.4), KCl 50 mM, ATP 1mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, NAD<sup>+</sup> 0.5 mM, 0.25 U de hexocinasa), se agitó y se hizo la lectura inicial de la absorbancia a 340 nm. Posteriormente se agregaron 0.25 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) de *Leuconostoc mesenteroides* por pozo, seguido de 0.25 U de fosfoglucoisomerasa (PGI) de levadura y 0.5 U de invertasa. En todos los casos, las enzimas se diluyeron en 10 µL HEPES (pH 7.4) 50 mM. Después de agregar cada una de ellas, se agitó durante 5 seg, se incubó 30 min (exceptuando la hexocinasa que estuvo presente desde el inicio) y se midió la absorbancia a 340 nm. Los incrementos de los valores de las lecturas obtenidos después de agregar cada una de las enzimas, se interpolaron en curvas patrón de glucosa, fructosa y sacarosa. Los resultados se expresaron como µmoles por gramo de peso fresco. Se hicieron tres extracciones independientes y los resultados que se presentan corresponden al promedio y error estándar para cada sección.

#### 4.5 Inmunolocalización de calosa

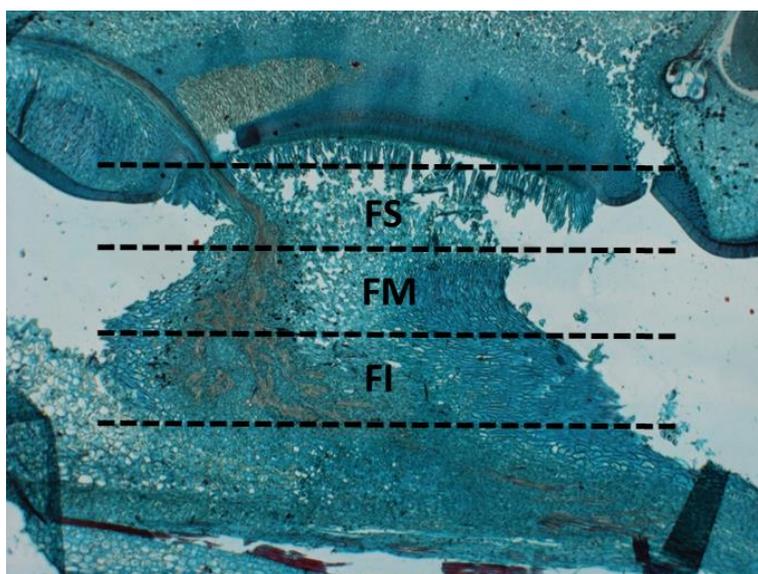
Funículos correspondientes a semillas de 23 DDA, 20+3N, 20+3P, 25 DDA, 20+5 N y 20+5 P, se fijaron en formaldehído 4% por 12 h y permanecieron en refrigeración dos días. Se realizaron cinco lavados de 5 min cada uno con buffer PBS y posteriormente se deshidrataron gradualmente en etanol (30, 50, 70, 85, 96, 100, 100%) permaneciendo 2h en cada concentración. La solución se cambió cada hora, exceptuando el primer cambio en etanol al 100%, en el cual permanecieron toda la noche. Una vez deshidratado, el tejido se incubó en soluciones de etanol : Slide Brite (3:1, 1:1 y 1:3) pasando 40 min en cada caso, seguido de 35 min en Slide Brite 100%. Posteriormente el Slide Brite fue sustituido gradualmente por parafina, para lo cual las muestras se incubaron en soluciones de parafina - Slide Brite en una estufa a 60°C al 25% de parafina por 2h, 50% parafina durante toda la noche, 75% parafina 2h, y 100% parafina por 48h. En este último caso, la parafina se cambió a las 12h. Los pasos transcurridos desde la fijación hasta la inclusión en Slide Brite se realizaron en un desecador de vacío, exceptuando la incubación en etanol al 100% durante toda la noche en el proceso de deshidratación.

El tejido se montó en bloques de parafina y se seccionó con un microtomo rotatorio en cortes de 5 µm, extendidos en un baño a 40° C y montados en portaobjetos cargados.

Los cortes se desparafinaron durante toda la noche en una estufa a 60° C, y se rehidrataron gradualmente (xilol, xilol, xilol: etanol absoluto, etanol 96%, 85%, 70%, 50%, 30%, agua) pasando 6 min en la primera incubación en xilol y 3 min en cada uno de los cambios posteriores, y se mantuvieron en buffer PBS en refrigeración hasta el momento de realizar la inmunolocalización.

Los cortes se rodearon con Pap Pen sobre el portaobjetos y se cubrieron con solución de bloqueo (suero fetal bovino (SFB) 10% en buffer PBS) durante 4h en cámara húmeda. Se agregó el anticuerpo para β-1-3 glucano en una concentración 1:500 en SFB 10% y se incubó toda la noche a 4°C. Se realizaron cinco lavados de 3 min cada uno con buffer PBS, y se cubrieron con el anticuerpo secundario Alexa 568 1:200 en SFB 10%. Se incubó durante 4h en oscuridad. Posteriormente se realizaron cinco lavados de 3 min cada uno con buffer PBS y se montaron para su observación con medio de montaje para fluorescencia Fluoroshield con 1, 4-Diazabicyclo[2.2.2]octano.

Las preparaciones se observaron utilizando un microscopio confocal Olympus FV1000 con una longitud de onda de excitación de 559 nm y 603 nm de emisión. Las placas cribosas fueron cuantificadas a lo largo del funículo como engrosadas o no engrosadas acorde al grosor observado de la deposición de calosa, se consideraron tres secciones: funículo inferior (cercano al pericarpo), medio, y superior (cercano a la semilla) (Figura 9). Las placas de la sección inferior fueron fotografiadas y se midió el diámetro y el grosor de 30 placas por tipo de funículo utilizando el software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).



**Figura 9.** Corte longitudinal del funículo mostrando las secciones utilizadas para el conteo de placas cribosas engrosadas.

#### **4.6 Digestión de Citoplasma para Observación de Placas Cribosas en el Microscopio Electrónico De Barrido.**

Para la digestión de citoplasma y observación de placas cribosas, se siguió el protocolo de Mullendore *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Funículos correspondientes a semillas de 23, 20+3N, 20+3P, 25, 20+5 N y 20+5 P DDA se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y posteriormente se sumergieron en etanol absoluto previamente enfriado en N<sub>2</sub> líquido hasta que éste hubiera gelificado. Se almacenaron a -20°C en la solución de etanol durante toda la noche y posteriormente se les permitió alcanzar la temperatura ambiente. El etanol fue sustituido por agua desionizada en la cual el tejido fue incubado por 2 h. Después, cada funículo se cortó transversalmente con una navaja de rasurar (nueva para cada uno de los cortes) en tres

secciones: inferior (cercana al pericarpo), media y superior (cercana a la semilla). Cada grupo de secciones fue colocado en 500  $\mu$ L de una solución 0.1% proteinasa K (20 mg/ml) disuelta en Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), acetato de  $\text{Ca}^{2+}$  1.5 mM y 8 % Triton X-100. Se incubaron por 14 días en agitación a 350 rpm a 55°C, realizando un cambio de solución a los siete días. Terminada la incubación se retiró la mezcla de enzima y se hicieron dos lavados con etanol absoluto, después de lo cual, el material se enjuagó dos veces con agua desionizada. Posteriormente, los cortes se colocaron en 500  $\mu$ L de una solución con 13.5 U de amilasa disuelta en Tris-HCl 10 mM (pH 7.0) y se incubaron a 60°C por 24 h. Se realizaron dos enjuagues con agua desionizada y se deshidrataron en una serie gradual de etanol (30, 50, 70, 85, 96, 100, 100%) pasando 30 min en cada solución. Para su observación al microscopio electrónico de barrido (MEB) el tejido se deshidrató a punto crítico con  $\text{CO}_2$  y se recubrió con oro. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico JEOL JSM-5900 LV y JEOL JSM-5910, las fotografías obtenidas fueron analizadas utilizando el software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012). Para cada placa se midió el área total observada, el área total de flujo, lo cual se consideró como la suma de las áreas de todos los poros observados en la placa, y la distancia entre poros, es decir el grosor de la pared entre un poro y otro, para ésta última se tomaron diez medidas por área observada.

#### **4.7 Análisis de Microarreglos**

##### **4.7.1 Extracción de RNA**

Para la extracción de RNA se utilizó un kit “illustra RNAspin Mini Kit” (GE Healthcare Lifesciences). Se utilizaron 30 mg de funículos de semillas 20+3P y 20+3N previamente congelados en  $\text{N}_2$  líquido, los cuales se molieron en  $\text{N}_2$  líquido (procurando que el tejido nunca se descongelara). Se agregaron 350  $\mu$ L de solución de lisis, 3.5  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol y se mezcló para formar una suspensión uniforme. El lisado se centrifugó a 5000 *g* por un minuto y el sobrenadante se colocó en una columna RNAspin Mini Filtr en un tubo colector y se centrifugó a 11,000 *g* por un minuto. El filtrado se separó y se le agregaron 350  $\mu$ L de etanol 70%. Se mezcló en el vortex dos veces por 5 s, se cargó en la columna RNAspin Mini Column y se centrifugó a 8,000 *g* por 30s, después de lo cual la columna se transfirió a un nuevo tubo colector. Se le agregaron 350  $\mu$ L de buffer de desalado y se centrifugó a 11,000 *g* por 1 min para secar la membrana. El flujo se desechó y se colocó la columna en un nuevo tubo colector.

Se preparó la DNase I reaction mixture. Se agregaron 10  $\mu$ L de DNase I reconstituida a 90  $\mu$ L de DNase Reaction Buffer. Se mezcló suavemente y los 100  $\mu$ L resultantes se aplicaron en el centro de la membrana de sílica de la columna, y se incubó durante 20 min.

Posteriormente se procedió a lavar la columna. Para el primer lavado se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado que inactiva a la DNasa, y se centrifugó a 11,000  $g$  por un minuto. La columna se transfirió a un nuevo tubo colector y se le agregaron 600  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado II y se centrifugó a 11,000  $g$  por un minuto. El flujo se desechó y la columna se colocó nuevamente en el mismo tubo colector. A la columna se le agregaron 250  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado II y se centrifugó a 11,000  $g$  por dos minutos para secar la membrana completamente. La columna se transfirió a un tubo nuevo y el RNA se eluyó agregando 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y centrifugando a 11,000  $g$  por un minuto. Se cuantificó la cantidad de RNA en un nanodrop y su calidad se evaluó a partir de la integridad de los RNAs ribosomales observados en una electroforesis. Las muestras se prepararon mezclando 5  $\mu\text{L}$  de RNA con 3  $\mu\text{L}$  de buffer de carga y se analizaron en un gel de agarosa 1% (40 mL buffer TBE 1X, 0.4 g de agarosa, 2.5  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio). Una vez seguros de que la cantidad y la calidad del RNA extraído eran adecuadas, se llevó a la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en donde se usó para sintetizar cDNA, el cual se hibridó con un microarreglo que contiene el transcriptoma de *Arabidopsis thaliana*. Los datos se normalizaron y se analizaron estadísticamente para juzgar la significancia de las diferencias en la expresión génica entre ambos tejidos.

#### **4.7.2 Análisis de Datos**

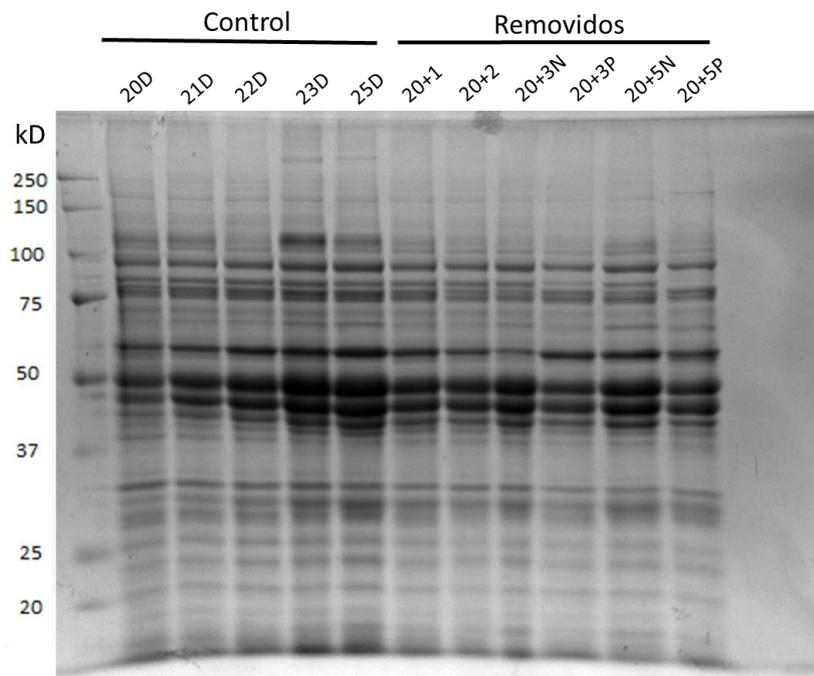
Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov> ; Huang *et al.*, 2009 a y b), el cual agrupa a los genes representados en el microarreglo por su importancia biológica y metabólica. Las funciones de los genes se corroboraron utilizando la base de datos *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR). Los genes de interés fueron seleccionados a partir de su relevancia en las rutas metabólicas (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) <http://www.genome.jp/kegg/>) en que participan las enzimas que codifican.

