



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Orgánica

**Cambios estructurales en polisacáridos de pared celular en
semillas de soja (*Glycine max*) en desarrollo, cultivadas a
campo, producidos por el ataque de la chinche verde
(*Nezara viridula*) como parte de los mecanismos de defensa**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
de Química Orgánica

Químico Franco Andrés Arias Ilabaca

Directora de tesis: **Dra. Marina Ciancia**
Co-Director de tesis: **Dr. Jorge A. Zavala**
Consejero de Estudios: **Dr. Carlos Stortz**

Lugar de trabajo: Cátedra de Química de Biomoléculas, Departamento de Biología Aplicada
y Alimentos, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2024

Cambios estructurales en polisacáridos de pared celular en semillas de soja (*Glycine max*) en desarrollo, cultivadas a campo, producidos por el ataque de la chinche verde (*Nezara viridula*) como parte de los mecanismos de defensa

La soja (*Glycine max*) es un cultivo de importancia en Argentina y en todo el mundo por el contenido nutricional de sus semillas. Los polisacáridos de las paredes celulares de tegumentos y cotiledones han sido estudiados anteriormente, pero no existe información sobre los polisacáridos de estos tejidos en etapa R5-R6 del ciclo reproductivo de la planta, que es cuando las semillas son particularmente susceptibles al ataque de herbívoros, como la chinche verde *Nezara viridula*, una de las principales plagas del cultivo de soja.

En este trabajo, tegumentos y cotiledones de semillas obtenidas en diferentes condiciones (sometidas al ataque de las chinches, rociadas con solución de ácido salicílico y control) se extrajeron secuencialmente con solventes acuosos de alcalinidad creciente y los polisacáridos aislados se estudiaron en detalle. Aquellos extractos con mayores rendimientos se purificaron y se estudió la estructura fina de las fracciones aisladas mediante métodos químicos y espectroscopía de RMN. Para los tegumentos, se extrajeron cantidades importantes de galactomananos con agua y con KOH 4M, con relación molar Gal:Man, 1:1,8 y 1:3,0, respectivamente. Además, en todos los extractos se obtuvieron cantidades importantes de pectinas con diferentes proporciones de homogalacturonanos y ramnogalacturonanos. La celulosa fue identificada como componente principal del residuo insoluble final. También, se realizaron digestiones enzimáticas con saliva de chinche sobre los tegumentos, que sugirió la presencia de actividad de β -D-glucanasa y β -D-mananasa en la saliva. Para los cotiledones se identificaron arabinogalactanos a lo largo de toda la extracción secuencial, que presentaban diferentes características y contenidos en las cadenas de arabinanos y galactanos entre los tratamientos aplicados. Estos resultados aportan una nueva mirada al proyecto del grupo de trabajo que tiene como objetivo comprender la susceptibilidad de las semillas de soja a diferentes plagas, a través del conocimiento de la composición detallada y estructural de sus paredes celulares, como aporte al mejoramiento vegetal.

Palabras clave: pared celular, soja, polisacáridos, herbivoría, pectina, hemicelulosa

Structural changes in cell wall polysaccharides in developing soybean (*Glycine max*) seeds grown in the field, caused by the attack of the green stink bug (*Nezara viridula*) as element of the defense response

Soybean (*Glycine max*) is an important crop in Argentina and worldwide due to the nutritional content of its seeds. Polysaccharides of the cell walls of teguments and cotyledons have been studied before, but there is no information on the polysaccharides of these tissues in the R5-R6 stage of the plant's reproductive cycle, which is when the seeds are particularly susceptible to attack by herbivores, such as the green stink bug *Nezara viridula*, one of the main pests of soybean cultivation.

In this work, teguments and cotyledons from seeds obtained in different conditions (submitted to stink bug attack, sprayed with salicylic acid solution, and control) were extracted sequentially with aqueous solvents of increasing alkalinity, and the polysaccharides isolated were studied in detail. Those extracts with higher yields were purified, and the fine structure of the fractions isolated was studied using chemical methods and NMR spectroscopy. For teguments, significant amounts of galactomannans were extracted with water and with 4M KOH with Gal:Man molar ratio of 1:1.8 and 1:3.0, respectively. In addition, important amounts of pectins with different proportions of homogalacturonans and rhamnogalacturonans I were obtained in all extracts. Cellulose was identified as the major component of the final insoluble residue. Also, enzymatic digestions were performed on the teguments with stink bug saliva, which suggested that β -D-glucanase and β -D-mannanase activity was present in saliva. For the cotyledons, arabinogalactans were identified throughout the sequential extraction, which presented different characteristics and contents of arabinan and galactan chains between the treatments applied. These results provide a new point of view for the project of the research group, that aims to understand the susceptibility of soybeans to different pests, through the knowledge of the detailed structural composition of their cell walls, as a contribution to plant breeding improvement.

Key words: cell wall; soybean; polysaccharides; herbivory, pectin, hemicellulose

A Juan Pablo, Vico y Pascual

La mejor familia que me pudo tocar

Agradecimientos

A mi hogar, a Vico y Pascual por siempre esperarme sin importar nada y a Juan Pablo, que admiro profundamente, por ser mi persona incondicional que me hace sentir seguro de mí mismo.

A mis padres, German y Ofelia, por alentarme, ayudarme y estar todos estos años, y por confiar en mí.

A mi hermana que amo con todo mi corazón, a su hermosa familia, por su incondicionalidad y amor.

A todo el equipo docente de la Catedra de Química de Biomoléculas: Virginia, Lucía, Camila, Martín, Rodrigo, Patricia, Paula, Gonzalo, Bruno, Alexa, gracias por formar parte de este lindo grupo. A los chicos nodocentes: Lorena, Alberto, Esteban, Liliana y Martin, gracias por contar con ustedes.

A todo el equipo docente y nodocente de la Catedra de Bioquímica, Vane, Bruno, Mariana, Gera, Lali, y todos los demás, por siempre estar dispuestos a ayudar.

Especialmente a mis directores,

mi Codirector Jorge Zabala, por todos los aportes, perspectivas y conocimientos, por ser un gran investigador y por todo su tiempo invertido en esta línea de investigación

mi Directora Marina Ciancia, por los invaluable conocimientos que compartió conmigo durante el desarrollo de toda esta tesis, gracias por su tiempo y profesionalismo, y por su confianza.

Gracias a ambos por ser los tutores de mi formación.

A mis amigos: Juan, Geraldina y sus hermosos hijos.

A Joni, Fede, Brai, Lucho, Niel, Lucho, Gus. y al resto del equipo, Gracias por todos los momentos y por todo el tiempo cultivando la amistad.

A Geraldine, Esteban, Erick, Francisco, Nick, por seguir estando presente a pesar de la distancia.

Gracias a TODXS!!!

ÍNDICE

Capítulo 1: Introducción

1.1	<i>Glycine max</i>	2
1.2	La pared celular	6
1.2.1	La pared celular vegetal	6
1.2.2	Componentes de la pared celular vegetal	8
1.2.2.1	Polisacáridos de pared celular	8
1.2.2.2	Otros componentes de la pared celular	21
1.2.3	Pared celular de <i>Glycine max</i>	24
1.3	Defensa vegetal	28
1.4	<i>Nezara viridula</i> como plaga en cultivos de soja	32
1.5	Objetivos	35
1.6	Hipótesis	35
1.7	Referencias	36

Capítulo 2: Materiales y Métodos

2.1	Consideraciones generales	44
2.2	Material utilizado	45
2.3	Extracción de los polisacáridos de pared celular	49
2.4	Análisis químico de polisacáridos de la pared celular	51
2.4.1	Métodos colorimétricos	51
2.4.2	Determinación de lignina Klason	56
2.4.3	Determinación de la composición en monosacáridos neutros	56
2.4.4	Análisis por metilación	59
2.4.5	Cromatografía de intercambio aniónico DEAE Sephadex A-25	59
2.4.6	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	60

2.4.7 Hidrolisis parciales para aumentar la solubilidad en agua	61
2.5 Tratamientos enzimáticos	62
2.6 Obtención de saliva de chinche y tratamiento de paredes celulares con la misma.....	63
2.7 Estimación de polisacáridos componentes de extractos	65
2.8 Análisis estadístico	65
2.9 Referencias	66

Capítulo 3: Cambios en las paredes celulares de tegumentos de semillas de soja de la variedad Williams

3.1 Introducción	69
3.2 Objetivos	70
3.3 Obtención de tegumentos	70
3.4 Resultados de la caracterización química del material	72
3.5 Discusión de resultados	96
3.5.1 Caracterización química general	96
3.5.2 Contenido de hidroxiprolina	97
3.5.3 Columna de intercambio aniónico para extractos acuosos	98
3.5.4 Columna de intercambio aniónico para extractos de Na ₂ CO ₃	100
3.5.5 Extractos obtenidos en medio alcalino fuerte	102
3.5.6 Estimación Global de los polisacáridos presentes	106
3.6 Conclusiones	109
3.7 Referencias	111

Capítulo 4: Cambios en las paredes de tegumentos de semillas de soja por tratamiento con saliva de chinche verde

4.1 Introducción	118
4.2 Objetivos	119

4.3 Obtención de residuos a tratar	120
4.4 Resultados de la caracterización química general	122
4.5 Discusión de resultados	126
4.5.1 Tratamientos enzimáticos en RIA y tegumentos	126
4.5.2 Extracción secuencial acortada de las muestras tratadas enzimáticamente	130
4.6 Conclusiones	136
4.7 Referencias	137

Capítulo 5: Cambios en las paredes celulares de cotiledones de semillas de soja de la variedad Williams

5.1 Introducción	142
5.2 Objetivos	143
5.3 Obtención de los cotiledones	144
5.4 Caracterización química del material	145
5.5 Discusión de resultados	161
5.5.1 Almidón, tratamientos enzimáticos y determinaciones de compuestos que no son hidratos de carbono	161
5.5.2 Caracterización química general	165
5.5.3 Caracterización estructural fina	173
5.6 Conclusiones	177
5.7 Referencias	179

Capítulo 6: Conclusiones generales y perspectivas

Caracterización estructural de los polisacáridos componentes de tegumentos	186
Resultados de los ensayos sobre tegumento con saliva de chinche	189
Caracterización estructural de los polisacáridos componentes de cotiledones	191
Consideraciones finales	192
Referencias	194

Abreviaturas

AG/s: Arabinogalactano/s

AGP/s: Arabinogalactano-proteína/s

AN: Azúcares neutros

Ara: Arabinosa

AT: Azúcares totales

AU: Ácidos urónicos

Fuc: Fucosa

Gal: Galactosa

GalA: Ácido galacturónico

GalAMe: Éster metílico de ácido galacturónico

Glc: Glucosa

GlcA: Ácido glucurónico

GM/s: Galactomanano/s

Gme: Grado de metilación de los ácidos urónicos

GX/s: Glucuronoxilano/s

HG/s: Homogalacturonano/s

HRGP/s: Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina

Hyp: Hidroxiprolina

JA: Ácido jasmónico

Man: Manosa

PG: endo-Poligalacturonasa (E-GALUSP®)

Rha: Ramnosa

RGI: Ramnogalacturonano del tipo I

RG II: Ramnogalacturonano del tipo II

RIA : Residuo insoluble en alcohol

SA: Ácido salicílico

XGA/s: Xilogalacturonano/s

XG/s: Xiloglucano/s

Xyl: Xilosa

CAMBIOS ESTRUCTURALES EN POLISACÁRIDOS DE
PARED CELULAR EN SEMILLAS DE SOJA (*GLYCINE
MAX*) EN DESARROLLO, CULTIVADAS A CAMPO,
PRODUCIDOS POR EL ATAQUE DE LA CHINCHE VERDE
(*NEZARA VIRIDULA*) COMO PARTE DE LOS
MECANISMOS DE DEFENSA

Franco Andrés Arias Ilabaca

CAPÍTULO 1

Introducción General

1.1 Glycine max

La soja [*Glycine max* (L.) Merrill] o soya es una especie de la familia de las leguminosas (Fabaceae) cultivada ampliamente por sus semillas, las cuales contienen proteínas (36%), hidratos de carbono (30%) y aceite (18%), dependiendo de la variedad cultivada, las características geográficas de los suelos cultivados y el año de cosecha [1]. Gracias a su composición química única, la soja, es fuente rica en componentes nutricionales. Su composición proteica es la más alta entre legumbres y cereales al igual que su contenido de aceite, siendo entre las legumbres sólo superada por el maní. Otros componentes valiosos nutricionalmente que se encuentran en la soja incluyen polisacáridos, fosfolípidos, vitaminas, minerales, oligosacáridos e isoflavonoides [2]. Se ha informado que estos últimos juegan roles esenciales en la prevención de ciertos tipos de cáncer y en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares [3]. La soja es un cultivo de importancia mundial debido a la amplia gama de productos industriales y consumibles que se derivan del mismo, entre los cuales destacan aquellos destinados a alimentación animal y humana, biocombustibles e incluso productos nutracéuticos aislados de las semillas [4].

Históricamente la planta de soja es autóctona de oriente (China). Antes de los años 70 no había sido domesticada y las necesidades de la sociedad humana no se habían puesto en el foco de las investigaciones referidas a la soja. Incluso, durante la primera mitad del siglo XX, la producción de este cultivo se centraba principalmente en oriente; China, Indonesia, Japón y Corea eran los principales productores. Fue durante la década del cincuenta, cuando los cultivos comenzaron a ser importantes en Estados Unidos sobrepasando a China en hectáreas de cultivo, logrando posicionar el desarrollo industrial occidental de la soja [5].

Industrialmente, uno de los productos con mayor importancia es la harina de soja, materia prima que contiene alto porcentaje de proteínas, siendo una de las principales fuentes de alimento para la producción de carne de cerdo, aves de corral, huevos, pescado, carne de res y leche. Alrededor de 98% de harina de soja es utilizada para este fin, mientras que la harina de soja restante se usa en forma de

concentrados, aislados de proteínas y proteínas texturizadas para consumo humano. Otro producto importante es el aceite de soja que se utiliza para producción de margarinas, mayonesas y diversos aderezos de consumo humano [6].

La soja, en la actualidad, es el cultivo de mayor importancia económica para países como Estados Unidos, Brasil y Argentina, donde se concentra aproximadamente el 90% del cultivo mundial de soja. Alrededor del mundo, las prácticas agronómicas en torno a la soja se han incrementado ampliamente en las últimas décadas, cuadruplicando su área de cultivo desde 1971 hasta 2014 [4]. Específicamente países como Brasil y Argentina son aquellos que han sufrido mayor impacto ambiental con dicho crecimiento, produciendo un aumento del área dedicada al cultivo de soja, y específicamente, en el campo argentino de 36.000 ha a 19.000.000 ha en el periodo indicado anteriormente. En Argentina durante el 2016, el área dedicada a cultivar granos fue de 39 millones de hectáreas, de las cuales el 52% estaba dedicado a la soja [7]. Dicho aumento tan acelerado en la producción mundial (Figura 1.1) sugiere el inevitable surgimiento de una problemática ambiental, como lo es la deforestación, en aquellos países con aumento exponencial de la producción, como lo son Brasil y Argentina. Según De Sy et al. [8], éste sería uno de los factores ambientales y ecológicos que más han afectado al continente sudamericano.

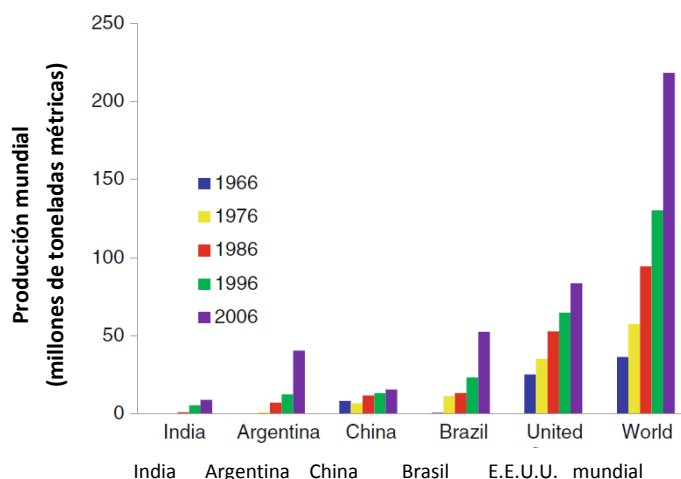


Figura 1.1: Volumen de producción de poroto de soja en los países con mayor producción a nivel mundial en millones de toneladas métricas desde 1966 a 2006, según la FAO (Food and Agriculture Organization) [4].

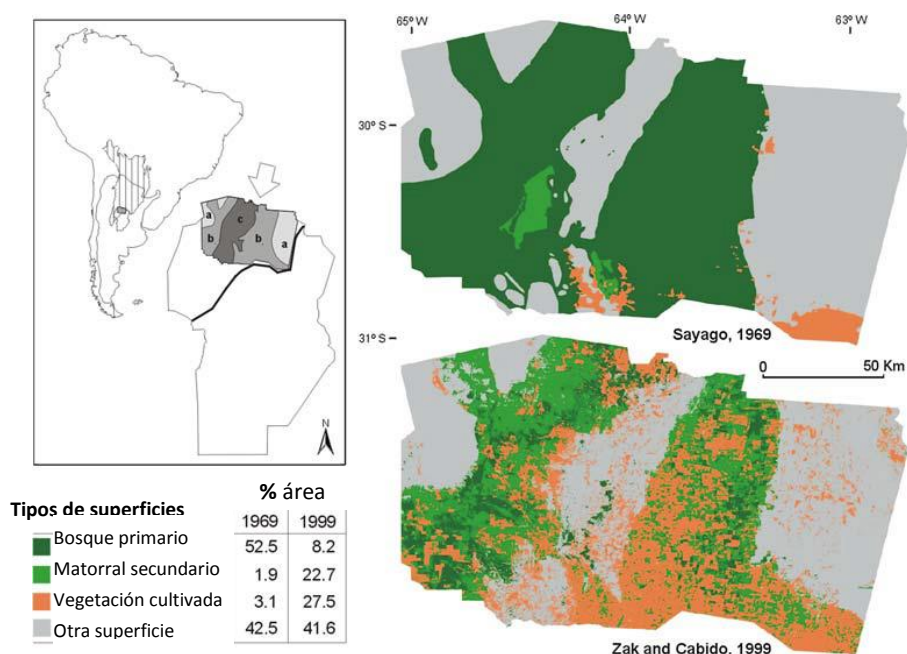
Otros componentes interesantes que contienen los granos de soja son los hidratos de carbono, que pueden ser divididos en dos grandes grupos según las funciones fisiológicas que presentan en la planta. Aquellos que no presentan una función estructural, como hidratos de carbono de bajo peso molecular, oligosacáridos y polisacáridos de reserva [6]. Algunos de los azúcares de este grupo presentes en mayor proporción son estaquiosa, rafinosa y sacarosa, representando esta última alrededor de un 60% de los hidratos de carbono no estructurales que componen las semillas [9]. El otro grupo, corresponden a aquellos que tienen una función estructural, incluyendo los componentes de la fibra dietaria compuesta principalmente por polisacáridos pertenecientes a la pared celular. Este segundo grupo posee características químicas y nutricionales que han sido estudiadas durante los últimos años. Se encontró una amplia gama de propiedades, destacando por ejemplo, efectos antiinflamatorios y anticancerígenos sobre el sistema digestivo humano [10].

Los hidratos de carbono provenientes de la soja no poseen la misma importancia industrial y agropecuaria que, por ejemplo, la harina o el aceite de soja, sin embargo, puede ser de interés estudiarlos desde un punto de vista químico y molecular. Los hidratos de carbono juegan un papel fundamental en los procesos estructurales y metabólicos de la planta, principalmente, aquellos que forman parte de las paredes celulares presentes en los granos de soja. La pared celular desempeña un papel importante en la determinación de la expansión, el crecimiento, sostén y la forma de las células vegetales y de la planta misma, otorgando rigidez, soporte elástico y presión de turgencia. Además, los productos de descomposición de la pared celular constituyen señales de desarrollo. También, la pared celular está en la primera línea de defensa, formando una barrera significativa para la penetración de patógenos y vectores de patógenos [11]–[13]. Las paredes celulares, su composición, estructura y la variación de los polisacáridos que las componen fueron estudiadas detalladamente a lo largo de esta investigación.

El desarrollo de este trabajo se sustenta también en el punto de vista de química ecológica y su capacidad para lograr producir un mejoramiento vegetal en los cultivos de soja, enfocándose en aquellos resultados generados a partir de los cambios químicos y estructurales producidos en las paredes celulares de granos cultivados, intentando generar conocimiento para futuras aplicaciones y/o tecnologías que

puedan emplearse en este campo de aplicación. Es importante señalar que actualmente casi el 100% de los cultivos de soja corresponde a variedades genéticamente modificadas, aplicando prácticas de monocultivos en muchos casos. Dichas tecnologías agrícolas, que aumentan el volumen productivo en la región, conllevan problemas ambientales, como la disminución de la biodiversidad, deforestación, degradación generalizada del ecosistema y cambios en la composición de los suelos explotados. En la misma línea, otros indicadores útiles para medir la sustentabilidad de los cultivos de granos de soja son la eficiencia de carbono y de energía, que se definen como la cantidad de alimentos producidos por unidad de gases de efecto invernadero emitidos y la energía utilizada, pudiendo contabilizar factores relevantes de impacto ambiental relacionados directamente con la producción de soja (o de cualquier cultivo industrial), como lo son los niveles de emisión de gases de efecto invernadero y el uso de los recursos energéticos [7][8][14][15].

Debido al aumento exponencial de los cultivos de soja en la década del '90 en la zona central de la Argentina, ha mermado la superficie que ocupaban los bosques nativos de la zona, produciendo deforestación y con ello las complicaciones ambientales que conlleva. Dicha reducción se observa en la Figura 1.2 [14].



En este ámbito, es preciso pensar en mejoramiento vegetal no sólo productivo, sino también desde un punto de vista ecológico, social y climático. Lo anterior va de la mano de la intención de mejorar simultáneamente la producción y rendimientos desde un punto de vista agroecológico, comprendiendo los mecanismos de defensas involucrados sobre las principales plagas y herbívoros que logran disminuir dichos rendimientos, afectando directamente el mercado nacional de la soja.

Esta investigación se apoya en la necesidad de generar conocimiento para posteriormente lograr equilibrar los rendimientos productivos con los impactos ambientales que genera el cultivo extensivo de soja de la manera más eficiente, en el contexto de la importancia que denota la soja para el campo argentino.

1.2 La Pared Celular

La pared celular es un complejo macromolecular que envuelve a la membrana plasmática de células bacterianas, fúngicas, de algas y vegetales. Corresponde a un compartimiento extracelular que genera la red de soporte y rigidez celular. Posee variadas funciones de vital importancia para las células, como participar en la regulación osmótica, interaccionar con el medio extracelular, actuar en procesos de diferenciación celular en plantas, intervenir como barrera de difusión de macromoléculas e invasión de patógenos que buscan alcanzar la membrana plasmática y el interior de la célula, siendo una matriz altamente selectiva [13].

1.2.1 Pared Celular Vegetal

La pared celular en plantas está formada por una compleja matriz de polisacáridos y proteínas estructurales, con largas fibras entrelazadas y enrolladas en varios niveles, donde decenas de cadenas de celulosa conforman las **microfibrillas**

de celulosa, entrecruzadas a su vez con cadenas de **hemicelulosas** y cubiertas por una capa menos rígida llamada **laminilla o lámina media** formada principalmente por **pectinas** (Figura 1.3).

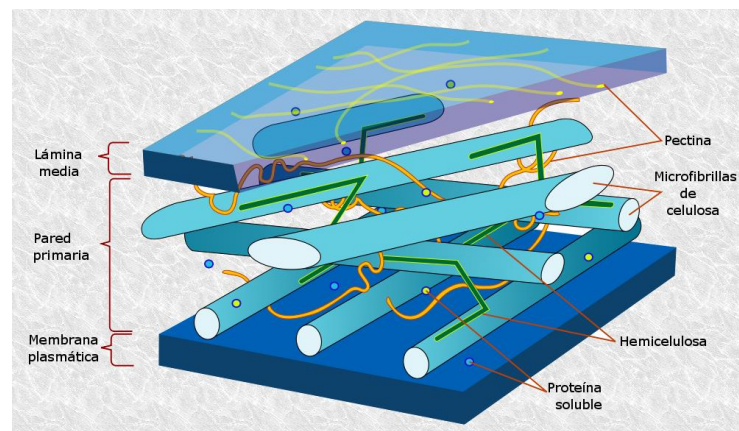


Figura 1.3: Diagrama de la pared celular vegetal.