A su vez genes que se consideraron clave en la comprensión del modelo, como por ejemplo el de la calosa sintasa 7 y otros componentes de este complejo enzimático, se buscaron de manera individual en las listas arrojadas por el experimento de microarreglos para determinar si existía una regulación a nivel transcripcional de los mismos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Cuantificación y Separación de Proteína

A los 20 DDA los embriones de las semillas de frijol se encuentran en una etapa de acumulación masiva de sustancias de reserva. En la figura 10 se observa que en condiciones ideales, de los 20 a los 25 DDA la acumulación de proteínas se refleja en un aumento importante de la intensidad de ciertas bandas. Destacan aquellas entre los 37-50 KDa, y 75-150 KDa. Las semillas que continuaron su desarrollo en los frutos removidos, también presentan un incremento en la intensidad de algunas bandas (37-50 KDa), mostrando un patrón que guarda cierto parecido al que se observa en las semillas que se desarrollaron bajo condiciones normales. Por su parte, en las semillas que fueron incapaces de continuar su desarrollo en los frutos removidos, los cambios son menos apreciables.



**Figura 10.** Análisis por SDS-PAGE (10% acrilamida) de las proteínas presentes en extractos de embriones de frijol (13 µg de proteína por carril). Las proteínas de extractos de embriones que crecieron en condiciones normales de 20-25 DDA (D), se comparan con las de embriones que se desarrollaron en frutos que fueron removidos de la planta a 20 DDA (control). 20+1 a 20+5, corresponden al número de días transcurridos después de que frutos de 20 días se removieron de la planta. N y P indican semillas que continuaron o no su desarrollo en los frutos removidos, respectivamente.

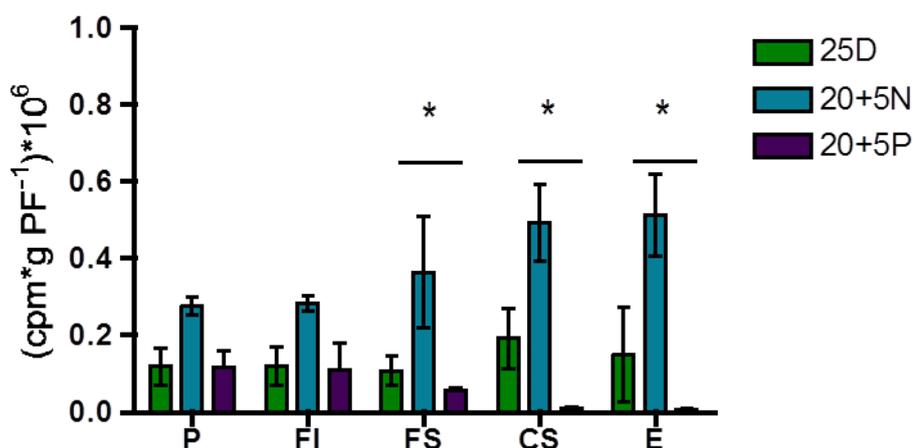
## 5.2 Distribución de sacarosa [ $U-^{14}C$ ] en frutos

En un experimento previo se comparó la distribución de sacarosa entre frutos de 23 DDA con la de frutos removidos 3 días antes de iniciar el experimento (20+3). Se observó que la sacarosa marcada no llegaba a la cubierta seminal de los embriones que no continuaban su desarrollo en los frutos cortados previamente (Coello y Martínez-Barajas, 2016). El experimento aquí realizado tuvo el propósito de identificar con precisión el sitio donde se interrumpe el flujo de sacarosa hacia las semillas que no se desarrollaron bajo esas condiciones.

Para tal efecto, frutos de 23 DDA y 20+3 se incubaron por 48 h en una solución con sacarosa [ $U-^{14}C$ ]. Pasado ese tiempo se obtuvieron extractos en etanol al 80% y la distribución de radiactividad se presenta en la figura 11.

Los niveles de radiactividad en las secciones correspondientes a los frutos que por 23 días se desarrollaron en condiciones normales, son muy similares en las secciones de pericarpo y funículo, pero se observa una tendencia a aumentar en cubierta seminal y embrión.

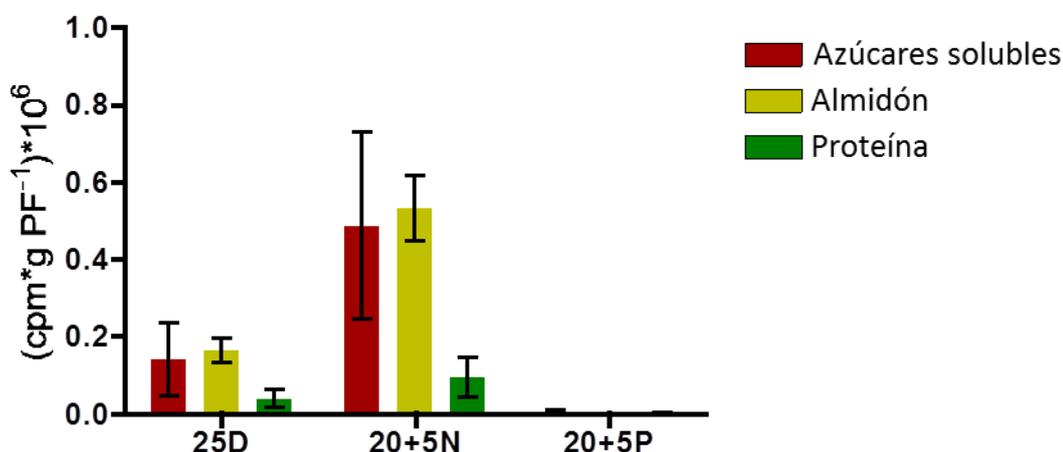
En el caso de los frutos removidos, los resultados indican el camino que seguiría la sacarosa si el suministro de nutrientes se restableciera después de 3 días de que fueron cortados. Se observó que en la sección del pericarpo por donde corren los haces vasculares que irrigan a todas las semillas (Esau, 1977) la cantidad de marca no presenta diferencias significativas entre las secciones correspondientes a semillas que continuaron su desarrollo y aquellas que no. Para identificar el punto donde se interrumpe el flujo de nutrientes, el funículo fue dividido en dos secciones (funículo superior, cercano a la semilla y funículo inferior, próximo a la vaina). En los funículos de las semillas que no se desarrollarán en los frutos removidos, se observa una reducción gradual en la cantidad de marca a medida que el tejido se aproxima a la semilla. Mientras que en aquellas que continuaron con el proceso la tendencia es contraria. Los resultados también muestran que la cubierta seminal y el embrión de las semillas pequeñas no reciben prácticamente nada de sacarosa [ $U-^{14}C$ ], mientras que en las semillas que continúan con su desarrollo, las cantidades en esos tejidos tienden a ser superiores a las detectadas en las semillas desarrolladas normalmente. El análisis de ANOVA y una posterior prueba de Tukey mostraron diferencias significativas entre la cantidad de marca radioactiva detectada en las secciones superiores de los funículos, cubierta seminal y embrión correspondientes a semillas 20+5N y 20+5P ( $P < 0.05$ ).



**Figura 11.** Distribución de marca en metabolitos solubles en etanol al 80% en extractos de pericarpio (P), funículo inferior (FI), funículo superior (FS), cubierta seminal (CS) y embrión (E) de frutos de 23 DDA desarrollados en condiciones normales o que fueron cortados de la planta 3 días antes e incubados por 48 h en una solución de sacarosa [U-<sup>14</sup>C]. Verde corresponde a los valores de las secciones de los frutos desarrollados en condiciones normales, azul a los embriones que continuaron con su desarrollo en los frutos removidos y violeta a semillas que no continuaron con su desarrollo bajo esas condiciones. Los valores corresponden al promedio de seis determinaciones para el pericarpio y tres para el resto de las secciones  $\pm$  EE. Los asteriscos indican promedios cuya diferencia es estadísticamente significativa.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la restricción de nutrientes sobre los procesos metabólicos que convierten a la sacarosa en sustancias de reserva, en los embriones también se midió la transformación de sacarosa [U-<sup>14</sup>C] en almidón y proteína. Los resultados se presentan en la figura 12. Como puede apreciarse, en las semillas control, la incorporación de marca en las fracciones correspondientes a azúcares solubles y almidón fue muy similar, y superior a la encontrada como proteína; observándose una relación almidón/proteína de 4.2, y de azúcares solubles/proteína de 3.6. Por su parte, las semillas que fueron capaces de continuar con su desarrollo en los frutos removidos, mostraron una alta incorporación de marca por gramo de peso fresco. Sin embargo, las cantidades presentes en las fracciones soluble e incorporada a almidón también fueron similares y superiores a la detectada en proteínas. Las relaciones almidón/proteína y azúcares solubles/proteína tuvieron valores de 5.6 y 5.1, respectivamente. Como ya se había mencionado anteriormente, es muy poca la

marca detectada en los embriones de las semillas pequeñas y toda la presente se encontró en la fracción correspondiente a azúcares solubles.



**Figura 12.** Síntesis de almidón y proteínas en embriones de frutos de 23 DDA desarrollados en condiciones normales (control) o en frutos que fueron cortados de la planta 3 días antes de ser incubados por 2 días en una solución de sacarosa [U- <sup>14</sup>C]. 25D corresponde a embriones control que fueron removidos 23DDA e incubados inmediatamente en la solución de sacarosa [U- <sup>14</sup>C], 20+5 N y 20+5 P corresponden a embriones que continuaron o no su desarrollo en los frutos que fueron removidos de la planta, respectivamente. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE, n=12.

### 5.3 Cuantificación de azúcares

Los datos del experimento de incorporación de sacarosa [U- <sup>14</sup>C] señalan que si el flujo de nutrientes que se interrumpe con la remoción de los frutos se reanudara, en el funículo de las semillas pequeñas hay un bloqueo que impide su paso. Para confirmar la validez de este análisis se midieron las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa en secciones de pericarpo, funículo, cubierta seminal y embriones de frutos desarrollados normalmente y removidos de la planta a 20 DDA. La concentración de sacarosa fue similar en todas las secciones de pericarpo analizadas, con excepción de las correspondientes a las semillas 20+3N en donde se apreció un incremento (Figura 13A). En el periodo de 23 a 25 DDA la concentración de glucosa disminuyó en el pericarpo de frutos control. En los frutos removidos no se observaron diferencias relacionadas con el desarrollo de las semillas y 5 días después de haber sido cortadas, presentaron valores más elevados a los observados en las vainas de los

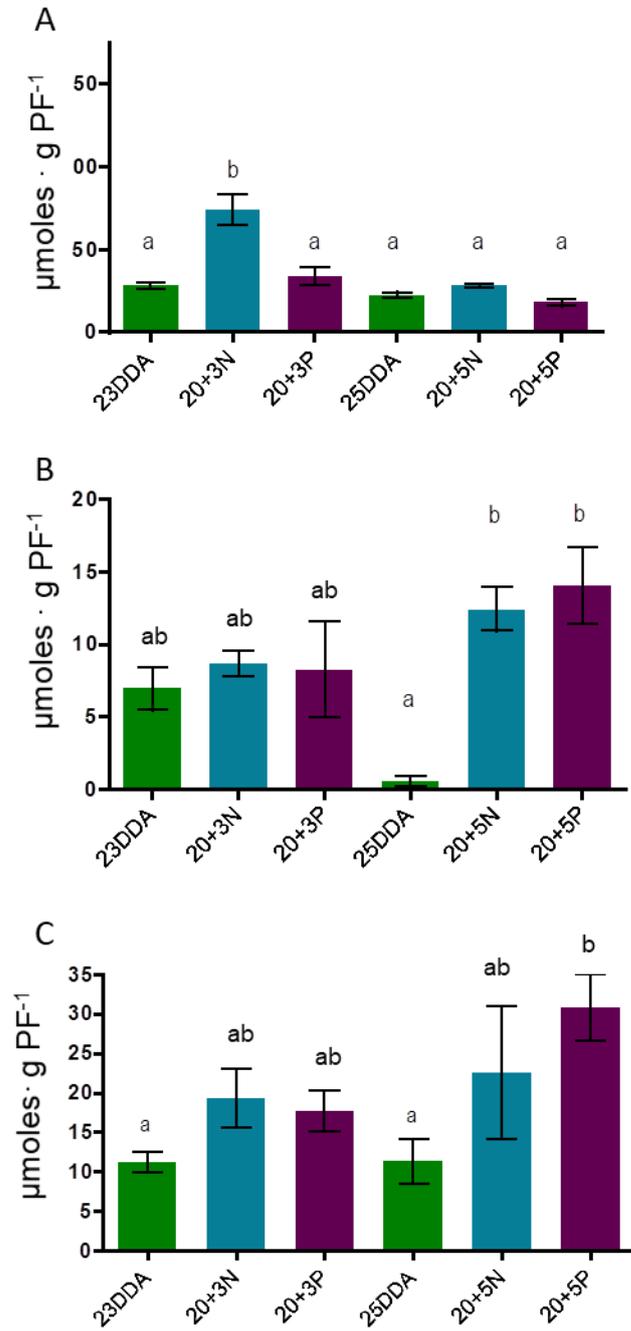
frutos control (Figura 13B). Los niveles de fructosa fueron similares en todas las secciones, aunque se aprecia una tendencia a incrementarse en las secciones correspondientes a las semillas que no se desarrollan en los frutos removidos (Figura 13C).

En los funículos, los niveles de sacarosa no presentan diferencias significativas a los 23 y 25 DDA. Sin embargo, se observa una disminución importante en los niveles de sacarosa de los de las semillas pequeñas 5 días después de la remoción (Figura 14A). Los niveles de glucosa (Figura 14B) y fructosa (Figura 14C) fueron bajos en todos los casos. No se apreciaron cambios atribuibles a la falta de nutrientes, aunque si se observa un consumo preferencial de glucosa.