La pared es una matriz dinámica: facilita y regula el crecimiento y la división celular en los tejidos, determina mecánicamente el tamaño y forma celular, participa directamente para que las células desarrollen diferenciación en aquellos tejidos en expansión. La diferenciación y expansión coordinadas de las células se logra a través de cambios continuos en la estructura de la pared que se está desarrollando, manteniéndose metabólicamente activa durante los periodos en que se despliegan estos procesos. Durante la mitosis, el aparato de Golgi sintetiza los polisacáridos que formarán parte de la matriz de la pared, estos componentes fibrilares generados se cortan enzimáticamente por la acción de glicanasas específicas y la presión osmótica interna de la célula los va empujando para ir depositándolos de manera uniforme a lo largo de toda la nueva pared en crecimiento, comenzando desde la superficie interna y avanzando hacia el exterior, formando una capa altamente estratificada y reticulada. Primero, se depositan aquellos polímeros que conforman la laminilla media, capa exterior que actúa como módulo de unión entre las células contiguas. A medida que el crecimiento continúa se comienza a formar la **pared primaria**: microfibrillas de celulosa unidas a través de glicanos entrecruzantes (hemicelulosas), insertas en una matriz de pectinas y proteínas estructurales. Posteriormente, en algunas células específicas se forma la **pared secundaria**, situada entre la membrana plasmática y la

pared primaria. Suele tener mayor espesor y ser más rígida debido a la presencia de lignina, además de altos contenidos de celulosa y mayor grado de cristalinidad respecto a la pared primaria [16][18].

1.2.2 Componentes de la Pared Celular Vegetal.

1.2.2.1 Polisacáridos de Pared Celular

Existen tres grandes grupos dentro de los cuales se pueden clasificar los polisacáridos que componen las paredes celulares: celulosa, hemicelulosas (o glicanos de entrecruzamiento) y pectinas.

La celulosa es el polisacárido más abundante en los vegetales, se encuentra tanto en las paredes primarias como en paredes secundarias, representando entre 20% - 30% y llegando incluso hasta un 50% en relación al peso seco de la misma. Su composición química es bastante simple, es una cadena lineal de un homopolímero constituido por unidades de D-glucopiranosas enlazadas a través de uniones β -(1 $\rightarrow$ 4) (Figura 1.4). Estas cadenas interactúan y se estabilizan a través de puentes de hidrógeno. Cada unidad está dispuesta en 180 ° respecto de la adyacente.

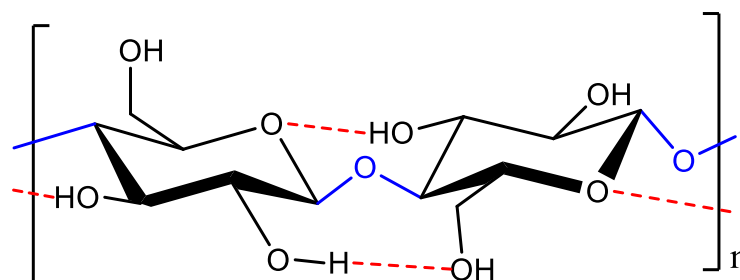


Figura 1.4: Celulosa, homopolisacárido constituido por unidades de D-glucopiranosas enlazadas a través de uniones β (1 $\rightarrow$ 4).

El grado de polimerización que presenta varía de 2.000 a 6.000 en paredes primarias y mayor que 10.000 en paredes secundarias. La biosíntesis de celulosa se lleva a cabo en las membranas plasmáticas a través de los complejos de celulosa sintasa (CSC, por sus siglas en inglés) que tiene forma de roseta y produce generalmente 24 cadenas lineales que interaccionan por medio de puentes de hidrógeno entre sí, generando estructuras cristalinas llamadas microfibrillas [19], que son las responsables principales de asegurar la rigidez de la pared. Las cadenas individuales de celulosa poseen miles de unidades monoméricas que al formar las microfibrillas comienzan y terminan en lugares diferentes permitiendo así que la longitud de cada microfibrilla sea de cientos de micrómetros [17][20][21].

Las hemicelulosas o glicanos de entrecruzamiento se encuentran, tanto en las paredes primarias, como en las secundarias. Corresponden a varios grupos de heteropolisacáridos que se unen a las microfibrillas de celulosa a través de puentes de hidrógeno, contribuyendo al fortalecimiento de la pared celular mediante estas interacciones. A diferencia de las cadenas de celulosa, estos glicanos suelen ser ramificados. El término hemicelulosa fue acuñado debido a la similitud estructural que tiene con la celulosa con enlaces glicosídicos β -(1 $\rightarrow$ 4) entre las unidades que conforman su cadena principal, pudiendo ser glucanos, mananos o xilanos. A diferencia de la celulosa, las hemicelulosas varían en su composición y estructura dependiendo de la especie vegetal, la etapa de desarrollo y el tipo de tejido. Existen subgrupos o familias para su clasificación dependiendo de cuál sea la unidad monosacáridica que forma su cadena principal, las ramificaciones y otros detalles estructurales. Los **xiloglucanos (XGs)** son la familia más abundante de hemicelulosas de pared primaria de dicotiledóneas, corresponden a una cadena principal de β -D-glucopiranosas enlazadas a través de uniones β -(1 $\rightarrow$ 4) y con altos porcentajes (~75%) de ramificaciones en posición O-6 con unidades de α -D-xilopiranosas. Algunas de estas unidades de xilosa se encuentran sustituidas en posición O-2 por unidades de β -D-galactopiranosas y en algunas especies están sustituidas por unidades de α -L-arabinofuranosa (por ejemplo, aquellas de los órdenes Solanales y Lamiales). A su vez, la unidad de galactosa puede encontrarse acetilada en O-3 y O-4, además de sustituida en O-2 por α -L-fucopiranosas. Se ha desarrollado una convención para denotar estas cadenas laterales más comunes de los xiloglucanos con una sola letra (Figura 1.5 A). Aquellas cadenas son:

G = unidad de glucosa sin ramificar.

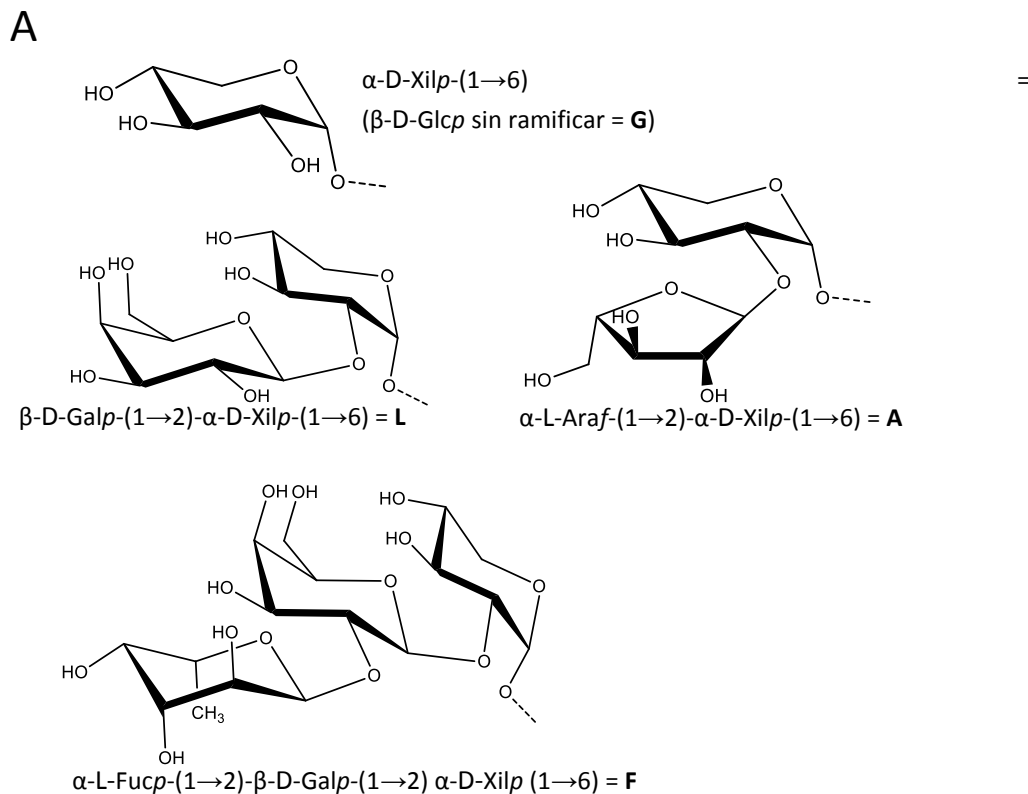
X = unidad de glucosa ramificada con α -xilosa en 6

L = unidad de glucosa ramificada con α -xilosa en 6 unida a β -galactosa en 2

A = unidad de glucosa ramificada con α -xilosa en 6 unida a α -arabinosa en 2

F = unidad de glucosa ramificada con α -xilosa en 6 unida a β -galactosa en 2 unida a α -fucosa en 2

Además, algunas unidades de β -galactosa, presentes en las cadenas laterales de los XGs pueden presentar grupos acetilo en posiciones O-3 y/o O-4. En la Figura 1.5 B se muestra las estructuras de un típico xiloglucano de las paredes primarias de las angiospermas (plantas que producen flores) [20][22][23].



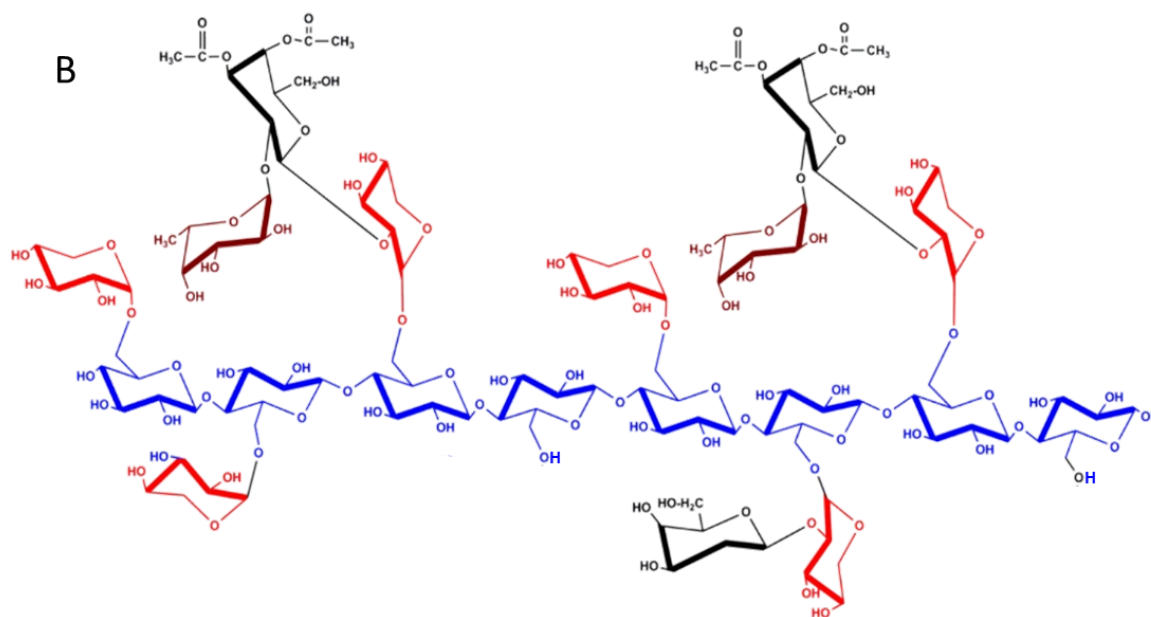


Figura 1.5: Estructuras químicas de xiloglucanos. A: Cadenas laterales descritas según una convención de una letra para denotar las diferentes cadenas laterales presentes (algunos autores utilizan la letra “S” en lugar de “A” para la cadena = α -L-Araf (1 $\rightarrow$ 2) α -D-Xilp (1 $\rightarrow$ 6). B: Cadena principal y ramificaciones de un xiloglucano de pared primaria de dicotiledóneas.

Los **xilanos** son otra familia de glicanos de entrecruzamiento y, al igual que los XGs, pueden estar constituidos de formas y proporciones diversas según la especie y el tipo de tejido. Todos los xilanos, están formados, por una cadena principal de unidades de β -D-xilopiranosas enlazadas a través de uniones glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4). En paredes secundarias de especies de las dicotiledóneas, el esqueleto principal de xilano se encuentra sustituido en la posición O-2 de las unidades de xilosa por ácido α -D-glucurónico o ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico. Estos **glucuronoxilanos** (GXs), son los glicanos de entrecruzamiento predominantes en estas especies, correspondiendo al 20% en peso del total de pared, aproximadamente. También están sustituidos con grupos O-acetilo directamente sobre los residuos de xilosa del esqueleto principal, pudiendo llegar a sustituir más de la mitad de dichos residuos, donde hasta un 30% se encontraría en la posición O-3 y un 25% en la posición O-2 [24].

En monocotiledóneas, incluyendo palmas y gramíneas (commelinoides), los xilanos se encuentran sustituidos por unidades de α -L-arabinofuranosa en posición O-

2 y/o O-3, además de tener en menor proporción unidades de ácido glucurónico en posición O-2 en aquellos residuos de la cadena principal que no posean las ramificaciones de arabinosa. También pueden encontrarse, como en los GXs, grupos acetilo unidos a la cadena principal de xilanos. Este tipo de hemicelulosas se conocen como **glucuronoarabinoxilanos** (GAXs) y para estas especies corresponde a los glicanos de entrecruzamiento mayoritarios representando 20 - 40% p/p del total de las paredes primarias y 40 - 50% de paredes secundarias. Adicionalmente, pueden estar sustituidos por ácido ferúlico en la posición O-5 de las cadenas laterales de arabinofuranosa, que serían la forma de unión covalentemente de xilanos a polímeros de lignina en estas especies de commelinoides (Figura 1.6 b). Para aquellas monocotiledóneas que no pertenecen a las commelinoides, dicha sustitución se encuentra comúnmente en posición O-2 (Figura 1.6-c). Estos últimos GAXs también pueden encontrarse en paredes primarias de especies dicotiledóneas pero suelen ser hemicelulosas minoritarias, aproximadamente 5% del peso seco total de la pared [22][25].

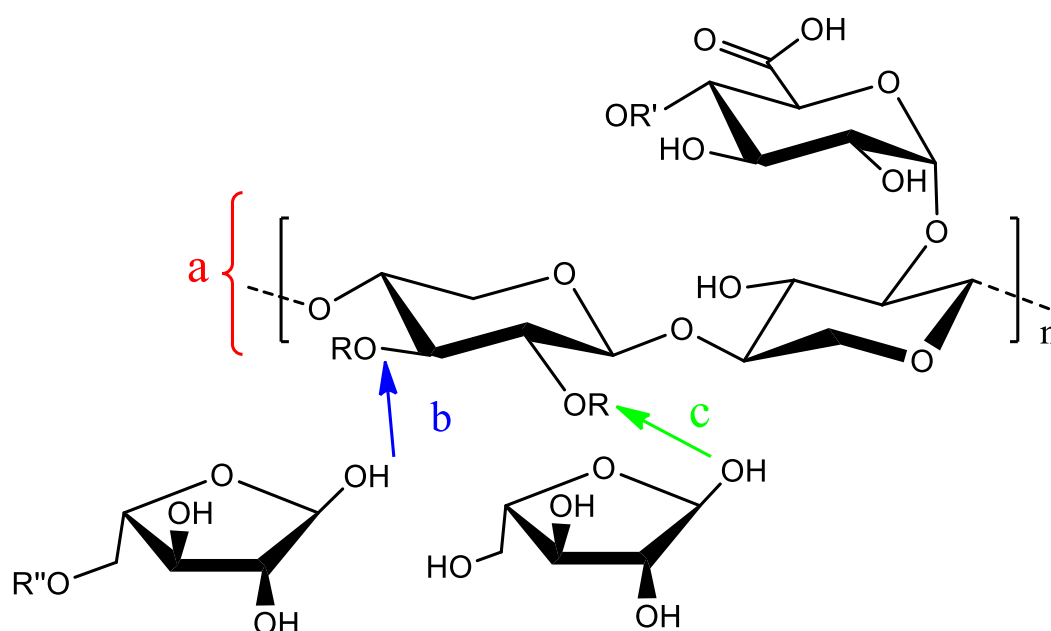


Figura 1.6: Estructuras químicas de xilanos (GX, GAXs): esqueleto principal de unidades de β -D-Xilp (1 $\rightarrow$ 4), (R = H, O-acetilo) **a:** ramificaciones α -D-GlcA en posición O-2 en GXs (R' = H, O-Me). **b:** ramificación de α -L-Araf en posición O-3 predominante en GAXs en especies commelinoides, como las gramíneas (R'' = H, ácido ferúlico). **c:** ramificaciones α -L-Araf en posición O-2 para GAXs en resto de monocotiledóneas y paredes primarias de dicotiledóneas.

Otros tipos de glicanos de entrecruzamiento que se encuentran en paredes son los **glucanos mixtos**. Corresponden a cadenas lineales constituidas por unidades de β -D-glucopiranososa enlazadas a través de uniones glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4) mezclados. Este tipo de homopolisacárido se encuentra presente en especies provenientes del orden de las Poales, como los cereales, principalmente en etapas de desarrollo. Estos glucanos mixtos suelen tener proporción entre 1:2 hasta 1:3 en cuando a la abundancia enlaces tipo β -(1 $\rightarrow$ 3) y β -(1 $\rightarrow$ 4), respectivamente (Figura 1.7) [25].

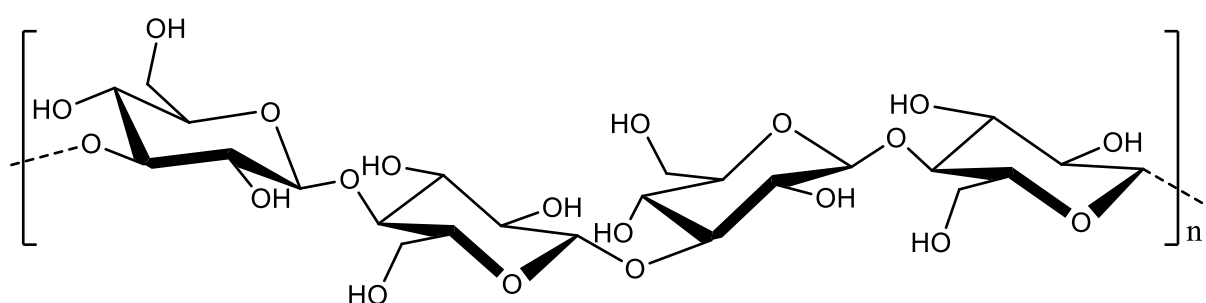


Figura 1.7: Estructura química de los glucanos mixtos provenientes de paredes presentes en especies del orden de las Poales, homopolisacárido constituido por unidades de β -D-glucopiranososa enlazadas a través de uniones (1 $\rightarrow$ 3) y (1 $\rightarrow$ 4).

Otro grupo de hemicelulosas que se encuentra en paredes primarias de gran variedad de especies de angiospermas pero en muchísimo menor abundancia son los **mananos** y **glucomananos**. Sin embargo los mananos han sido muy estudiados por su papel como compuestos de almacenamiento de semillas [26]. Se encuentran formados por una cadena principal de β -D-manopiranososa enlazada a través de uniones glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4), sin ramificaciones en el caso de los mananos y en el caso de los galactomananos se encuentran ramificados con residuos de α -D-galactopiranososa en posición O-6 de algunas de estas unidades de manosa. En el caso de los glucomananos y galactoglucomananos, la cadena lineal de β -D-manopiranososa y β -D-glucopiranososa con enlaces β -(1 $\rightarrow$ 4), sin un patrón repetitivo de unidades y con ramificaciones de D-galactosa en posición O-6 de manosa (Figura 1.8) [20][22]. Se ha reportado que algunos glucomananos podrían encontrarse acetilados en algunas

unidades de manosa lo que hace cambiar sus propiedades hidrodinámicas, afectando su solubilidad en agua [27].

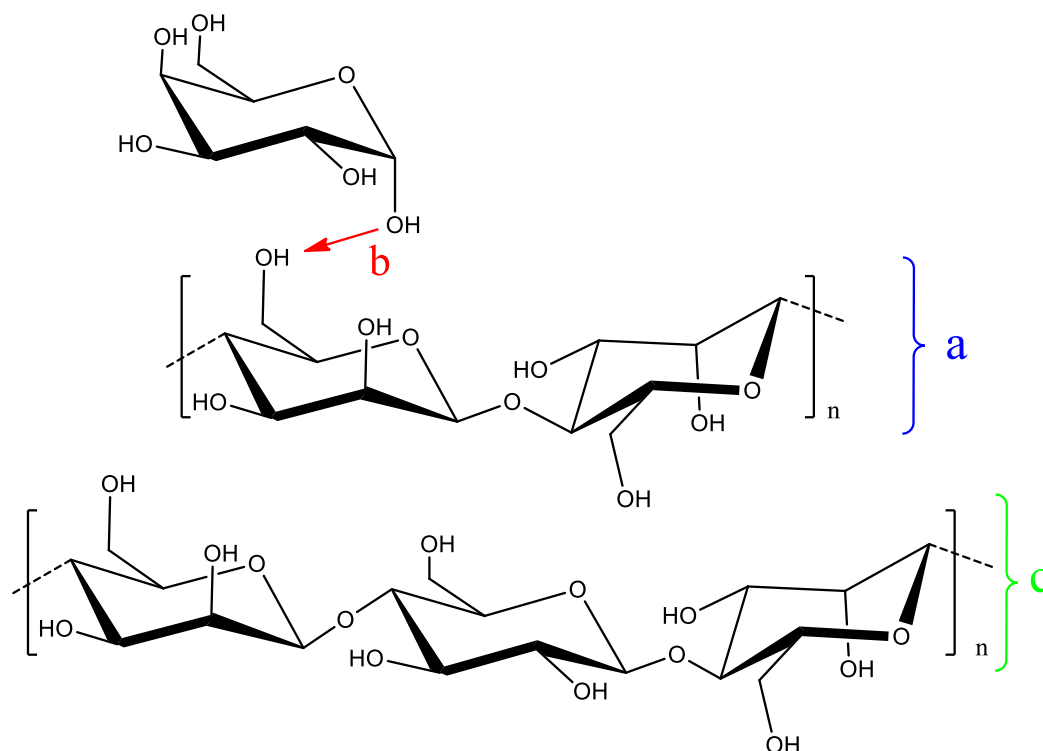


Figura 1.8: Estructura química de los mananos presentes en las hemicelulosas Angiospermas. **a:** cadena no ramificada de β -D-manopiranososa con enlaces β -(1 $\rightarrow$ 4). **b:** ramificaciones de α -D-galactopiranososa en posición O-6 para los galactomananos. **c:** cadena mixta de unidades de D-glucosa y D-manosa todos con enlaces β -(1 $\rightarrow$ 4), sin patrón repetitivo para formar (galacto)glucomananos.

El tercer gran grupo de polisacáridos de pared celular son las pectinas. Corresponden a una matriz polimérica altamente ramificada y heterogénea, rica en contenido de ácido α -D-galacturónico. Poseen muchas y variadas funciones, entre las cuales destacan la determinación de la porosidad de la pared, la modulación del pH y el balance iónico, la regulación de la adhesión entre células vecinas a través de la laminilla media, contribuyendo a la integridad estructural y la mediación de las respuestas de defensa de la planta ante el ataque de organismos patógenos e insectos. Las pectinas comprenden alrededor del 30% del peso seco del total de la pared celular primaria durante el crecimiento inicial y la expansión de la célula, pudiendo llegar incluso a un 40% del total de polisacáridos en aquellos tejidos

provenientes de frutos [28]. La presencia de pectinas disminuye gradualmente desde la lámina media y de la pared celular primaria hacia la membrana plasmática. Algunas especies, como aquellas de la familia de la gramíneas, poseen muy pequeñas cantidades de pectinas [29].

Los **homogalacturonanos** (HGs) son generalmente los componentes mayoritarios que conforman la red de pectinas. Corresponden a cadenas lineales de ácido α -D-galacturónico (GalA) unido a través de enlaces glicosídicos α -(1 $\rightarrow$ 4). Los grupos carboxilo se encuentran con carga negativa a pH fisiológico cuando están libres, pudiendo interactuar con iones Ca^{2+} , dando lugar a una estructura gelificante estable que algunos autores denominan “modelo de caja de huevo”: estas cadenas de HG que se despliegan de forma helicoidal en el espacio, que pueden condensarse mediante la reticulación con Ca^{2+} para formar zonas de interacción uniendo dos cadenas antiparalelas. Pero pueden encontrarse formando ésteres metílicos en diferentes grados, dependiendo del tipo de tejido y madurez de la pared. Se necesitan varios residuos contiguos de ácido galacturónico no esterificados para poder formar las interacciones estables, como se muestra en la Figura 1.10. Además, varias cadenas (paralelas y antiparalelas) pueden apilarse para formar una estructura con ácido galacturónico parcialmente metilado formando un complejo de calcio menos firme debido al menor número de interacciones con el catión [30][31].

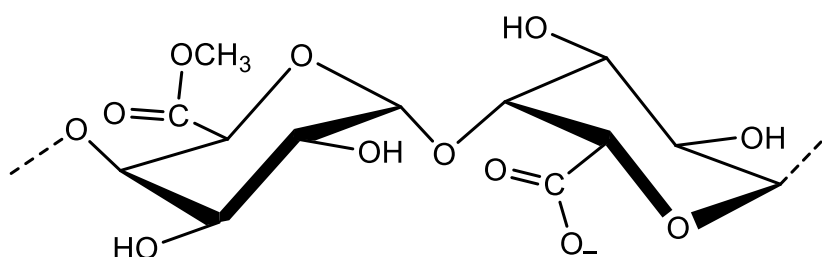


Figura 1.9: Unidad repetitiva de un homogalacturonano (HG), constituido por unidades de ácido α -D-galacturopiranósico enlazadas a través de uniones α -(1 $\rightarrow$ 4).