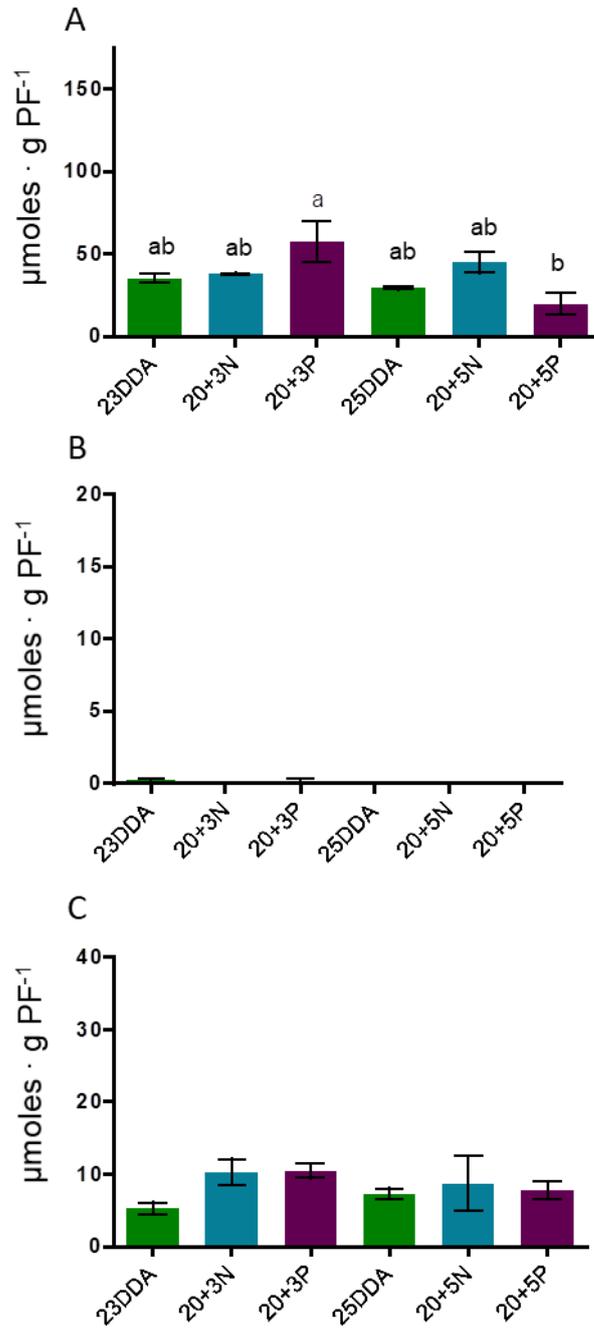
La concentración de sacarosa en las cubiertas seminales resultó estrechamente relacionada con el desarrollo de las semillas, pues se observaron niveles muy similares entre las semillas control de 23 y 25 DDA y las que pudieron desarrollarse en los frutos removidos 20+3 N y 20+5 N; mientras que en las semillas pequeñas las concentraciones fueron cercanas a cero (Figura 15A). Los niveles de glucosa (Figura 15B) y fructosa (Figura 15C) fueron bajos en todos los casos y no se observaron diferencias atribuibles al desarrollo o a la falta de nutrientes.

El patrón de distribución de sacarosa de las cubiertas seminales (Figura 15A), se repitió en los embriones (Figura 16A): los niveles fueron elevados en los de las semillas que se estaban desarrollando tanto en condiciones normales como en los frutos removidos e indetectables en los de las semillas pequeñas (20+3 P y 20+5P).

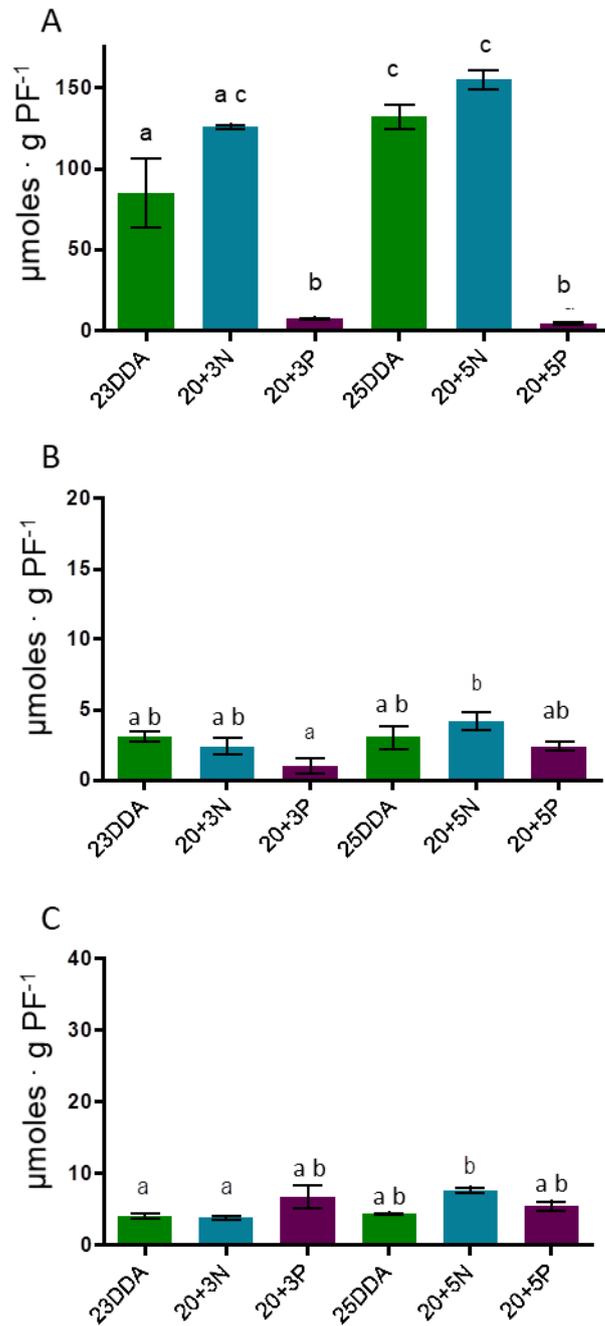
Por su parte los niveles de glucosa (Figura 16B) y fructosa (Figura 16C) en todos los embriones fueron cercanos a cero, lo que probablemente constituye un reflejo de la velocidad con la que se utilizan para la síntesis de sustancias de reserva.



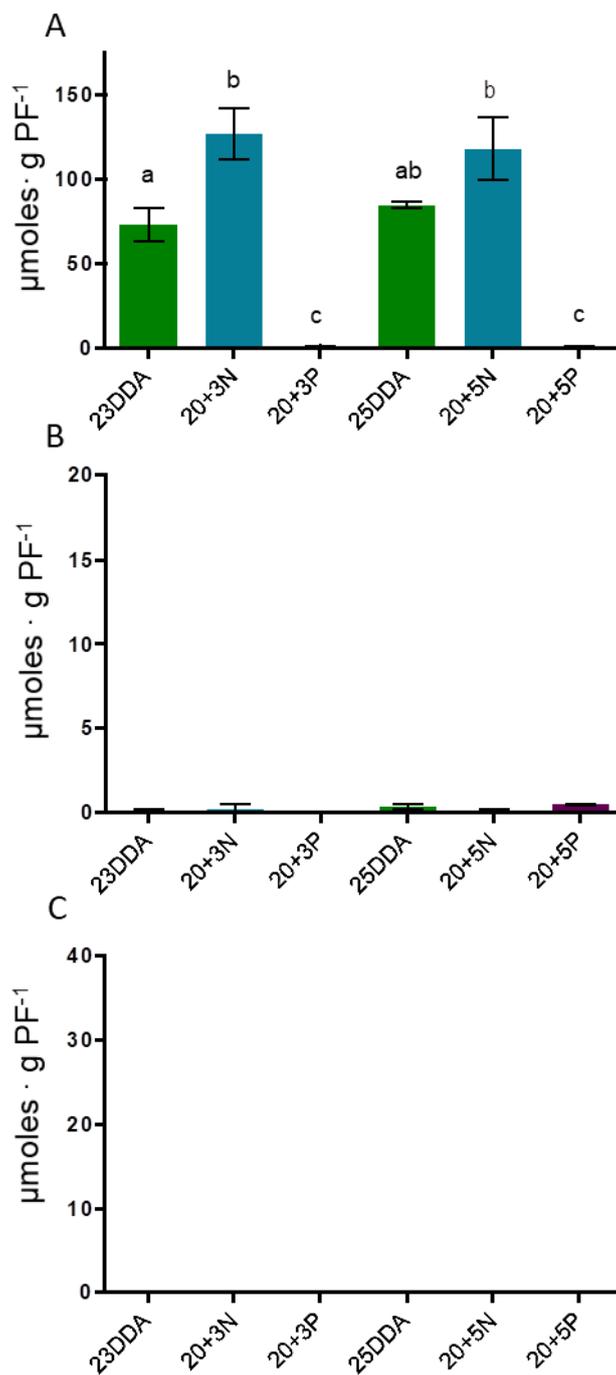
**Figura 13.** Determinación de la concentración de (A) sacarosa, (B) glucosa y (C) fructosa en secciones de pericarpio, correspondientes a semillas de 23DDA, 20+3N, 20+3P, 25DDA, 20+5 N y 20+5 P. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  EE, n=6. Las letras indican los valores estadísticamente significativos.



**Figura 14.** Determinación de la concentración de (A) sacarosa, (B) glucosa y (C) fructosa en secciones de funículo correspondientes a semillas de 23DDA, 20+3N, 20+3P, 25DDA, 20+5 N y 20+5 P. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  EE, n=3. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 15.** Determinación de la concentración de (A) sacarosa, (B) glucosa y (C) fructosa en cubiertas seminales, correspondientes a semillas de 23DDA, 20+3N, 20+3P, 25DDA, 20+5 N y 20+5 P. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  EE, n=3. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas.

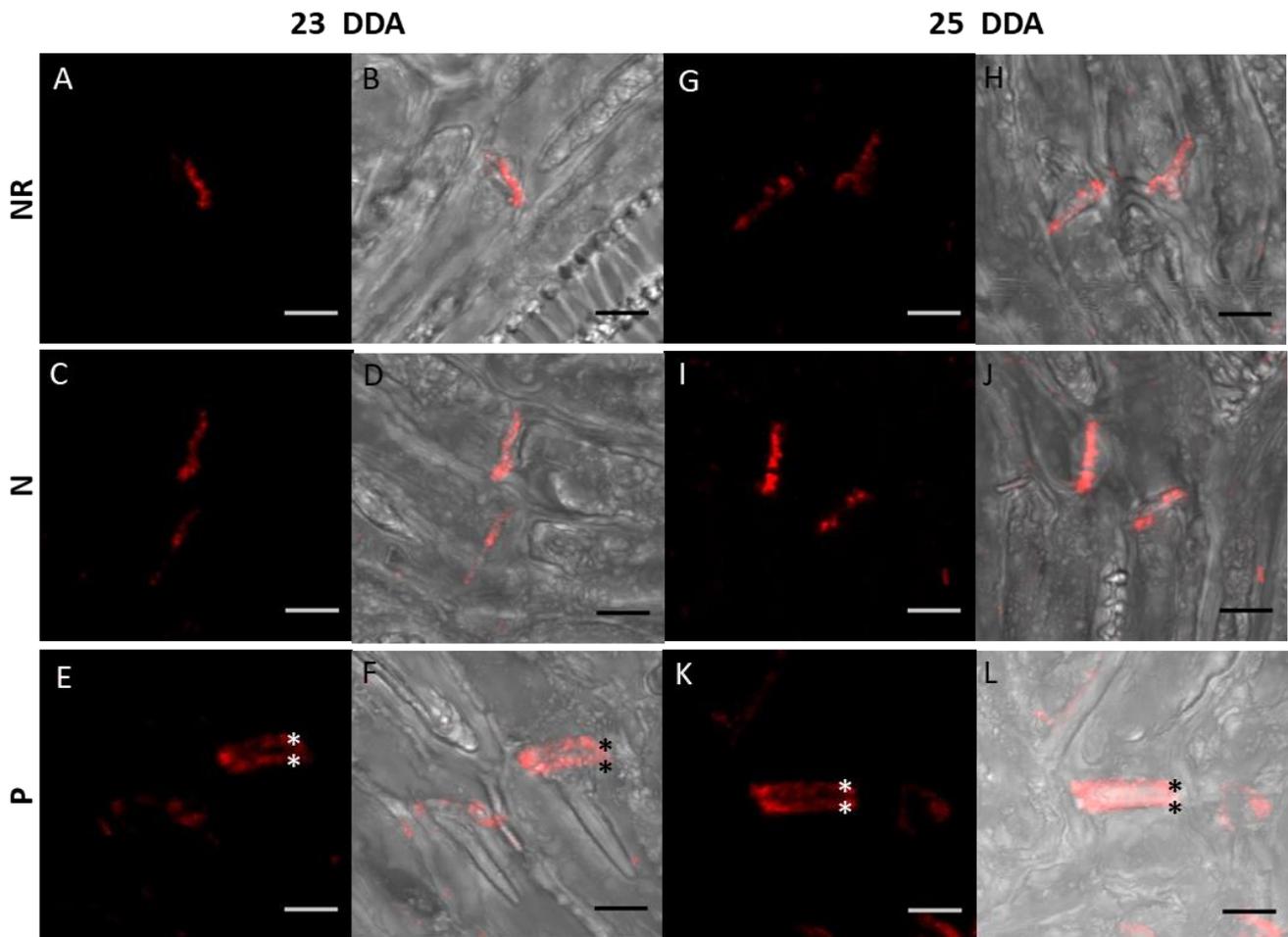


**Figura 16.** Determinación de la concentración de (A) sacarosa, (B) glucosa y (C) fructosa en embriones de 23DDA, 20+3N, 20+3P, 25DDA, 20+5 N y 20+5 P. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  EE, n=3. Las letras indican los tratamientos estadísticamente significativos.