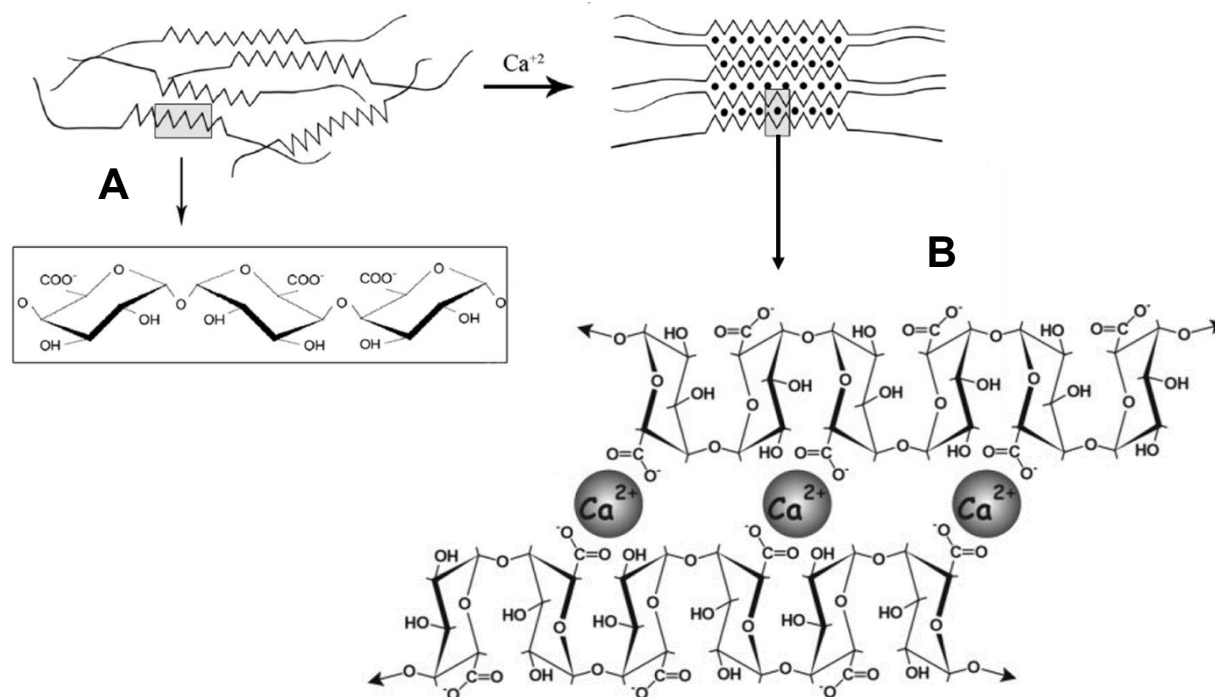


Figura 1.10: Interacciones entre iones Ca^{2+} y cadenas de HG. **A:** interacciones entre cadenas antiparalelas en sectores con GalA no metilado. **B:** cadenas paralelas y antiparalelas con GalA parcialmente metilado formando un complejo de calcio menos firme.

Existen pectinas con modificaciones en los homogalacturonanos, como por ejemplo los **xilogalacturonanos (XGA)** que consisten en la estructura principal de los homogalacturonanos, sustituidos en el O-3 por β -D-xilopiranososa (y en algunas especies, menos frecuente por β -D-xilopiranososa ramificado en el O-2 por otro residuo adicional de xilosa) (Figura 1.11). Este tipo de pectinas han sido encontradas en varias especies, incluyendo polisacáridos solubles de granos de soja, en los cuales se detectó una cadena lateral más extensa de unidades de xilosa. Sin embargo, XGA constituyen componentes minoritarios de la pared [28].

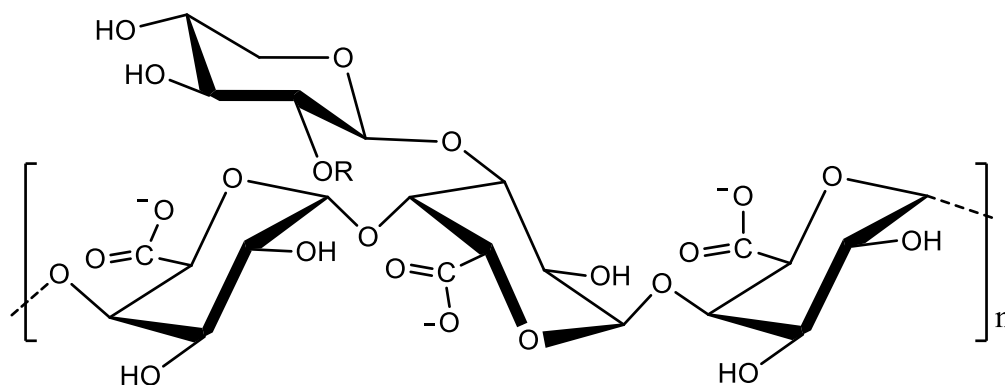


Figura 1.11: Estructura de un galacturonano modificado a través de una ramificación con β -D-xilopiranososa en posición O-3. R = H ó β -D-Xilp.

El **ramnogalacturonano I** (RGI), es otro de los constituyentes fundamentales de las pectinas, es un heteropolisacárido formado por unidades repetitivas de $\rightarrow 2$)- α -L-Ramp (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-GalpA-(1 $\rightarrow$, pudiendo tener algunos hidroxilos acetilados en la unidad de GalAp. Sobre esta cadena principal de RGI se unen en posición O-4 de la unidad de ramnosa largas cadenas de otros polisacáridos. Dichas cadenas pueden estar compuestas por: (1 $\rightarrow$ 5)- α -L-arabinanos ramificados en posición O-3 por cadenas similares de (1 $\rightarrow$ 5)- α -L-arabinano; (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactanos y por arabinogalactanos tipo I, que consiste en cadenas de (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactanos con ramificaciones de α -L-arabinofuranosa en posición O-3 (Figura 1.12). Todos estos polisacáridos que constituyen los RGI dan lugar a una sección muy reticulada y flexible. La zona de las macromoléculas de pectinas donde se encuentra el RGI se conoce como la región ramificada, mientras que los fragmentos de HG se denominan regiones lisas [32]. Se cree que las cadenas laterales de RGI interactúan con algunos tipos de glicanos de entrecruzamiento estabilizando así la matriz de la pared celular [33]. Además, se ha observado que la variación en los contenidos y relación de arabinosa a galactosa provenientes de estos tipos de estructuras producen un cambio en la porosidad y solubilidad de las pectinas durante el proceso de maduración de frutos [21].

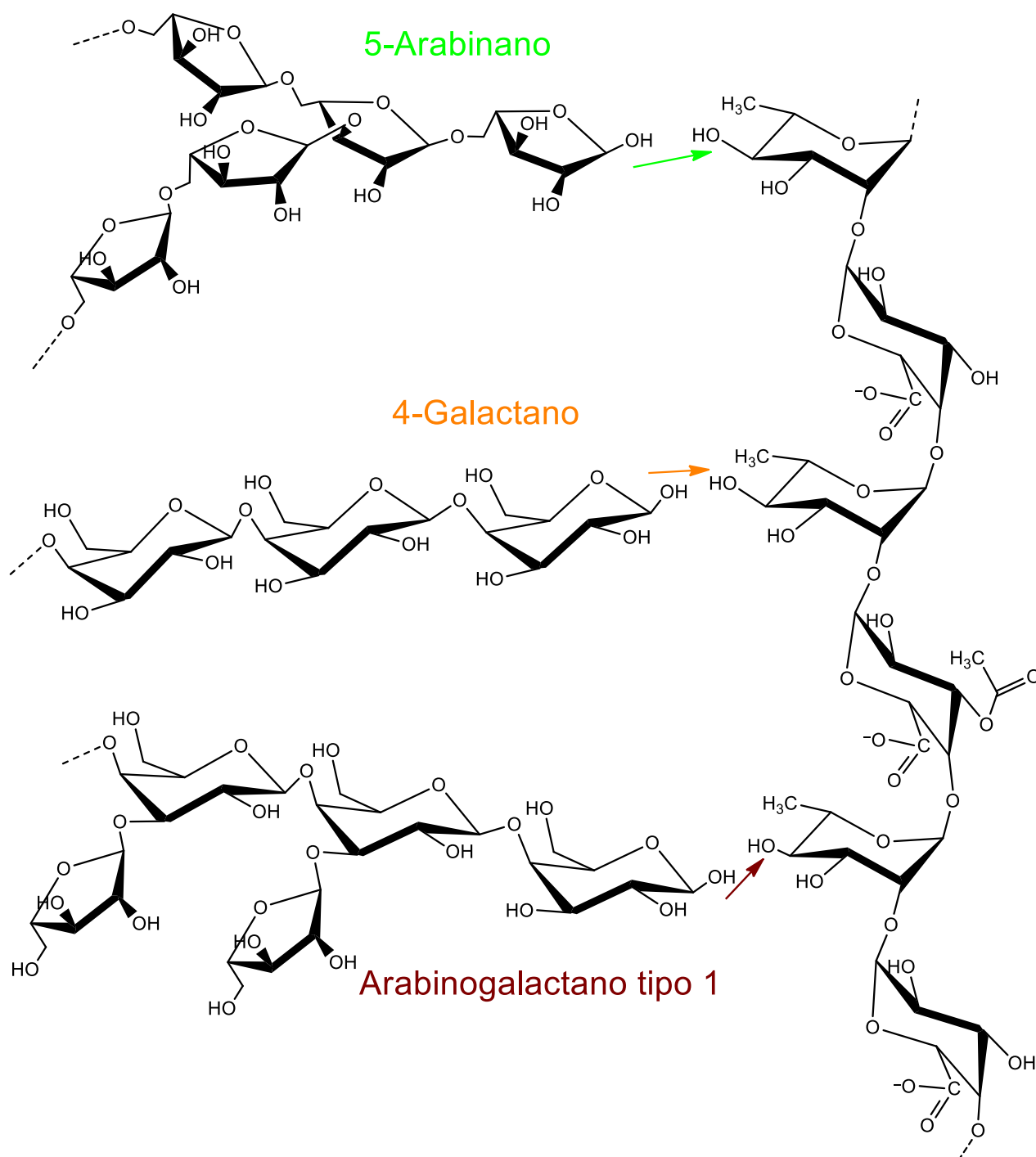


Figura 1.12: Estructura química de un ramnagalacturonano I, compuesto por unidades alternadas de $\rightarrow 2$ - α -L-Rha-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-GalA-(1 $\rightarrow$). Además, se encuentran ramificados con extensas cadenas de arabinanos, galactanos y arabinogalactanos.

Los **Ramnogalacturonanos II** (RG-II) son HG modificados y se encuentran en menor proporción en la pared. Tienen una estructura compleja y muy ramificada, un esqueleto de ácido D-galacturónico con uniones α -(1 $\rightarrow$ 4) y cuatro diferentes grupos de cadenas laterales heterooligoméricas, denominados comúnmente A, B, C y D (y dos residuos α -arabinosa que son las cadenas E y F). En la Figura 1.13 se observan las 4 cadenas principales [28] que están constituidas por diversos azúcares entre los cuales se encuentran L-ramnosa, L-fucosa, L-arabinosa, D-galactosa y ácido D-glucurónico y otros azúcares poco comunes como apiosa, ácido acérico O-acetilado, KDO, xilosa O-metilada y fucosa (también O-metilada y O-acetilada).

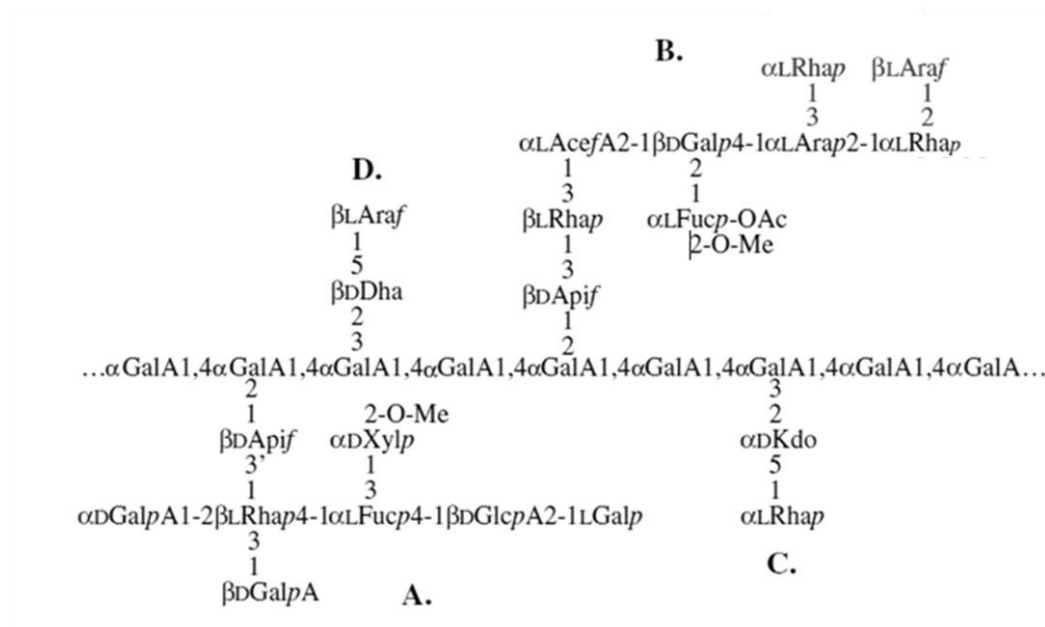


Figura 1.13: Estructura de ramnagalacturonano de tipo II y cadenas A-D, encontrada en pectinas de paredes de plantas terrestres.

Estas cuatro cadenas laterales poseen 21 tipos de enlaces glicosídicos diferentes, lo que refleja una resistencia a la degradación enzimática. Además, las estructuras de dichas cadenas laterales se encuentran muy conservadas en todo tipo de plantas terrestres, conociéndose exactamente su distribución estructural [34]. Esta presencia generalizada y la conservación estructural de RG-II dentro del reino vegetal revelan una función especial y distinta en la integridad de la pared de este tipo de pectina. Al mismo tiempo, las cadenas laterales pueden formar dímeros de RG-II al

enlazarse covalentemente a través de un enlace de diéster de boro entre dos residuos de apiosa provenientes de dos cadenas **A** diferentes (Figura 1.14). Por el contrario, no hay registro de que las cadenas **B** participen en este tipo de interacciones. Estas interacciones de entrecruzamiento entre RGII pueden endurecer la matriz de la pared [30][35].

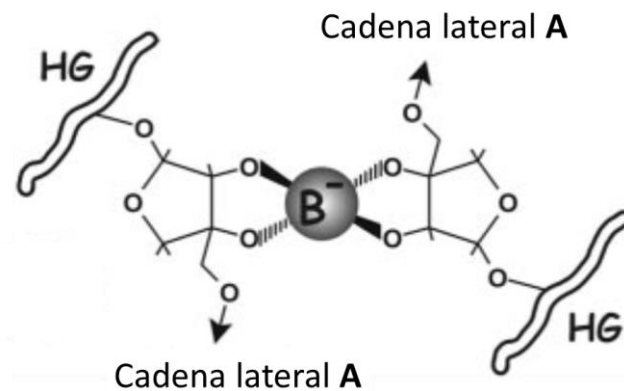


Figura 1.14: Formación de dímeros de ramnogalacturonano II entre sus cadenas laterales A a través de un átomo de boro.

En resumen, las pectinas son macromoléculas que constan de tres subunidades de construcción principales: HG, RG-I y RG-II. Se puede explicar la estructura tridimensional que presentan las pectinas como un cuerpo central que está formado por unidades alternadas de HG y RG-I y se van posicionando las diferentes subunidades a lo largo del esqueleto principal, como se muestra en la Figura 1.15 [36].

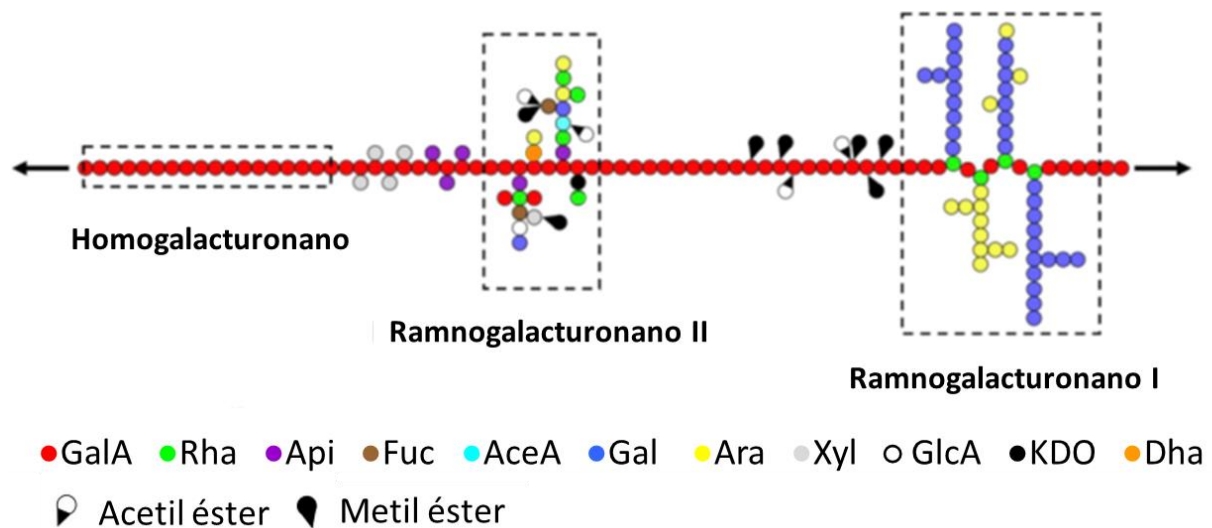


Figura 1.15: Modelo de la estructura supramolecular que presentan las pectinas.

1.2.2.2 Otros componentes de la pared celular

Además de los grupos de polisacáridos mencionados, la pared celular vegetal posee otros biopolímeros en su entramado, tales como proteínas estructurales, compuestos fenólicos y lignina. Existen proteínas ricas en prolina (PRPs), en glicina (GRPs) y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), dentro de las cuales se incluyen las más estudiadas: las **extensinas**. En éstas últimas la cadena peptídica se encuentra glicosilada sobre la hidroxiprolina con restos de arabinósidos de hasta 4 unidades de longitud y en algunas oportunidades se pueden encontrar unidades de serina O-glicosiladas con galactosa. Estos péptidos interaccionan entre sí de forma intermolecular a través de la formación de enlaces covalentes entre residuos de tirosina modulando así la estructura tridimensional de las extensinas, que se unen a la matriz de celulosa-hemicelulosa y participan en procesos que promueven el ensanchamiento y el aumento de la porosidad de la pared [20][37].

Otro grupo importante de proteínas estructurales son los **arabinogalactano-proteínas** (AGPs), corresponden a proteoglicanos que se encuentran en la pared

celular y en la membrana plasmática, unidos a esta última de forma covalente a través de un ancla tipo glicosilfosfatidil-inositol (GPI). Cumplen funciones de regulación y señalización durante la diferenciación y crecimiento celular, además pueden producirse como respuesta a daños y cortes [20]. Se encuentran formados por un péptido rico en hidroxiprolina, glicosilado con arabinogalactanos tipo II, los cuales consisten en cadenas de β -D-galactanos con enlaces (1 $\rightarrow$ 6) muy ramificados en posición O-3 por otras cadenas de β -D-galactanos unidos por enlaces (1 $\rightarrow$ 3). A su vez, estos galactanos pueden presentar ramificaciones de α -L-arabinofuranosa terminal en posición O-3 u O-6 de los residuos de galactosa, respectivamente (Figura 1.16).

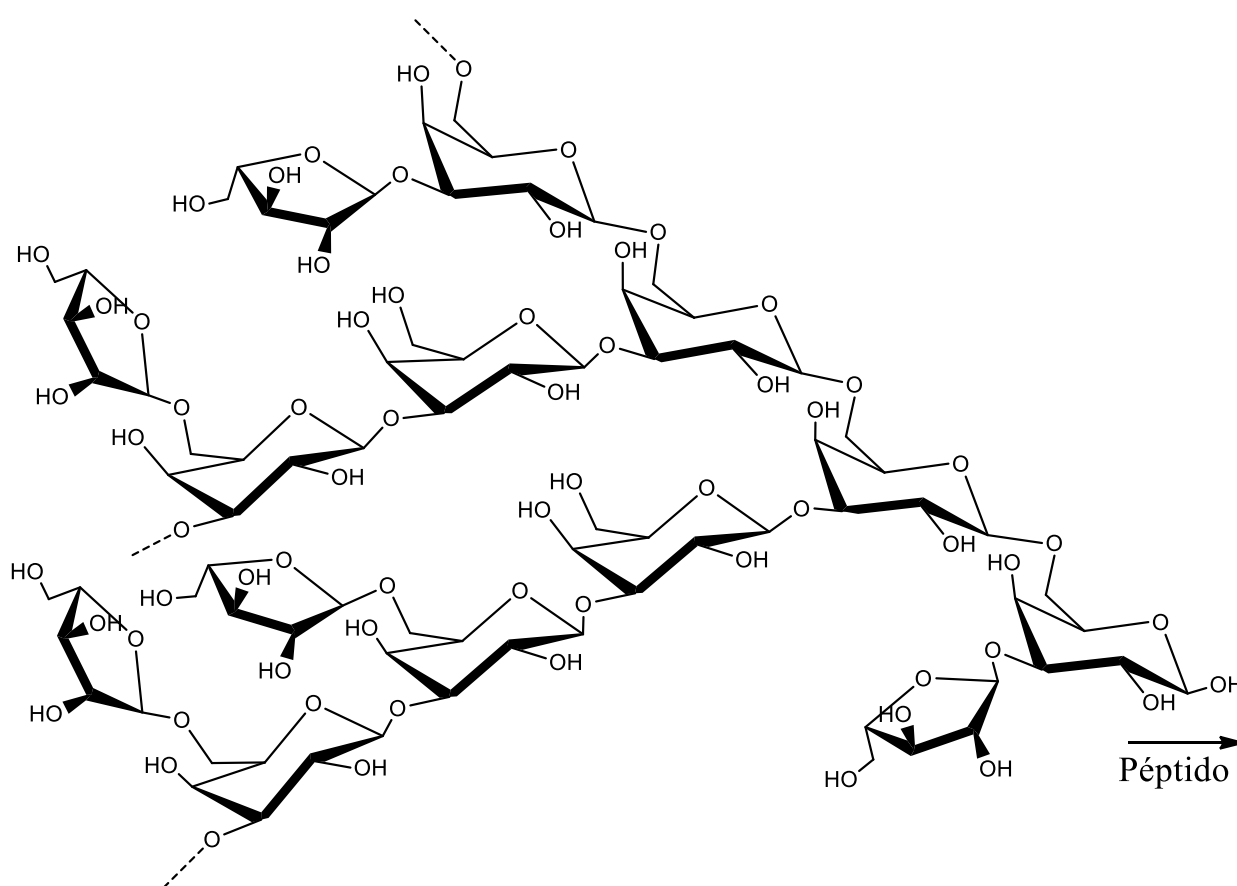


Figura 1.16: Estructura química de arabinogalactano tipo II proveniente de AGPs

Los compuestos fenólicos por lo general se encuentran esterificando diferentes cadenas de polisacáridos, por ejemplo, las unidades de arabinosa en los GAXs de gramíneas o en unidades de galactosa y arabinosa de cadenas laterales de pectinas,

en dicotiledóneas del género *Spinacia*. El **ácido ferúlico** y el **ácido cumárico** suelen ser los más comunes en polisacáridos de pared, su función es entrecruzar mediante enlaces fenilo-éster (y fenilo-fenilo, en el caso de las gramíneas) para interconectar la red de hemicelulosa y, en el caso de las pectinas, para entrecruzar las cadenas de polisacáridos, pudiendo limitar la extensión y estiramiento de la pared [38][39].

La **lignina** es un polímero muy abundante en las paredes de plantas vasculares, principalmente en pared celular secundaria del xilema y tejido esclerenquimático. Está formada por restos derivados de los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figura 1.17 a), polimerizados y unidos entre sí por enlaces éter, éster o C-C. La lignina forma parte del entramado de la pared celular, interactuando con la matriz, la celulosa y las hemicelulosas. Dichas interacciones generan cambios en las propiedades biofísicas distintivas de la biomasa vegetal, como la resistencia mecánica, la flexibilidad y la resistencia a la digestión enzimática. Además, al poseer carácter hidrofóbico, desplazan el agua de las paredes celulares secundarias, aumentando así dicha resistencia y rigidez de la pared. Como consecuencia, es fundamental para proporcionar soporte a los tejidos, permitiendo el crecimiento masivo de árboles de gran tamaño. En tejidos de frutos se encuentran en cantidades relativamente pequeñas, respecto a otros tipos de tejido. El polímero de lignina tiene una estructura química irregular a pesar de estar constituido por condensación de las mismas moléculas similares entre sí (Figura 1.17 b) [40]–[42].