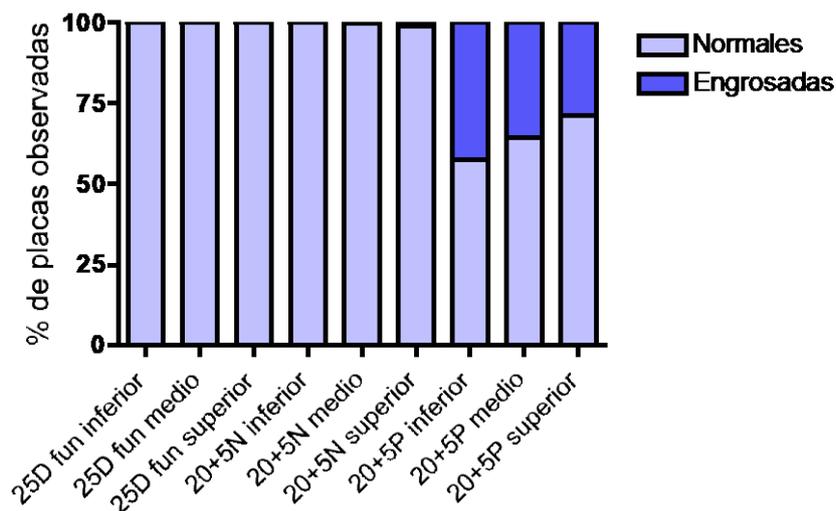
#### 5.4 Detección de calosa en haces vasculares

Los resultados obtenidos muestran que en los frutos removidos los nutrientes disponibles se distribuyen diferencialmente, lo que permite que algunas semillas puedan continuar con su desarrollo y que el funículo es el sitio en donde se limita el flujo de nutrientes hacia las semillas cuyo desarrollo será interrumpido. Dado que se ha reportado que la acumulación de calosa en las placas cribosas del floema es un elemento que puede regular el flujo de nutrientes (Xie *et al.*, 2010; Koh *et al.*, 2012), se decidió hacer un análisis estructural de los funículos. La inmunolocalización con el anticuerpo contra  $\beta$  (1-3) glucano (calosa) permitió detectar su presencia en las placas cribosas (Figura 17). No se apreciaron diferencias importantes en las características de las placas presentes en los funículos de las semillas que se estaban desarrollando tanto en condiciones normales como en los frutos removidos, donde la presencia de calosa es observada únicamente como una línea delgada entre dos elementos de tubo criboso (Figura 17; A-D, G-J). Sin embargo, en los funículos de las semillas cuyo desarrollo se detuvo en los frutos removidos, se observó un engrosamiento en la deposición de calosa en las placas cribosas (Figura 17; E, F, K, L). Se hizo un conteo de placas cribosas engrosadas y placas normales en los funículos de 25DDA, 20+5N y 20+5 P (Figura 18). Para este análisis el funículo se dividió en funículo inferior (cercano al pericarpo), funículo medio y funículo superior (adyacente a la semilla). Se encontró que los funículos de las semillas control no presentaban placas engrosadas. En los de las semillas que se desarrollaron en los frutos removidos el porcentaje fue mínimo (menor al 1%), y muy abundantes en los de las semillas que bajo esas condiciones detuvieron su desarrollo. En la figura 18 se aprecia que el porcentaje de placas engrosadas fue mayor en la base del funículo (42 %) y que gradualmente se redujo a medida que se acercó a la semilla (28 %). Por ésta razón se eligieron las secciones inferiores de los funículos correspondientes a semillas control, normales y pequeñas, tanto de 23 y 25 días para cuantificar el aumento en las deposiciones de calosa.

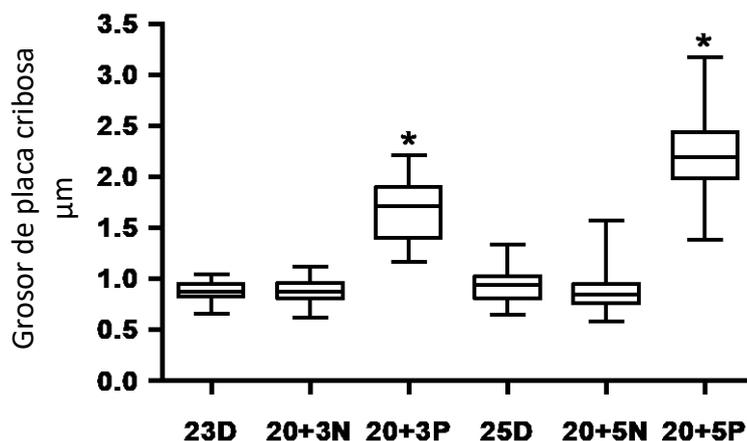
El análisis de las dimensiones de las placas cribosas muestra que en condiciones normales miden en promedio 6.25  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0.9  $\mu\text{m}$  de grosor (n=180). En los funículos de las semillas cuyo desarrollo se detuvo como consecuencia de la falta de nutrientes, una proporción importante de las placas presentaron engrosamientos atípicos (Figura 19), y su grosor promedio fue de 1.6  $\mu\text{m}$  (n=90) para las placas cribosas de los funículos 20+3P y de 2.2  $\mu\text{m}$  (n=90) en aquellas de los funículos 20+5P.



**Figura 17.** Placas cribosas representativas del floema de funículos de semillas de 23 y 25 DDA que se desarrollaron en frutos que no fueron removidos de la planta (NR) y de semillas que continuaron su crecimiento (normales, N) o no (pequeñas, P) después de 3 y 5 días de que frutos de 20 DDA fueron cortados de la planta. A, C, E, G, I, K: señal de fluorescencia del anticuerpo secundario Alexa 568, indicando la presencia de calosa. B, D, F, H, J, L: superposición de la señal de fluorescencia con la imagen de campo claro. Las placas de las semillas que se desarrollaron en condiciones normales o en frutos que fueron removidos no presentan engrosamientos, mientras que en los funículos de las semillas pequeñas cuyo desarrollo se detuvo en los frutos removidos se observan engrosamientos atípicos señalados con asteriscos. Barra de escala: 5 $\mu$ m.



**Figura 18.** Porcentaje de placas cribosas engrosadas y normales en secciones de funículos de semillas de 25 DDA desarrolladas en condiciones normales, o en semillas de frutos que se cortaron a 20 DDA y que después de 5 días pudieron continuar (20+5N) o no (20+5P) con su desarrollo.



**Figura 19.** Distribución del grosor de las placas cribosas del floema de las secciones inferiores de funículos correspondientes a semillas de 23 y 25 DDA desarrolladas en condiciones normales, o en frutos que fueron cortados a los 20 DDA y analizados 3 (20+3 N y P) y 5 (20+5 N y P) días después. N y P indican si las semillas continuaron o no, respectivamente su crecimiento en los frutos que fueron cortados. Los asteriscos indican que los engrosamientos de las placas cribosas de los funículos 20+3P y 20+5 P son significativamente distintos a los de los otros funículos analizados (Pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn,  $p < 0.001$ ),  $n = 30$  placas de 3 funículos distintos para cada etapa.

## 5.5 Observación de placas cribosas al microscopio electrónico de barrido (MEB)

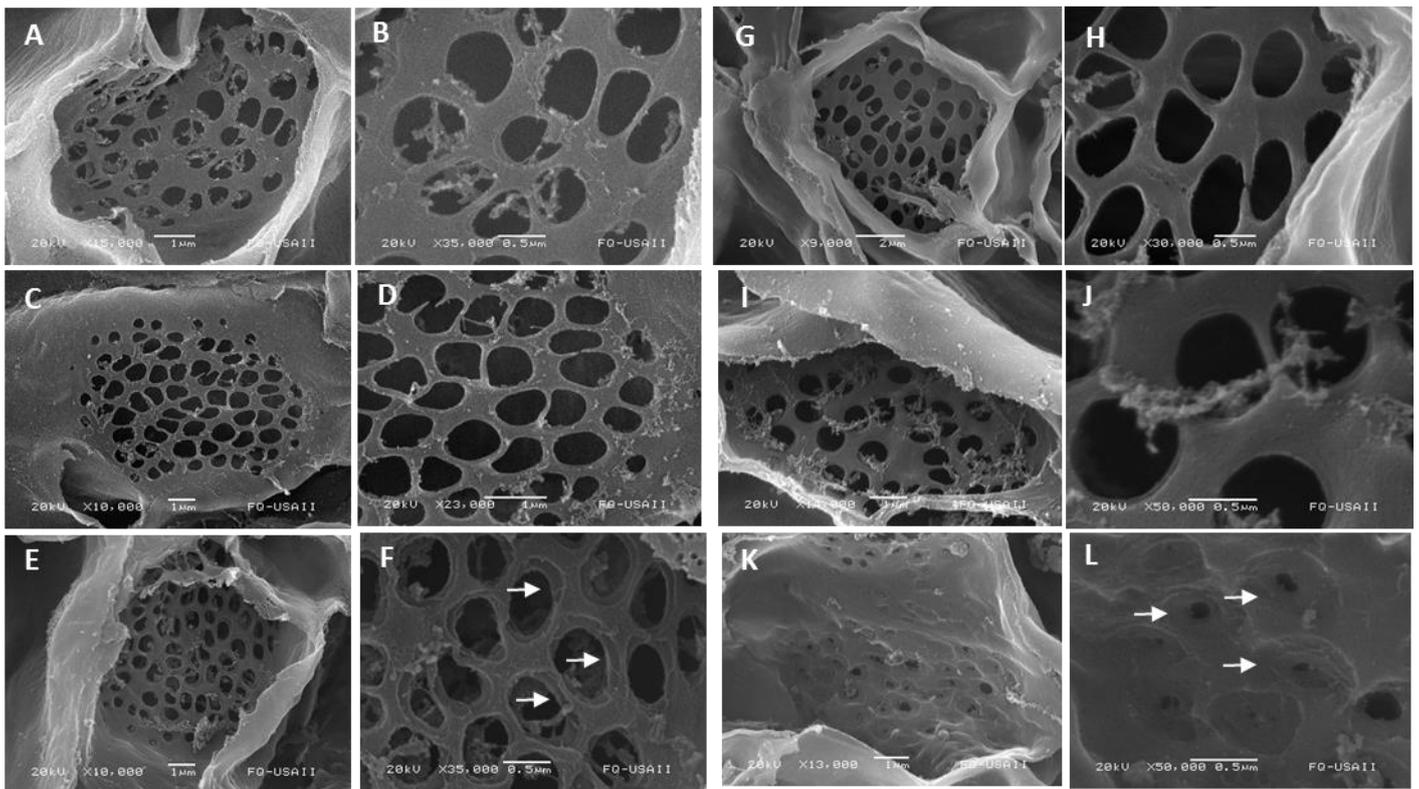
Una vez que se observó que las placas cribosas del floema de los funículos de las semillas que no continuaron su desarrollo en los frutos removidos, presentaban mayores deposiciones de calosa, se decidió investigar si ello afectaba el diámetro de los poros. Para lo cual fue necesario digerir enzimáticamente el contenido del citoplasma y observar las placas cribosas en plano transversal.

Las placas cribosas de los funículos de 23 y 25 DDA presentan poros sin ninguna obstrucción aparente (Figura 20; A, B y G, H), patrón que se repite en los poros de los funículos correspondientes a las semillas que se desarrollan normalmente (Figura 20; C, D e I, J). Por el contrario, en las placas cribosas de los funículos correspondientes a las semillas pequeñas, se observaron acumulaciones en el perímetro del poro cuyo aspecto coincide con lo que otros autores han reportado como acumulaciones de calosa (Mullendore *et al.*, 2010; Koh *et al.*, 2012).

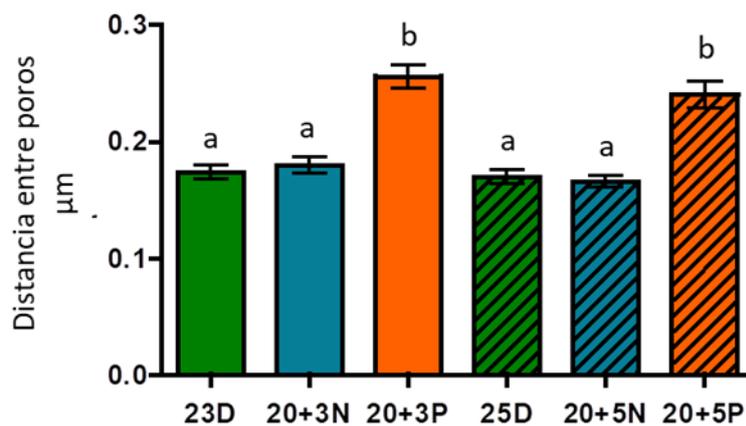
Se encontró que la calosa se acumula en los bordes de los poros en las placas cribosas de los funículos 20+3P y 20+5P, y reduce el diámetro de los mismos (Figura 20; E, F y K, L). En la figura 20 se muestran placas representativas de cada tratamiento.