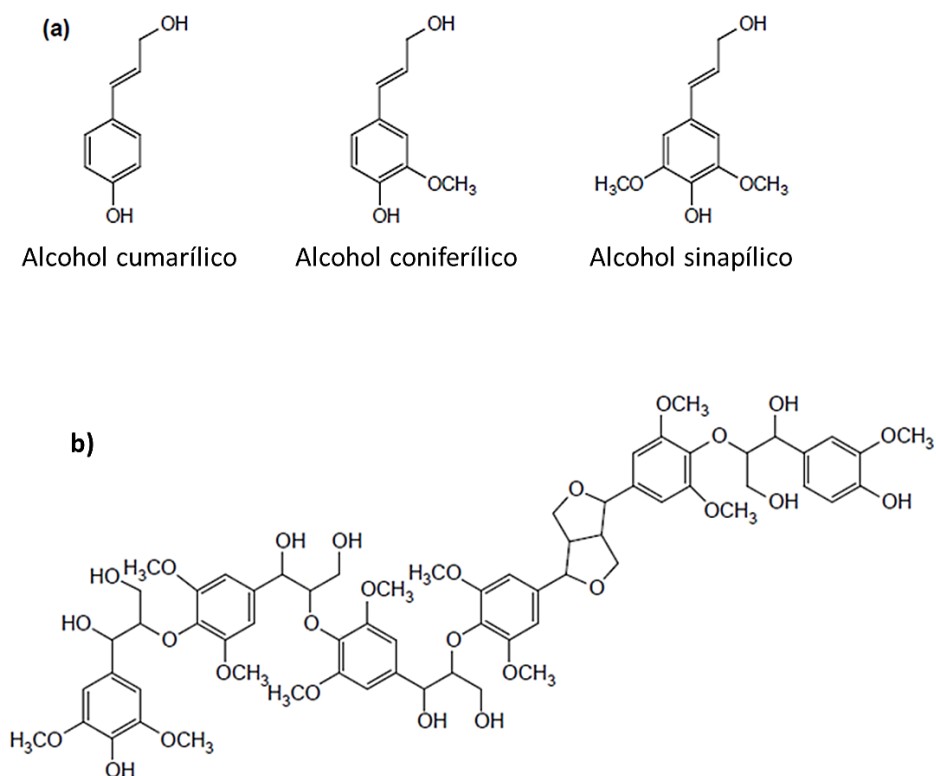


Figura 1.17: **a)** Estructuras químicas de los precursores químicos de la lignina (también denominados monolignoles); **b)** Estructura de una secuencia primaria de condensación de cinco moléculas de sinapílico, para formar lignina.

1.2.3 Pared celular de semillas de *Glicine max*

En semillas de soja, al igual que el resto de las leguminosas, se encuentran polisacáridos en las paredes celulares de células parenquimáticas, tales como celulosa, hemicelulosas, pectinas, glicoproteínas y/o proteoglicanos. Algunos autores denominan a este conjunto de polímeros fibra dietaria [43]. Las semillas de especies dicotiledóneas poseen dos cotiledones, el tegumento cubriendo a éstos, además del hipocótilo (Figura 1.18).

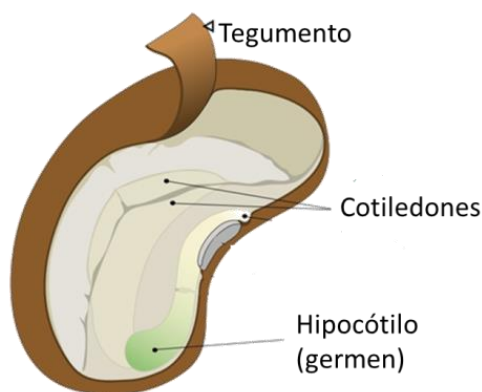


Figura 1.18: Diagrama de una semilla de especies dicotiledóneas.

La composición química de las paredes celulares de cotiledones y tegumentos, son fundamentalmente distintas. Los tegumentos que son aproximadamente el 8% en peso del total de la semilla y tienen mayor proporción de fibra dietaria total que los cotiledones, aproximadamente el doble de fibra respecto a su peso seco, dependiendo del origen geográfico de las semillas [44]. Los polisacáridos presentes en semillas de leguminosas, como la soja, presentan mecanismos metabólicos muy eficientes para plegar los polisacáridos de las paredes celulares y almacenarlos como reserva cuando se genera la semilla. Estos polisacáridos de reserva de semillas, durante la germinación y el crecimiento de la planta se desmontan hidrolizando y desplegando dichas cadenas para su utilización en el desarrollo fisiológico. Además, se sabe que las semillas en desarrollo contienen actividades enzimáticas altas para la biosíntesis de variados polisacáridos de la matriz celular, lo que genera interés para investigaciones de genes y enzimas relacionados con la biosíntesis de polisacáridos [45].

Las paredes celulares vegetales, debido a su composición molecular, requieren condiciones de extracción que utilizan componentes que modifican químicamente los polisacáridos que conforman la matriz para permitir su extracción, es decir, la red de interacciones que estabiliza la estructura de la pared se debe perturbar con diversos agentes para producir la separación. En el caso de los componentes de los tejidos de las semillas pueden ser extraídos con diversos solventes, como agua fría o caliente, enzimas, soluciones con agentes quelantes, bases débiles y fuertes a través de una extracción secuencial para separar sus componentes y realizar un análisis de los

polisacáridos evitando, dentro de lo posible, su degradación. Entre los procedimientos estándar que se siguen para el análisis químico de paredes celulares vegetales se encuentran los descritos por Fry [46] (ver Capítulo 2).

Hace varias décadas, Aspinall y colaboradores, a través de extracciones secuenciales, estudiaron cuales eran los principales polisacáridos presentes en semillas de soja, separando los cotiledones de los tegumentos. Para los cotiledones se encontró que estaban compuestos principalmente por arabinogalactanos de tipo I, que consisten en cadena de D-galactosa con enlaces β -(1 $\rightarrow$ 4) y con ramificaciones en posición O-3 con unidades de α -L-arabinofuranosa [47], como se indica en la Figura 1.12. Se informaron proporciones de arabinosa y galactosa de 1:2.8, respectivamente [48], haciendo referencia al grado de ramificación del arabinogalactano. Otros autores indicaron proporciones molares inferiores de 1:1.5-2.0 de Ara:Gal [44] lo que indicaría variabilidad en estos arabinogalactanos presentes en cotiledones, dependiendo del origen del material vegetal. También, se encuentran presentes polisacáridos ácidos (pectinas) con complejas estructuras, muy ramificados y que pueden llegar a tener alrededor de 30% de ácido galacturónico, además de ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa y galactosa [49]. Estos polisacáridos de cotiledones se caracterizan por presencia de cadenas laterales muy abundantes de polisacáridos neutros, especialmente de arabinanos, galactanos y galactanos sustituidos (por Ara, Xil, Fuc y Glc). Además, predomina un diseño estructural péctico diferente del que se conoce comúnmente (indicado en la Figura 1.15). Poseen un esqueleto principal formado por sectores muy cortos de homogalacturonanos (Figura 1.9) y sectores de ramnogalacturonanos (Figura 1.12) más extensos, pudiendo llegar a más de un 80% del esqueleto principal [50]. Estas fracciones de polisacáridos de cotiledones pueden modificarse dependiendo del método de extracción secuencial utilizado.

Las hemicelulosas más abundantes en los cotiledones de semillas de soja son los xiloglucanos, formados por una cadena principal de β -D-glucopiranososa con uniones β -(1 $\rightarrow$ 4), ramificaciones en posición O-6 con unidades de α -D-xilopiranososa y con residuos adicionales, como galactosa, fucosa y arabinosa en posición O-2 de algunas de estas unidades de xilosa, como se indica en la Figura 1.5, siendo estructuralmente similares a xiloglucanos encontrados en las paredes celulares de la mayoría de las especies dicotiledóneas y leguminosas [51]. También, se determinaron, en menores

cantidades, xilanos con sustituciones únicas a la cadena principal de α -D-GlcA y/o α -L-Araf (Figura 1.6), siendo estructuralmente diferentes de los de paredes secundarias de dicotiledóneas, ya que estos últimos no tienen Araf como cadena lateral, por lo que serían similares a xilanos aislados de varias especies vegetales de gramíneas [18].

Respecto a los polisacáridos que componen a los tegumentos de semillas de soja obtenidos tras realizar una extracción secuencial, se indicó la presencia de galactomananos obtenidos a través de extracciones con agua que resultaron estructuralmente similares a otros galactamananos aislados de semillas de leguminosas y corresponden a una cadena principal de β -D-manopiranososa con uniones β -(1 $\rightarrow$ 4) ramificada en posición O-6 de algunas de estas unidades por residuos de α -D-galactopiranososa. Las relaciones molares entre galactosa y manosa (G:M) suelen variar dependiendo de las condiciones de extracción, entre 1:1.4 y 1:2.3, respectivamente [52], siendo un galactomanano con mayor grado de sustitución que el promedio de las leguminosas [45].

Además, los tegumentos contienen pectinas, las cuales se encuentran formadas, al igual que aquellas provenientes de cotiledones, por un esqueleto principal compuesto por unidades de α -L-ramnopiranososa y ácido α -D-galacturónico, que, a su vez, están asociadas a cadenas laterales que formadas por azúcares neutros. La hidrólisis de estos polisacáridos ácidos produce como monosacáridos constituyentes ácido galacturónico, galactosa, arabinosa, xilosa, fucosa y ramnosa [53].

La hemicelulosa más abundante encontrada en tegumentos corresponde a un xilano muy poco ramificado que contiene sólo una pequeña porción de ácido glucurónico, aproximadamente 4%. Esta característica determina que dicho xilano sea poco soluble. La estructura corresponde a unidades de β -D-Xilp enlazadas por la posición 4, con algunas ramificaciones de α -D-GlcA en O-2. [54]. A diferencia de los cotiledones, los tejidos tegumentarios cuentan con aproximadamente un 20% de celulosa del total del material insoluble. Los xilanos descritos se suelen encontrar asociados con la celulosa en los tejidos lignificados [44].

1.3 Defensa Vegetal

Todas las plantas que se encuentran insertas en un ecosistema son propensas a recibir el ataque de patógenos microbianos e insectos herbívoros. A través de la evolución vegetal han desarrollado mecanismos de señalización que les permiten percibir y enfrentar la herbivoría y patogénesis de aquellos organismos externos que se alimentan de ellas o que invaden sus tejidos. Las plantas reaccionan a dichos ataques de organismos externos por medio de una cascada de señalización que es llevada a cabo por su sistema de defensa y que comienza produciendo compuestos de señalización, realizando cambios transcripcionales finamente ajustados, la biosíntesis de fitohormonas y finalmente, la producción de compuestos químicos de defensa como inhibidores de proteinasas, polifenol oxidasas, isoflavonoides o alcaloides [55].

La pared celular juega un rol fundamental en el desarrollo de los mecanismos de defensa vegetales. Esta es una matriz dinámica, sus componentes interactúan y remodelan su morfología constantemente a lo largo del desarrollo de cada célula. Físicamente la pared es la interfaz de las primeras interacciones entre las plantas y una amplia gama de otros organismos beneficiosos y perjudiciales, incluidos insectos, patógenos (hongos-bacterias) y simbioses. Un ejemplo típico de la importancia de la pared celular como frontera defensiva es la maduración de los frutos, donde a medida que se desmonta la matriz y se rompen las interacciones que sostienen su estructura, el tejido se torna más susceptible al ataque de patógenos. En este contexto, existe un conjunto de proteínas encargadas de remodelar, degradar y reconstruir la pared celular dependiendo de las necesidades de las células. Estas proteínas tienen efecto, tanto en el desarrollo y maduración de la planta, como cuando ésta enfrenta un ataque por parte de patógenos [11].