La distancia entre poros es un reflejo del aumento en la cantidad de calosa en el perímetro del poro y la separación entre las áreas disponibles para el flujo en una placa cribosa; el análisis de ANOVA indica que las distancias entre poros son significativamente mayores en las placas de los funículos 20+3P y 20+5P (Figura 21). No se encontraron diferencias significativas entre las secciones inferior, media y superior dentro de cada tratamiento.

También se analizó la relación del área de flujo con respecto al área observada para cada placa. Los resultados se separaron en tres categorías: 0-0.2, 0.21-0.4 y 0.41-0.6. En la tabla 3 se presenta la cantidad de placas que cumplen con esos criterios. Los resultados fueron analizados con una prueba de G para determinar si la proporción de área de flujo era independiente a los tratamientos, y se realizó una corrección de Williams a los datos para no sobreestimar el valor de P. Se encontró que el área de flujo disminuye significativamente en las placas de los funículos 20+5P y que no hay diferencias significativas entre las placas de 23 DDA.



**Figura 20.** Microfotografías al microscopio electrónico de barrido de placas cribosas representativas de funículos de semillas de 23 DDA (A y B), 20+3 N (C y D), 20+3P (E y F), 25 DDA (G y H), 20+5N (I y J) y 20+5P (K y L). A, C, E, G, I y K corresponden a vistas de la placa cribosa completa, B, D, F, H, J y L corresponden a acercamientos de los poros cribosos de cada placa, respectivamente. Las flechas blancas señalan las deposiciones de calosa en los bordes de los poros.



**Figura 21.** Distancia entre poros de las placas cribosas. Las barras representan la distancia promedio para cada tipo de funículo  $\pm$ EE. (n=206, se tomaron 10 mediciones por placa analizada). Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas.

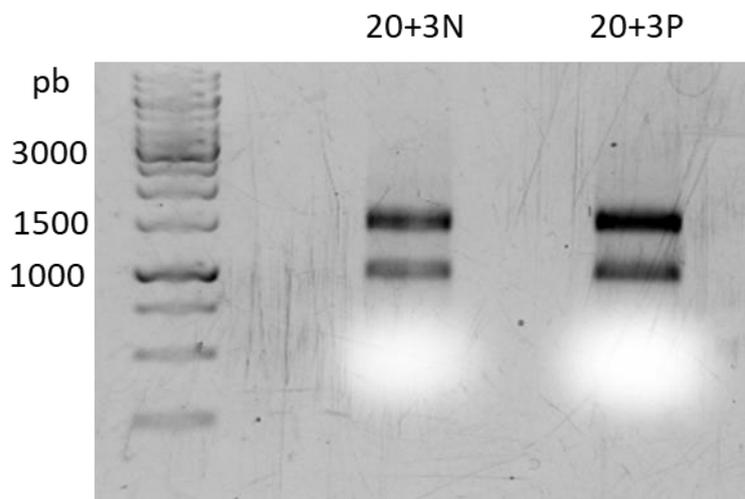
**Tabla 3.** Número de placas cribosas de cada tipo de funículo acorde a la relación área de flujo/área observada y porcentaje que representan con respecto al total para cada categoría.

	Relación Área de flujo/ Área observada						Placas totales (100%)
	0-0.2	%	0.21-0.4	%	0.41-0.6	%	
<b>23D</b>	2	6.5	28	90.3	1	3.2	31
<b>20+3N</b>	2	5.3	29	76.3	7	18.4	38
<b>20+3P</b>	3	13.6	17	77.3	2	9.1	22
<b>25D</b>	2	4.9	33	80.5	6	14.6	41
<b>20+5N</b>	1	2.9	24	70.6	9	26.5	34
<b>20+5P</b>	14	35.0	24	60.0	2	5.0	40
							206

## 5.6 Análisis de microarreglos

Los resultados obtenidos muestran que la interrupción del flujo de nutrientes en los funículos de algunas semillas en respuesta a la severa deficiencia de nutrientes, es una consecuencia de la acumulación de calosa en los poros de las placas cribosas. Sin embargo, es muy probable que este mecanismo (que permitió que bajo esas condiciones algunas semillas fueran capaces de continuar con su desarrollo), sea una manifestación de modificaciones más amplias. Con la finalidad de identificar procesos que pudieran estar involucrados, se decidió comparar a través de la hibridación con un microarreglo de *Arabidopsis thaliana* la expresión de genes en los funículos de las semillas que continuaron o no su desarrollo 3 días después de que los frutos se cortaron de la planta.

Para ello se purificó RNA total de los funículos de los tratamientos 20+3N y 20+3P. El procedimiento seguido permitió obtener 11.98 µg para el tratamiento 20+3N y 13.86 µ para el 20+3P. En la figura 22 puede observarse que en ambos casos la integridad de los RNAs ribosomales es buena.



**Figura 22.** Integridad del RNA purificado de funículos de semillas 20+3N y 20+3P.

En la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM se hizo todo el procesamiento posterior (síntesis de cDNA e incorporación de fluoróforos, hibridación con el microarreglo que contiene el transcriptoma de *Arabidopsis thaliana*, observación del chip, normalización y análisis estadístico de los resultados).

Se identificaron transcritos que modificaron su acumulación en los funículos de las semillas 20+3P con respecto a los 20+3 N. Considerando un valor de  $Z \geq 1.5$  (confiabilidad de 70%), 1676 transcritos la aumentaron y se redujo en 1599 transcritos. Si se considera un valor de  $Z \geq 2$  (confiabilidad de 90%), 698 transcritos aumentaron su acumulación y 539 la disminuyeron.

Los genes que modificaron su expresión fueron analizados utilizando DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) y agrupados por diferentes criterios: categoría funcional (UniProt: <http://www.uniprot.org/keywords/>), ontología (<http://www.geneontology.org/>) (Ashburner *et al.*, 2000), y participación de las proteínas que codifican en vías metabólicas acorde a la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG; <http://www.kegg.jp/>).

La clasificación por categoría funcional de los genes que modificaron su expresión (acorde a UniProtKB/TrEMBL), permitió identificar grupos de genes que podrían jugar un papel importante en el fenómeno de estudio. Dentro de los que aumentaron su expresión, hay genes que pertenecen a las categorías funcionales de hidrolasas, biosíntesis de lignina, pared celular, glucosidasas y otros que se expresan y/o se localizan en mitocondria. Por su parte, en los grupos que se encuentran representados por los genes que disminuyeron su expresión, destacan las categorías de oxidoreductasas, pared celular, regulación de la transcripción y metabolismo de carbohidratos, entre otros. Cabe destacar que en ambas categorías se observan cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos y pared celular (Tablas 4 y 5).

**Tabla 4.** Categorías funcionales de genes que incrementaron su expresión en funículos de semillas que después de 3 días no continuaron con su desarrollo en frutos que se cortaron de la planta a 20 DDA.

<b>Categoría</b>	<b>Número de genes</b>	<b>Función</b>
Hidrolasas	177	Enzimas que catalizan la adición de un hidrógeno y iones hidroxilo del agua a una molécula para romperla en dos o más moléculas más simples
Biosíntesis de lignina	5	Proteínas involucradas en la síntesis de polímeros a partir de subunidades de fenilpropanoides.
Pared celular	22	Proteínas que se encuentran asociadas, o formando parte de la pared celular.
Glucosidasas	30	Hidrolasas que atacan enlaces glicosídicos en carbohidratos, glicoproteínas y glicolípidos.
Mitocondria	30	Proteínas codificadas o localizadas en la mitocondria.

**Tabla 5.** Categorías funcionales de genes que disminuyeron su expresión en funículos de semillas que después de 3 días no continuaron con su desarrollo en frutos que se cortaron de la planta a 20 DDA. .

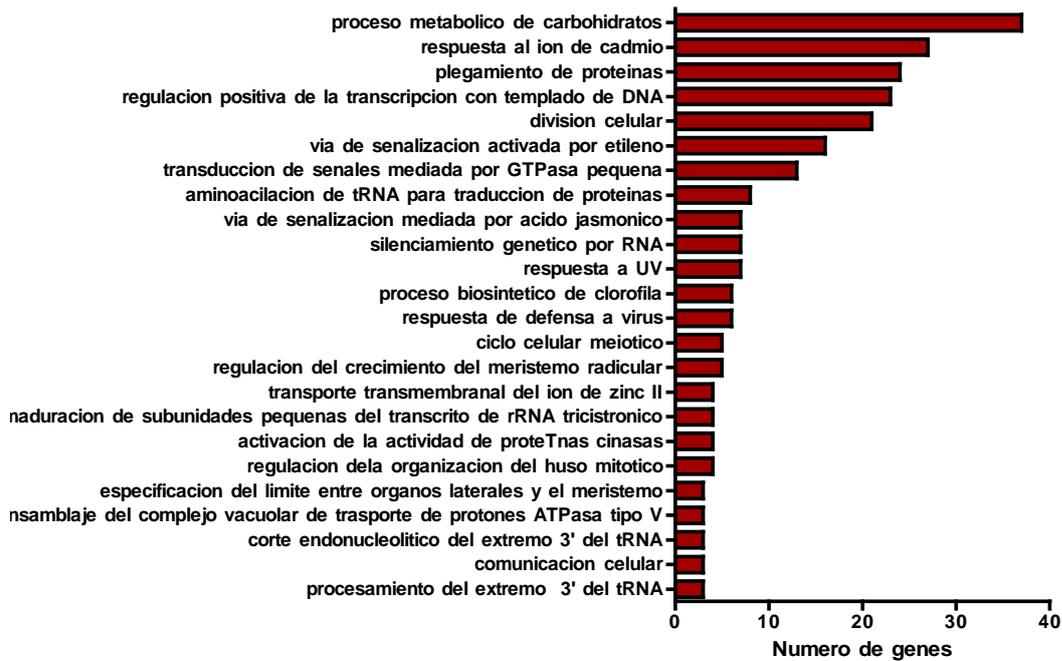
<b>Categoría</b>	<b>Número de genes</b>	<b>Función</b>
Oxidoreductasa	92	Enzimas que catalizan la oxidación de un compuesto con la reducción de otro.
Pared celular	22	Proteínas que se encuentran asociadas, o formando parte de la pared celular.
Regulación de la transcripción	127	Proteínas involucradas en la regulación del proceso de transcripción.
Metabolismo de carbohidratos	14	Proteínas que participan en las reacciones en las que los carbohidratos están involucrados.

Los genes de interés también se clasificaron con base en su ontología genética (*GO* por sus siglas en inglés). Las categorías generadas fueron distintas, ya que en éste caso el ordenamiento de los genes se hace según los lineamientos dados por el *Gene Ontology Project* (Ashburner *et al.*, 2000; <http://www.geneontology.org>) que describe y clasifica a los

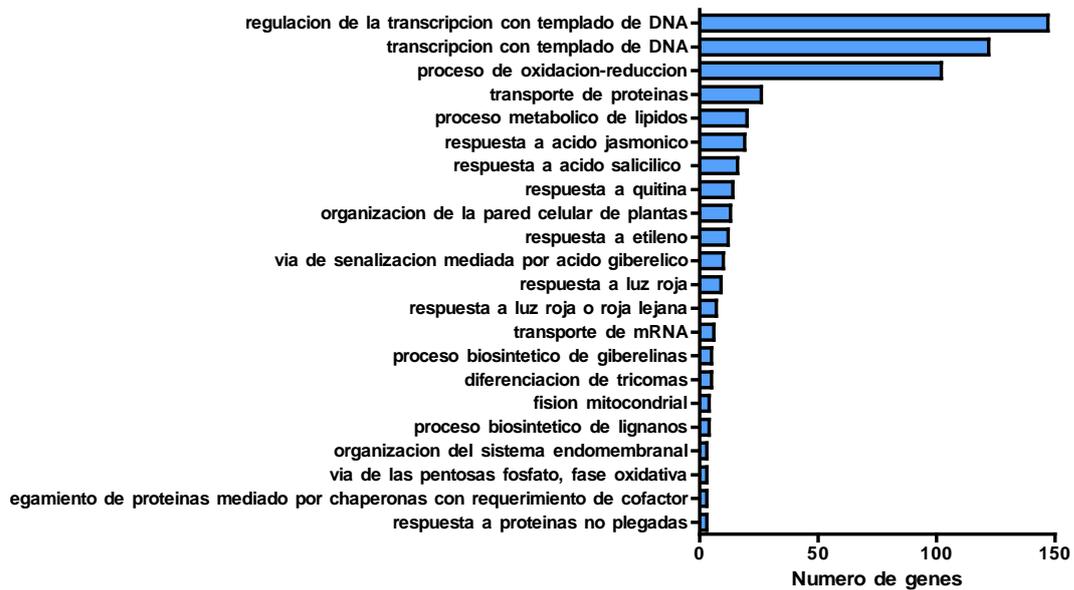
productos de los genes con base en el proceso biológico donde participan, componentes celulares o la función molecular que realizan.

Entre los procesos biológicos cuyos genes que se ven aumentados, destaca el metabolismo de carbohidratos, con el mayor número de genes. A su vez, se observa un aumento en genes que se han descrito en respuesta a distintos tipos estrés, y vías de señalización por hormonas. En los grupos de genes cuya expresión disminuye, se encuentran como los más representados genes relacionados con la transcripción, y procesos de oxidación-reducción. Se observan también cambios en genes involucrados en vías de señalización por hormonas, y en diferentes aspectos de la pared celular. En la figura 23 se presentan los resultados.

A



B



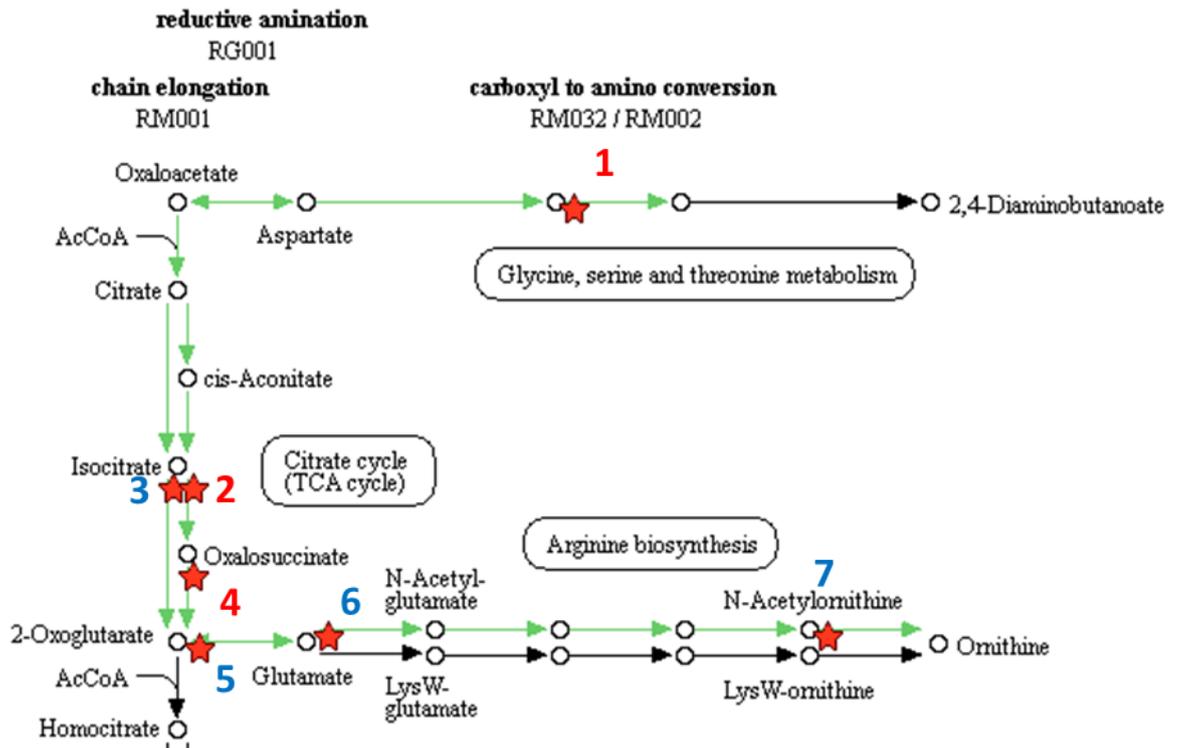
**Figura 23.** Procesos biológicos que presentan genes que aumentaron (A) o disminuyeron (B) su expresión en los funículos de las semillas 20+3P, con relación al nivel observado en los funículos de las semillas 20+3N.



glutamato sintasa 2 (*NAGS2*) y una peptidasa M20/M25/M40 (*At1g44820*), las cuales son necesarias para la síntesis de ornitina, que a su vez es precursor de la arginina.

La expresión de genes que codifican para la síntesis de enzimas que participan en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos también resultó afectada: disminuyó la de isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) y se incrementó la expresión de una isocitrato/ isopropilmalato deshidrogenasa (*At5g14590*). Este cambio podría modificar la conversión de isocitrato a oxoglutarato, que en vez de ser directa, en los funículos de semillas pequeñas podría generar oxalosuccinato como intermediario. La expresión de la glutamato: glioxilato aminotransferasa (*GGT1*) también se redujo, lo que podría disminuir la conversión de 2-oxoglutarato en glutamato. Este cambio, aunado a la disminución en la expresión de las enzimas que llevan a la síntesis de ornitina, sugiere que en los funículos de semillas pequeñas es probable que se reduzca la síntesis de arginina.

## 2-OXOCARBOXYLIC ACID METABOLISM



**Figura 25.** Cambios en la expresión de genes que participan en el metabolismo del ácido 2-oxocarboxílico en funículos de semillas pequeñas. Enzimas cuyos genes aumentan su expresión (números en color rojo): 1: proteína de la familia semialdehído deshidrogenasa (*At1g14810*), 2 y 4: proteína de la familia isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa (*At5g14590*). Enzimas cuyos genes disminuyen su expresión (números en color azul): 3: isocitrato deshidrogenasa 1 (*IDH1*), 5: glutamato: glioxilato aminotransferasa (*GGT1*), 6: N-acetil-l-glutamato sintasa (*NAGS2*), 7: proteína de la familia peptidasa M20/M25/M40 (*At1g44820*). Tomado de <http://www.kegg.jp/>.

La vía de biosíntesis de fenilpropanoides, es un caso en donde numerosos genes aumentan su expresión (Figura 26), lo que podría incrementar la síntesis de ligninas en los funículos de las semillas que no se desarrollan. De manera especial destaca una proteína que pertenece a la superfamilia de las peroxidasas (*At2g43480*) y que cataliza el último paso en la síntesis de estos compuestos.



DITERPENOID BIOSYNTHESIS

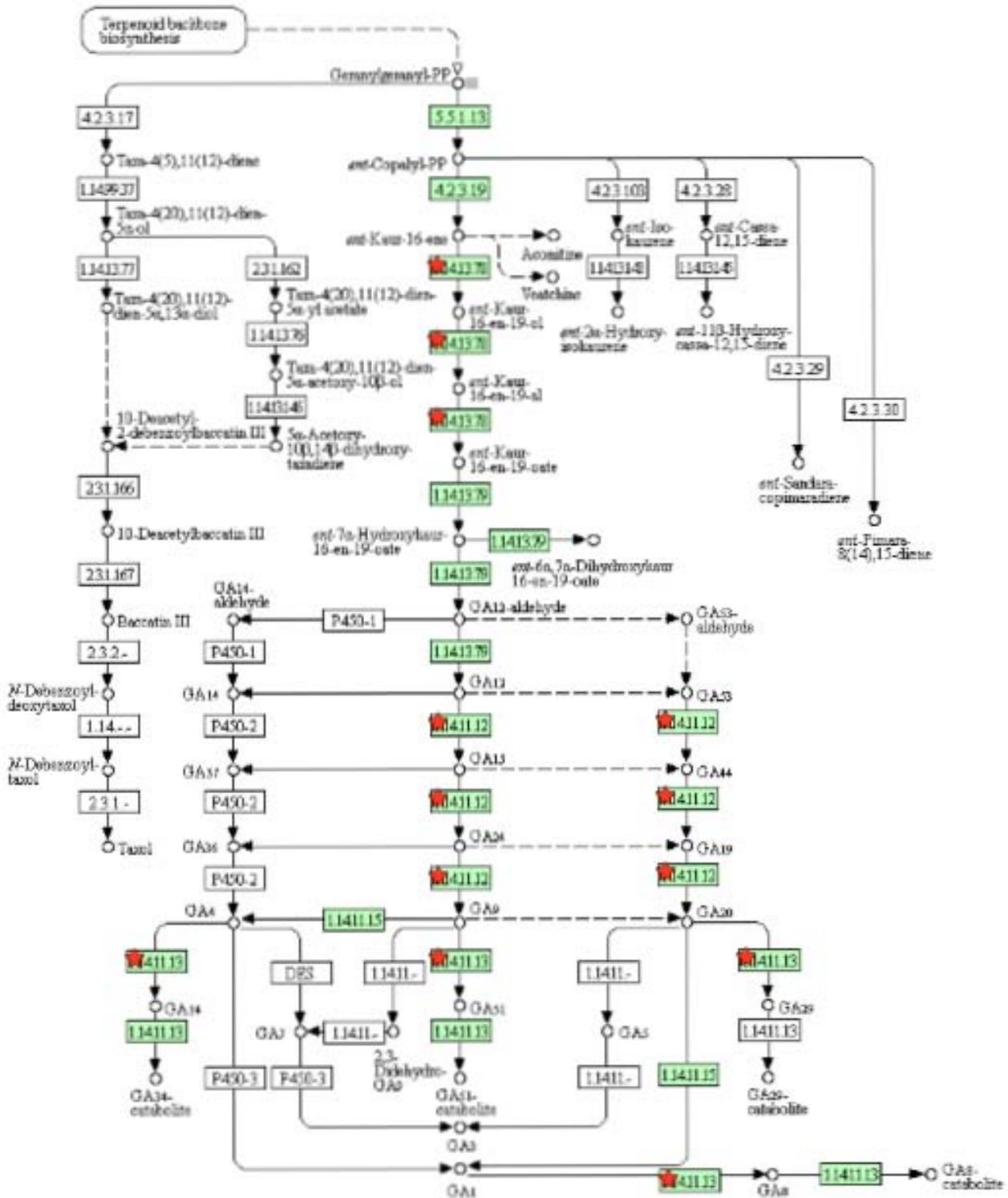


Figura 27. Vía metabólica de la síntesis de diterpenos. Las estrellas en rojo indican los genes que disminuyen su expresión en los funículos 20+3P. GA: ácido giberélico. Tomado de <http://www.kegg.jp/>.

En una búsqueda adicional se encontró que en los funículos de las semillas pequeñas de 23 días, se alteró la expresión de genes que podrían ser de particular interés para el modelo de estudio. Por ejemplo:

Se observó un aumento en la expresión del gen *Altered Phloem Development*, asociado con la división y diferenciación de elementos de tubo criboso, y cuya mutante presenta niveles menores de calosa en las placas cribosas (Bonke *et al.*, 2003). También se incrementó la expresión de *Lonesome Highway*, que ha sido descrito como un activador transcripcional que establece y mantiene el patrón de las células de la vasculatura en la raíz (Ohashi-Ito y Bergmann, 2007).

Por su parte, disminuyó la expresión de dos genes que se expresan en el funículo (Khan *et al.*, 2015): *Sporocyteless/Nuzzle* que regula el crecimiento durante el desarrollo del óvulo, y una celulosa sintasa, necesaria para el engrosamiento de las paredes del xilema (Yang *et al.*, 1999).

Finalmente, dada la importancia de la síntesis de calosa como un elemento que participa en la regulación del flujo de nutrientes; se analizaron los cambios en la expresión de la calosa sintasa 7 (encargada de la síntesis de calosa en las placas cribosas del floema) y de los genes que codifican para las proteínas con las cuales forma un complejo (UDP- Glucosa transferasa 1, Rop 1, Anexina 1 y Sacarosa sintasa 6), pero no se encontraron cambios significativos, lo que supone que la acumulación de calosa en las placas cribosas del floema de los funículos de las semillas pequeñas se regula a otro nivel.

## 6. DISCUSIÓN

A los 20 días después de la antesis, las semillas de frijol se encuentran al inicio de la fase de almacenaje de sustancias de reserva, donde la demanda de nitrógeno y azúcares es máxima (Clavijo-Michelangeli *et al.*, 2013). Si los frutos se separan de la planta en ese momento, las semillas experimentan un estrés nutricional severo (Coello y Martínez-Barajas, 2014). Como consecuencia, se acelera la removilización de materiales acumulados en la vaina. El almidón es un componente importante de esas reservas y su degradación podría contribuir al aumento en la concentración de glucosa que se observa en las secciones de los frutos que fueron cortados de la planta (Figura 13B). Sin embargo, los productos disponibles no se distribuyen equitativamente y mientras que algunas semillas pueden continuar con su desarrollo, el de otras se ve interrumpido; lo que sugiere la existencia de un mecanismo responsable de regular la distribución de nutrientes (Coello y Martínez-Barajas, 2016). No existe una descripción del fenómeno, por lo que se planteó que un bloqueo físico de la vasculatura que irriga a las semillas que no se desarrollan pudiera ser la causa de la distribución desigual de nutrientes.

Tres días después de iniciado el estrés nutricional (20+3), se puede distinguir con claridad si una semilla será capaz o no de continuar con su desarrollo. Los resultados de los experimentos de incorporación y distribución de sacarosa [ $U-^{14}C$ ] confirmaron observaciones previas (Coello y Martínez-Barajas, 2016) y permitieron identificar al funículo de las semillas pequeñas como el sitio en donde se interrumpe el flujo de nutrientes. Los datos muestran que la reducción es gradual a lo largo del haz vascular.

El funículo, tiene como función principal el transporte de nutrientes del fruto hacia la semilla, por lo que un gran porcentaje de este tejido está conformado por haces vasculares (Mawson *et al.*, 1994). Sin embargo, también es un tejido metabólicamente muy activo y procesos como catabolismo de azúcares, respiración celular, metabolismo de aminoácidos y glutatión, biosíntesis de ácidos grasos y fotosíntesis, son algunos de los que ocurren allí (Mawson *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2016). Es probable que la disminución de los niveles de sacarosa que se observan en el funículo a partir del día 20+3 (Figura 14A) sea una consecuencia de su consumo en estos procesos.

La síntesis de calosa en los haces vasculares es uno de los mecanismos más extendidos en las plantas para regular el transporte del floema en respuesta a muy diversos tipos de estrés. Sin embargo, los reportes que la asocian con estrés nutricional son escasos (Kong *et al.*, 2013). La observación de los haces vasculares demostró que en los funículos de las semillas pequeñas hay un aumento en la deposición de calosa en las placas cribosas del floema cuyas paredes

celulares se engrosan y eventualmente detienen el flujo de nutrientes (Figuras 17 y 20). Por su parte, en los funículos de las semillas control y de las semillas que pudieron continuar su desarrollo en los frutos removidos, la anatomía de las placas cribosas es normal (Peterson y Rauser, 1971; Furch *et al.*, 2007; Hao *et al.*, 2008) (Figuras 17 y 20). Las placas engrosadas se distribuyen a lo largo de todo el haz vascular del funículo, reduciendo el diámetro de los poros sin embargo, son más abundantes en la porción inferior (Figura 18). Estos resultados corresponden muy bien con la reducción en el flujo de sacarosa [ $U-^{14}C$ ] y la disminución en la cantidad de azúcares presentes en las secciones de los funículos de las semillas pequeñas (Figuras 11 y 14).

Los elementos de tubo criboso son células altamente especializadas, con una estrecha dependencia de la actividad metabólica de las células acompañantes y el tejido parenquimático que las rodea; por lo que es muy probable que la reducción en la disponibilidad de nutrientes resultante del bloqueo en el funículo tenga consecuencias muy amplias. Sin embargo, ante la falta de una conexión evidente entre la falta de nutrientes y la acumulación de calosa en las placas cribosas, decidimos hacer un análisis de los cambios transcripcionales que induce la falta de nutrientes en los funículos de las semillas que no se desarrollaron. Se escogió la etapa 20+3, pues es la etapa más temprana en que es posible distinguir el destino de las semillas, y por lo tanto la más cercana posible al momento en que se determinó el destino de las semillas. El cDNA sintetizado a partir del RNA purificado de los funículos de semillas que continuaron o no su desarrollo se hibridó con un microarreglo de *Arabidopsis*. Las diferencias entre especies pueden hacer que algunos resultados no sean del todo confiables; sin embargo, otros más pueden dar una buena idea de que sucede con la expresión de aquellos que tienen un alto grado de identidad. Por otro lado, no siempre existe una relación directa entre los cambios en la cantidad de mensaje, la de proteína y la actividad de la proteína sintetizada. Sin embargo, usaremos estos resultados para hacer una propuesta preliminar (Chuaqui *et al.*, 2002) de los mecanismos que podrían estar involucrados en las respuestas del funículo a la falta de nutrientes.

Muchos de los genes que cambian su expresión participan en la transcripción y en su regulación (Figura 23) lo que supone que la fisiología de los funículos podría sufrir cambios muy profundos. Llama la atención que muchos de los genes que aumentan su expresión participan en la síntesis y modificación de la pared celular (Tablas 4 y 5; Figura 26) y que el metabolismo de proteínas y carbohidratos aparecen muy sensibles a la restricción de azúcares (Tabla 5; Figura 26). En el caso de las primeras destaca el aumento de la expresión de genes que codifican para enzimas participantes en la degradación de tirosina, valina, leucina, isoleucina y

fenilalanina (Figura 24), al mismo tiempo que disminuyó la expresión de otras involucradas en vías de síntesis (Figura 25). La síntesis de proteínas es un proceso energéticamente muy costoso y estas medidas podrían ayudar a que los efectos de la falta de nutrientes sean más severos. En el caso particular del metabolismo de carbohidratos también hay cambios muy importantes: aumentó la expresión de beta-galactosidasas que podrían secretarse para hidrolizar los polisacáridos de pared y utilizar los azúcares ahí almacenados como fuente de energía (Lee *et al.*, 2007, Arias *et al.*, 2014). Por otro lado, la síntesis de celulasas (Tucker *et al.*, 1988) y la lignificación de las paredes celulares (Clements y Atkins, 2001) han sido descritos como parte del proceso de abscisión de órganos en plantas. El funículo es una estructura que eventualmente morirá, y es posible que la falta de nutrientes haga que esos eventos se desencadenen antes.

Así mismo, la falta de nutrientes disminuyó la expresión de genes que codifican para enzimas importantes como: fosfoglucomutasa 3 (*PGM3*) que es necesaria para mantener el flujo glucolítico (Manjunath *et al.*, 1998); fosfoglicerato/bifosfoglicerato mutasa (*PGM*), cuya expresión está asociada a la presencia de sacarosa; la enzima desproporcionadora de almidón 1 (*DPE1*) que es requerida en la degradación de almidón (Critchley *et al.*, 2001); isocitrato deshidrogenasa (*IDH1*), que participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y cuya función es esencial en la función oxidativa del ciclo (Figura 25).

También bajó la expresión de genes involucrados en la cadena de transporte de electrones (cuatro citocromos P450 (*At5g24960*), (*At5g42590*), (*At3g53300*), (*At4g37410*), y una ubiquinol-citocromo C reductasa, encargada del transporte de electrones del citocromo C al ubiquinol en el complejo III). Todos estos cambios son congruentes con el rápido consumo de los carbohidratos celulares y la disminución en la tasa de respiración celular que se observan cuando las células vegetales se someten a condiciones que generan bajos niveles de azúcares (Yu, 1999).

También aumentó la expresión de glioxilasa 1 (*At1g08110*) enzima encargada de desintoxicar el metilglioxal, un producto del metabolismo de glucosa y lípidos. La expresión de esta enzima, la cual utiliza glutatión reducido como cofactor, aumenta en respuesta a estrés oxidativo (Mustafiz *et al.*, 2011). Sin embargo, entre los genes que disminuyen su expresión se encuentra una glutamato:glioxilato aminotransferasa 1 (*GGT1*), específica del floema, en donde metaboliza el glutatión oxidado extracelular, generando glutamato libre, y el dipéptido cisteinil-glicina, el cual puede ser hidrolizado a cisteína y glicina por dipeptidasas. La cisteína

generada puede ayudar a mantener los niveles de glutatión intracelular y a prevenir los efectos negativos del estrés oxidativo (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007).

En este sentido destaca que la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1 (*G6PD1*) también disminuya su expresión. Esta enzima cataliza la primera reacción del ciclo de las pentosas fosfato, el cual produce NADPH que se usa en el mantenimiento del equilibrio redox en las células y ribosa 5-fosfato que es precursor de la síntesis de nucleótidos (DNA y RNA) y coenzimas (Nelson y Cox, 2008). Este escenario supone la disminución de la capacidad de las células para reducir el glutatión oxidado, cuyas consecuencias podrían agravarse si se toma en cuenta que en los funículos de las semillas pequeñas la expresión de genes que codifican para oxidoreductasas también está disminuida.

Muchos de estos cambios plantean un escenario caracterizado por respuestas a la falta de energía, con incrementos en la expresión de genes que podrían contribuir a mejorar la eficiencia en el uso de la energía, el metabolismo de moléculas que normalmente no son usadas como fuente de energía y la expresión de enzimas que podrían ayudar a inactivar especies tóxicas que normalmente no son muy abundantes. Sin embargo, los cambios observados también suponen un desbalance en la producción de energía y una disminución en la producción de especies que ayudan a mantener el estado redox.

A esto hay que agregar que la expresión de genes involucrados en la síntesis de giberelinas también se reduce en los funículos de las semillas pequeñas (Figura 27). En *Arabidopsis* las mutantes de oxidasas de giberelinas producen silicuas más pequeñas y tienen problemas para el establecimiento de semillas (Rieu *et al.*, 2008). Es probable que los funículos de las semillas pequeñas tengan una disminución en la síntesis de giberelinas que podría contribuir a la interrupción del crecimiento de las semillas.

Finalmente, no se observaron cambios en la expresión del gen de calosa sintasa 7, a la cual se ha identificado como responsable de su síntesis en las placas cribosas (Barratt *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2011). Tampoco se observaron cambios en la expresión de los genes que codifican para otras proteínas que forman parte del complejo responsable de la síntesis de calosa. En ese sentido, es importante mencionar que se ha reportado que la actividad del complejo calosa sintasa es estimulada por el ion de  $\text{Ca}^{2+}$  (Aidemark *et al.*, 2009). Así mismo, la síntesis de calosa en plasmodesmos se ha correlacionado con el aumento de la concentración de especies reactivas de oxígeno (Benítez-Alfonso *et al.*, 2009; Benítez Alfonso y Jackson, 2009). Finalmente, los resultados obtenidos sugirieron la posibilidad de que en los funículos de las semillas pequeñas la falta de azúcares provoque una deficiencia energética que

eventualmente se traduce en un desbalance en las especies reactivas de oxígeno, y una modificación en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  que favorece la síntesis de calosa y la interrupción del flujo de nutrientes.

## 7. CONCLUSIONES

- El flujo del floema hacia las semillas es controlado en el funículo. Bajo condiciones de estrés nutricional severo, éste se reduce como consecuencia de la acumulación de calosa que disminuye el diámetro de los poros de las placas cribosas.
- En frutos de frijol que se someten a deficiencia severa de nutrientes, se implementa una estrategia basada en el reciclaje de materiales acumulados en la vaina y en la distribución preferencial de los recursos generados, que permite que algunas semillas puedan continuar su desarrollo.
- La acumulación de calosa en las placas cribosas, no parece deberse a un aumento en la expresión de los genes que codifican a las enzimas responsables de su síntesis.
- Los cambios en la expresión genética de los funículos de semillas que no se desarrollan en los frutos que fueron cortados de la planta, suponen un escenario en donde ante la falta de azúcares se promueve el reciclaje de materiales diversos, alteraciones en el estado redox y desbalances hormonales.

## 8. PERSPECTIVAS

- El modelo de estudio utilizado es una simplificación de lo que realmente ocurre en una planta completa que sufre un estrés nutricional. Resultados obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio muestran que los embriones que no se desarrollan de los frutos removidos, son sometidos a un estrés nutricional severo. Sin embargo, no deben descartarse las contribuciones de otros tipos de estrés que se generan al cortar los frutos (hídrico, o daño mecánico) pudieran tener a las respuestas observadas.
- Es importante extrapolar los resultados aquí obtenidos a condiciones reales de cultivo y corroborar que los efectos que se asume son producto de un estrés nutricional causado por la remoción de los frutos también se observan en plantas completas sometidas a condiciones adversas que limitan la disponibilidad de nutrientes.
- Debe contemplarse la posibilidad de establecer si este fenómeno se presenta también en otras plantas donde el uso de otro tipo de estrategias experimentales, como por ejemplo la transformación genética, sean posibles.
- Idear una estrategia experimental que permita la identificación temprana de las semillas a las que se les interrumpe el flujo de nutrientes. Ello permitirá un acercamiento a los mecanismos involucrados en la percepción del estrés generado por la remoción prematura de los frutos y en estimular la acumulación de calosa en las placas cribosas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Aidemark, M., Andersson, C. J., Rasmusson, A. G., y Widell, S. (2009). Regulation of callose synthase activity in situ in alamethicin-permeabilized *Arabidopsis* and tobacco suspension cells. *BMC plant biology*, 9(1), 1.
- Aragão, F. J., Nogueira, E. O., Tinoco, M. L. P., y Faria, J. C. (2013). Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. *Journal of Biotechnology*, 166(1), 42-50.
- Arias, M. C., Pelletier, S., Hilliou, F., Wattedled, F., Renou, J. P., y D'Hulst, C. (2014). From dusk till dawn: the *Arabidopsis thaliana* sugar starving responsive network. *Frontiers in plant science*, 5.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M. y Harris, M. A. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, 25(1), 25-29.
- Ayre, B. G., Keller, F., y Turgeon, R. (2003). Symplastic continuity between companion cells and the translocation stream: long-distance transport is controlled by retention and retrieval mechanisms in the phloem. *Plant Physiology*, 131(4), 1518-1528.
- Barratt, D. P., Kölling, K., Graf, A., Pike, M., Calder, G., Findlay, K., ... & Smith, A. M. (2011). Callose synthase *GSL7* is necessary for normal phloem transport and inflorescence growth in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 155(1), 328-341.
- Benitez-Alfonso, Y., y Jackson, D. (2009). Redox homeostasis regulates plasmodesmal communication in *Arabidopsis* meristems. *Plant signaling & behavior*, 4(7), 655-659.
- Benitez-Alfonso, Y., Cilia, M., San Roman, A., Thomas, C., Maule, A., Hearn, S., y Jackson, D. (2009). Control of *Arabidopsis* meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3615-3620.
- Bonke, M., Thitamadee, S., Mähönen, A. P., Hauser, M. T., y Helariutta, Y. (2003). APL regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis*. *Nature*, 426(6963), 181-186.
- Botha, C. E. J., Cross, R. H. M., Van Bel, A. J. E., & Peter, C. I. (2000). Phloem loading in the sucrose-export-defective (*SXD-1*) mutant maize is limited by callose deposition at plasmodesmata in bundle sheath—vascular parenchyma interface. *Protoplasma*, 214(1-2), 65-72.
- Cheadle, V. I., & Whitford, N. B. (1941). Observations on the phloem in the Monocotyledoneae. I. The occurrence and phylogenetic specialization in structure of the sieve tubes in the metaphloem. *American Journal of Botany*, 623-627.
- Chen, X. Y., & Kim, J. Y. (2009). Callose synthesis in higher plants. *Plant signaling & behavior*, 4(6), 489-492.
- Chuaqui, R. F., Bonner, R. F., Best, C. J., Gillespie, J. W., Flaig, M. J., Hewitt, S. M., ... & Linehan, W. M. (2002). Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nature genetics*, 32, 509-514.
- Clavijo Michelangeli, J. A., Bhakta, M., Gezan, S. A., Boote, K. J., y Vallejos, C. E. (2013). From flower to seed: identifying phenological markers and reliable growth functions to model reproductive development in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant, cell & environment*, 36(11), 2046-2058.

- Clements, J., & Atkins, C. (2001). Characterization of a non-abscission mutant in *Lupinus angustifolius*. I. Genetic and structural aspects. *American Journal of Botany*, 88(1), 31-42.
- Coello, P., y Martínez-Barajas, E. (2014). The activity of SnRK1 is increased in *Phaseolus vulgaris* seeds in response to a reduced nutrient supply. *Frontiers in plant science*, 5.
- Coello, P., y Martínez-Barajas, E. (2016). Changes in nutrient distribution are part of the mechanism that promotes seed development under severe nutrient restriction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 99, 21-26.
- Collado, R., Bermúdez-Carballoso, I., García, L. R., Veitía, N., Torres, D., Romero, C., Martirena-Ramírez, A., y Angenon, G. (2015). Agrobacterium-mediated transformation of *Phaseolus vulgaris* L. using indirect organogenesis. *Scientia Horticulturae*, 195, 89-100.
- Critchley, J. H., Zeeman, S. C., Takaha, T., Smith, A. M., y Smith, S. M. (2001). A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 26(1), 89-100.
- Davidson, A., Keller, F., & Turgeon, R. (2011). Phloem loading, plant growth form, and climate. *Protoplasma*, 248(1), 153-163.
- Dong, X., Hong, Z., Sivaramakrishnan, M., Mahfouz, M., y Verma, D. P. S. (2005). Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 42(3), 315-328.
- Eleftheriou, E. P. (1985). Microtubules and root protophloem ontogeny in wheat. *Journal of cell science*, 75(1), 165-179.
- Ellinger, D., y Voigt, C. A. (2014). Callose biosynthesis in Arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Annals of Botany*, 114(6), 1349-1358.
- Esau, K. (1950). Development and structure of the phloem tissue. II. *The Botanical Review*, 16(2), 67.
- Esau K. (1977). *Anatomy of Seed Plants*. 2ª Edición. John Wiley and Sons. Canadá. 550 pp.
- Esau, K. (1978). Developmental features of the primary phloem in *Phaseolus vulgaris* L. *Annals of Botany*, 42(1), 1-13.
- Estrada, G., Guillén, G., Olivares, J. E., Díaz, C., Alvarado, X., y Sánchez, F. (2007). La transformación genética y genómica del frijol. *Biotechnología*, 14(3), 281-290.
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). 2016. *Panorama Agroalimentario Frijol 2016*.
- Fountain, D. W., Outred, H. A., Holdsworth, J. M., y Thomas, R. G. (1989). Seed Development in *Phaseolus vulgaris* L. cv Seminole I. Developmental Independence of Seed Maturation. *Plant Physiology*, 89(1), 333-340.
- Froelich, D. R., Mullendore, D. L., Jensen, K. H., Ross-Elliott, T. J., Anstead, J. A., Thompson, G. A., Thompson G. A., y Knoblauch, M. (2011). Phloem ultrastructure and pressure flow: sieve-element-occlusion-related agglomerations do not affect translocation. *The Plant Cell*, 23(12), 4428-4445.

- Furch, A. C., J. B. Hafke, A. Schulz y A. J. van Bel. 2007. Ca<sup>2+</sup>-mediated remote control of reversible sieve tube occlusion in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany*, 58(11), 2827-2838.
- Hammes, U. Z. (2016). Under pressure. *eLife*, 5, e18435.
- Hao, P., Liu, C., Wang, Y., Chen, R., Tang, M., Du, B., Zhu L y He, G. (2008). Herbivore-induced callose deposition on the sieve plates of rice: an important mechanism for host resistance. *Plant Physiology*, 146(4), 1810-1820.
- Hardham, A. R. (1976). Structural aspects of the pathways of nutrient flow to the developing embryo and cotyledons of *Pisum sativum* L. *Australian Journal of Botany*, 24(6), 711-721.
- Hong, Z., Zhang, Z., Olson, J. M., y Verma, D. P. S. (2001). A novel UDP-glucose transferase is part of the callose synthase complex and interacts with phragmoplastin at the forming cell plate. *The Plant Cell*, 13(4), 769-779.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. (a) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*. 2009; 37(1):1-13.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. (b) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protocols*. 2009; 4(1):44-57.
- Jensen, K. H., Mullendore, D. L., Holbrook, N. M., Bohr, T., Knoblauch, M., y Bruus, H. (2012). Modeling the hydrodynamics of phloem sieve plates. *Frontiers in plant science*, 3, 151.
- Jensen, K. H., Savage, J. A., y Holbrook, N. M. (2013). Optimal concentration for sugar transport in plants. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(83).
- Khan, D., Millar, J. L., Girard, I. J., Chan, A., Kirkbride, R. C., Pelletier, J. M., ... & Goldberg, R. B. (2015). Transcriptome atlas of the Arabidopsis funiculus a study of maternal seed subregions. *The Plant Journal*, 82(1), 41-53.
- Kim, Y. C., Nakajima, M., Nakayama, A., y Yamaguchi, I. (2005). Contribution of gibberellins to the formation of Arabidopsis seed coat through starch degradation. *Plant and Cell Physiology*, 46(8), 1317-1325.
- Knoblauch, M., y Peters, W. S. (2010). Münch, morphology, microfluidics—our structural problem with the phloem. *Plant, cell & environment*, 33(9), 1439-1452.
- Knoblauch, M., Knoblauch, J., Mullendore, D. L., Savage, J. A., Babst, B. A., Beecher, S. D., Dodgen, A. C., Jensen K. H., y Holbrook, N. M. (2016). Testing the Münch hypothesis of long distance phloem transport in plants. *Elife*, 5, e15341.
- Koh, E. J., Zhou, L., Williams, D. S., Park, J., Ding, N., Duan, Y. P., & Kang, B. H. (2012). Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with "Candidatus Liberibacter asiaticus". *Protoplasma*, 249(3), 687-697.
- Kong, L., Wang, F., Si, J., Feng, B., Zhang, B., Li, S., & Wang, Z. (2013). Increasing in ROS levels and callose deposition in peduncle vascular bundles of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under nitrogen deficiency. *Journal of plant interactions*, 8(2), 109-116.
- Lee, T. D., y Bazzaz, F. A. (1986). Maternal regulation of fecundity: non-random ovule abortion in *Cassia fasciculata* Michx. *Oecologia*, 68(3), 459-465.

- Lee, E. J., Matsumura, Y., Soga, K., Hoson, T., y Koizumi, N. (2007). Glycosyl hydrolases of cell wall are induced by sugar starvation in Arabidopsis. *Plant and cell physiology*, 48(3), 405-413.
- Lemoine, R., La Camera, S., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain J.L., Laloi M., Coutos-Thévenot P., Maurousset L., Faucher M., Girousse C., Lemonnier P., Parrilla J., Durand M. y Faucher, M. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- 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 P. Kachroo. (2013). The plant vascular system: evolution, development and Functions. *Journal of integrative plant biology*, 55(4), 294-388.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., & Ton, J. (2011). Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(2), 183-193.
- Manjunath, S., Lee, C. H. K., Van Winkle, P., & Bailey-Serres, J. (1998). Molecular and biochemical characterization of cytosolic phosphoglucomutase in maize expression during development and in response to oxygen deprivation. *Plant Physiology*, 117(3), 997-1006.
- Mawson, B. T., Steghaus, A. K., y Yeung, E. C. (1994). Structural development and respiratory activity of the funiculus during bean seed (*Phaseolus vulgaris* L.) maturation. *Annals of botany*, 74(6), 587-594.
- Miranda Colín, Salvador (1967). Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (Frijol Común). *Agrociencia*, 1 (2), 99-109.
- Mullendore, D. L., Windt, C. W., Van As, H., y Knoblauch, M. (2010). Sieve tube geometry in relation to phloem flow. *The Plant Cell*, 22(3), 579-593.
- Mustafiz, A., Singh, A. K., Pareek, A., Sopory, S. K., y Singla-Pareek, S. L. (2011). Genome-wide analysis of rice and Arabidopsis identifies two glyoxalase genes that are highly expressed in abiotic stresses. *Functional & integrative genomics*, 11(2), 293-305.
- Nakamura, R. R. (1986). Maternal investment and fruit abortion in *Phaseolus vulgaris*. *American Journal of Botany*, 1049-1057.
- Nakashima, J., W., Laosinchai, X.Cui, R. M. Brown. 2003. New insight into the mechanism of cellulose and callose biosynthesis: proteases may regulate callose biosynthesis upon wounding. *Cellulose*. 10(4), 369-389
- Nassar R. M. A., M.S. Boghdady, Y.M. Ahmed (2010). Botanical Studies on *Phaseolus Vulgaris* L. II-Anatomy of Vegetative And Reproductive Organs. *Journal of American Science*. 6(12): 218-229
- Nelson, D. y M. Cox (2008) Lehninger Principles of Biochemistry. 5a edición. W.H. Freeman and Company. Nueva York. 1158 pp.
- Ohashi-Ito, K., y Bergmann, D. C. (2007). Regulation of the Arabidopsis root vascular initial population by LONESOME HIGHWAY. *Development*, 134(16), 2959-2968.
- Ohkama-Ohtsu, N., Radwan, S., Peterson, A., Zhao, P., Badr, A. F., Xiang, C., y Oliver, D. J. (2007). Characterization of the extracellular  $\gamma$ -glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 49(5), 865-877.

- Öpik, H. (1968). Development of cotyledon cell structure in ripening *Phaseolus vulgaris* seeds. *Journal of Experimental Botany*, 19(1), 64-76.
- Peterson, C. A., y Rauser, W. E. (1979). Callose deposition and photoassimilate export in *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel, and zinc. *Plant physiology*, 63(6), 1170-1174.
- Pigeaire, A., Duthion, C., Turc, O., & Gonthier, J. (1986). Characterization of the final stage in seed abortion in indeterminate soybean, white lupin and pea. *Agronomie*, 6(4), 371-378.
- Rieu, I., Ruiz-Rivero, O., Fernandez-Garcia, N., Griffiths, J., Powers, S. J., Gong, F., ... y Phillips, A. L. (2008). The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. *The Plant Journal*, 53(3), 488-504.
- Rennie, E. A., y Turgeon, R. (2009). A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 14162-14167.
- Rosales-Serna R., Ramírez-Vallejo, P., Acosta-Gallegos, J. A., Castillo-González, F., y Kelly, J. D. (2000). Rendimiento de grano y tolerancia a la sequía del frijol común en condiciones de campo. *Agrociencia*, 34, 153-165.
- SAGARPA (06/05/2017) Aumenta 14 por ciento producción de frijol en México. <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/bajacalifornia/Boletines/2017/mayo/Documents/B1762017.PDF>
- Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I., Frise, E. et al. (2012), Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.
- Schussler, J. R., y Westgate, M. E. (1995). Assimilate flux determines kernel set at low water potential in maize. *Crop Science*, 35(4), 1074-1080.
- Stephenson, A. G. (1981). Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual review of ecology and systematics*, 12(1), 253-279.
- Sun, K., Hunt, K., y Hauser, B. A. (2004). Ovule abortion in Arabidopsis triggered by stress. *Plant Physiology*, 135(4), 2358-2367.
- Taiz L. y Zeiger E. (2010) Plant Physiology. 5ª Edición. Sinauer Associates. EUA. 782 pp.
- Tan, H., Xiang, X., Tang, J., & Wang, X. (2016). Nutritional functions of the funiculus in Brassica napus seed maturation revealed by transcriptome and dynamic metabolite profile analyses. *Plant Molecular Biology*, 92(4-5), 539-553.
- Thiele, K., Wanner, G., Kindzierski, V., Jürgens, G., Mayer, U., Pachel, F., y Assaad, F. F. (2009). The timely deposition of callose is essential for cytokinesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 58(1), 13-26.
- Thorne, J. H. (1981). Morphology and ultrastructure of maternal seed tissues of soybean in relation to the import of photosynthate. *Plant Physiology*, 67(5), 1016-1025.
- Tucker, M. L., Sexton, R., del Campillo, E., & Lewis, L. N. (1988). Bean abscission cellulase characterization of a cDNA clone and regulation of gene expression by ethylene and auxin. *Plant Physiology*, 88(4), 1257-1262.

- van Bel, A. J. (2003). The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell & Environment*, 26(1), 125-149.
- van Bel A.J.E y J.B. Hafke. Physiochemical Determinants of Phloem Transport (2011) En: Holbrook, N. M., y Zwieniecki, M. A. (Eds.). (2011). Vascular transport in plants. Academic Press.
- Voysest, O. (2000). Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): legado de variedades de América Latina 1930-1999 (No. 321). Ciat.
- Ward, J. M., Kühn, C., Tegeder, M., y Frommer, W. B. (1997). Sucrose transport in higher plants. *International review of cytology*, 178, 41-71.
- Weber, H., Borisjuk, L., y Wobus, U. (2005). Molecular physiology of legume seed development. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 253-279
- Xie, B., Wang, X., & Hong, Z. (2010). Precocious pollen germination in Arabidopsis plants with altered callose deposition during microsporogenesis. *Planta*, 231(4), 809-823.
- Xie, B., Wang, X., Zhu, M., Zhang, Z., y Hong, Z. (2011). CalS7 encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. *The Plant Journal*, 65(1), 1-14.
- Xu, S. M., Brill, E., Llewellyn, D. J., Furbank, R. T., y Ruan, Y. L. (2012). Overexpression of a potato sucrose synthase gene in cotton accelerates leaf expansion, reduces seed abortion, and enhances fiber production. *Molecular Plant*, 5(2), 430-441.
- Yang, W. C., Ye, D., Xu, J., y Sundaresan, V. (1999). The SPOROCTELESS gene of Arabidopsis is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes & Development*, 13(16), 2108-2117.
- Yu, S. M. (1999). Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. *Plant Physiology*, 121(3), 687-693.
- Zabotin, A. I., T. S Barysheva, O. I. Trofimova., V. V. Lozovaya, J. Widholm. (2002). Regulation of callose metabolism in higher plant cells in vitro. *Russian journal of plant physiology*, 49(6), 792-798.