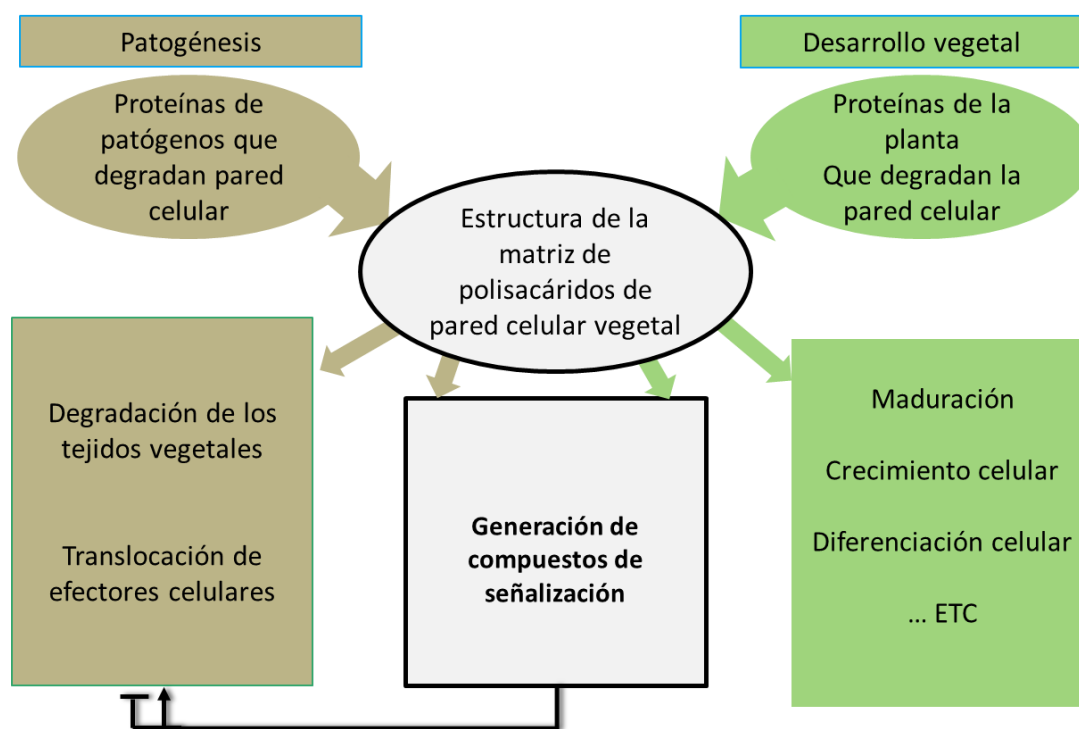


Figura 1.19: Representación esquemática de la acción de las proteínas que degradan las paredes celulares de plantas y patógenos que digieren las estructuras de polisacáridos dentro de la matriz de las paredes celulares de la planta.

Los patógenos vegetales se dividen tradicionalmente en tres clases: biótrofos que viven a expensas de células viables, necrótrofos que se alimentan de biomasa muerta y hemibiotrofos que tienen un estilo de vida mixto, comportándose como biotrofos temprano y como necrótrofos más tarde en sus ciclos de vida [56], mientras que los insectos herbívoros (fitófagos) se clasifican en generalistas, los cuales se alimentan de muchas especies de plantas que abarcan diferentes familias, y los especialistas que atacan solamente una especie (o algunas pocas) de plantas dentro de la misma familia [57]. Ambos, patógenos e insectos herbívoros, desencadenan mecanismos moleculares que activan las respuestas moduladas por fitohormonas vegetales de defensa en plantas, que pueden ser moduladas por ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), lo que genera rutas metabólicas diferentes y antagónicas (Figura 1.20), dependiendo de qué fitohormona induzca el proceso defensivo [58].

JA se produce en la respuesta al ataque de insectos herbívoros o fitófagos. Cuando el tejido vegetal es herido o expuesto a moléculas señalizadoras (llamadas elicitores) derivadas de patógenos, como por ejemplos oligosacáridos, se comienza a

acumular JA y especialmente JA-Ile (jasmonoil-isoleucina) que corresponde a la hormona activada en la vía del ácido jasmónico. Posteriormente, se activa la expresión de genes relacionados con la defensa y estos cambios de expresión dan como resultado un incremento de la síntesis de proteínas y metabolitos relacionados con las defensas, incluidas proteínas antifúngicas, compuestos antialimentarios, fitoalexinas y volátiles que atraen a los insectos depredadores [59].

En el caso de los organismos biótrosos y hemibiotrosos, mantener la viabilidad de las células hospederas infectadas es crucial para la supervivencia de estos organismos, por lo tanto, al momento de generar la infección y establecerse como huéspedes, generalmente producen pequeñas y precisas rupturas de la pared celular de la célula hospedera alrededor del punto inicial de penetración. En cambio, los organismos necrótrofos secretan una serie de sustancias y proteínas que degradan la pared celular (CWDP), ya que se dirigen a múltiples polisacáridos y causan una destrucción de tejidos muchísimo más extensa [11]. Los mecanismos moleculares que se llevan a cabo como respuesta frente a una patogénesis se encuentran relacionados con la activación de la señalización dependiente de SA. Esta hormona juega un papel clave en la transducción de señales. Dichas señales conducen a la activación de genes que codifican proteínas que combaten patógenos fúngicos, bacterianos y virales.

Un ejemplo es la hipersensibilidad, un mecanismo de resistencia que actúa contra los patógenos biótrosos, restringiendo el acceso al agua y los nutrientes [56]. Otros ejemplos son la muerte celular localizada que conlleva cambios en partes sanas y distantes de las plantas. Este mecanismo aumenta la resistencia a la infección secundaria de patógenos de todo tipo, además, genera el aumento de la resistencia, denominada resistencia sistémica adquirida (SAR), que se desarrolla varios días después de la invasión inicial del patógeno [59].

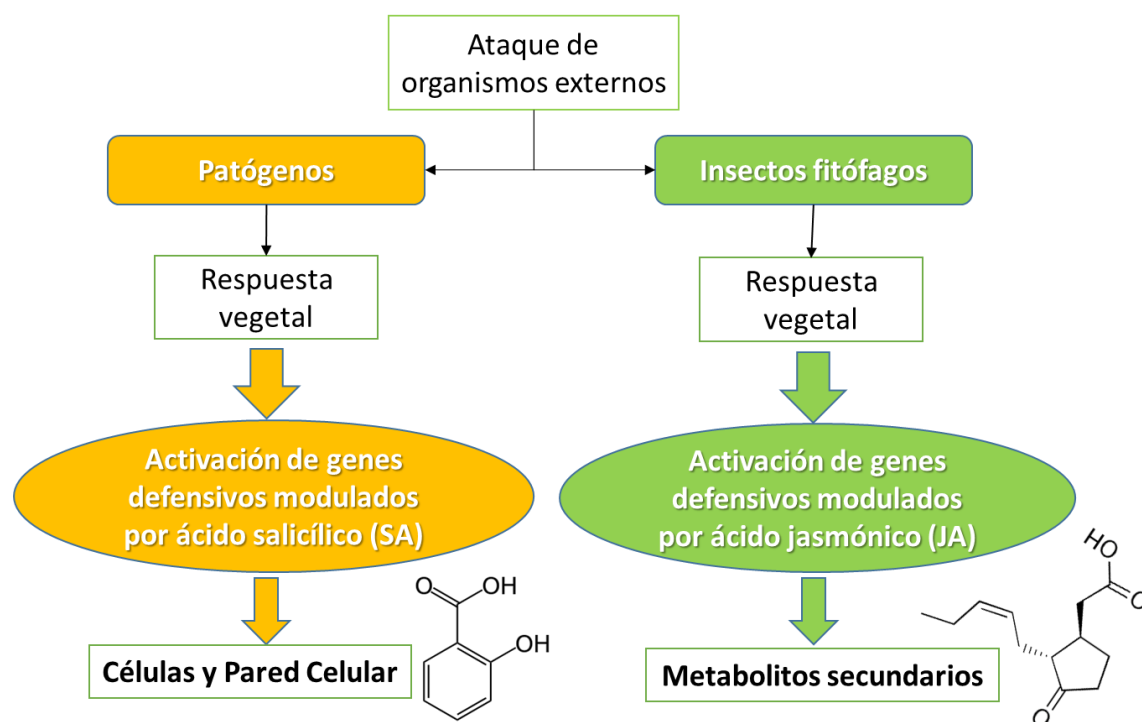


Figura 1.20: Esquema de los mecanismos de respuesta vegetal frente al ataque de patógenos y herbívoros.

Por otro lado, es importante remarcar el costo energético que involucra la producción y utilización de los mecanismos de defensa por parte de la planta para evitar o disuadir algún ataque. El momento en el cual se desarrollen y expresen las defensas también modula este gasto productivo. Existen defensas constitutivas, como rasgos defensivos físicos, como espinas, tricomas y cutículas, o químicas, como toda la gama de metabolitos secundarios que las plantas son capaces de sintetizar. Ambos rasgos se encuentran presentes en las plantas, independientemente de la presencia de herbívoros o patógeno, es decir, la producción de este tipo de defensas no es modulada por el ambiente. Por el contrario, las defensas inducidas se despliegan sólo después de que las plantas son atacadas por herbívoros o patógenos. En este caso, las plantas deben conjugar sistemas reguladores para equilibrar el crecimiento con la defensa y así favorecer las demandas de energía y nutrientes de la biosíntesis de compuestos defensivos o desarrollo de tejidos, por lo tanto, las defensas inducidas dotan a las plantas de sistemas de defensa flexibles y favorables a la economía energética de cada individuo [57].

En síntesis, la respuesta vegetal frente al ataque de organismos exógenos involucra innumerables mecanismos moleculares que están estrechamente controlados por diversas vías biosintéticas, metabólicas y de conjugación. Además, ordenar los eventos defensivos en la señalización es complejo, porque la vía incluye varios circuitos de retroalimentación positiva y negativa en que ambos sistemas JA y SA no son independientes uno del otro, sino que se encuentran compitiendo con la expresión de genes modulados por otras fitohormonas, tan importantes como JA y SA. Las concentraciones de hormonas en las plantas se determinan como consecuencia de múltiples niveles de regulación no aislados uno de otro.

1.4 *Nezara viridula* como plaga en cultivos de soja

Las plagas y enfermedades que pueden afectar los diversos cultivos agrícolas influyen directamente en la productividad que se puede obtener de ellos. Durante 2006, las pérdidas por enfermedades asociadas a los cultivos de soja fueron alrededor del 9% en campos ubicados en EE.UU. y las plagas de insectos afectaron el rendimiento de los cultivos en aproximadamente el mismo porcentaje. Dichas pérdidas son el resultado en la reducción del rendimiento y la calidad de las semillas de soja. La calidad de una semilla esta dada por sus propiedades físicas y químicas que son de importancia para su utilización comercial, como la composición y cantidad de aceite y proteína que constituyen la semilla. También, se refiere a la capacidad de la semilla para producir la germinación de una plántula vigorosa [44].

Los efectos directos sobre la calidad de la semilla y los granos de soja están asociados a aquellos insectos que pican las semillas dentro de los cuales se incluye a la chinche verde *Nezara viridula*, que junto a otras especies de chinches son las plagas de insectos más importantes (tanto en Estados Unidos, como en Brasil y Argentina) que afectan la calidad de la semilla de soja. El aparato bucal de las chinches posee forma de aguja y es insertando en los tejidos vegetales como tallos, hojas, frutos y semillas. Por lo general, las chinches muestran una preferencia por

alimentarse del tejido vascular de la hoja que causa un daño mecánico mínimo, pero daños directos posteriores más agresivos sobre el tejido picado [60]. Las chinches verdes se alimentan preferentemente de semillas jóvenes en desarrollo e inyectan saliva fitotóxica, causando la degradación de los tejidos, o incluso pueden causar aborto o deformación de las semillas, produciendo así la merma en los rendimientos [58]. Los daños causados pueden diferir, dependiendo de la especie de chinche y se deben a los diversos componentes de la saliva de cada especie en particular (Figura 1.21 [44]).



Figura 1.21: Daño por chinches a las vainas y semillas de soja. **A:** Decoloración de la vaina debido a hongos y bacterias introducidos en el sitio de alimentación. La vaina del centro se encuentra intacta. **B:** Semillas dañadas a la izquierda, semillas sanas a la derecha.

Específicamente, cuando el daño producido por el ataque de la chinche verde corresponde a las etapas reproductivas tempranas de la planta de soja, causa el aborto de las vainas o la pérdida de semillas individuales. La planta puede compensar esta pérdida mediante una mayor retención de otras vainas o un mayor tamaño de las semillas que no han sido afectadas. La compensación por parte de la planta de soja es limitada cuando las plantas están en un desarrollo reproductivo medio (R5-R6). En este punto o después, el daño de las vainas puede resultar en pérdidas significativas de rendimiento. Mientras que en las etapas reproductivas más tardías (R6-R7), las vainas y semillas consumidas por chinches, rara vez resultan en una pérdida de

rendimiento, pero de todas formas puede causar daño cosmético a las semillas [61], lo que se traduce igualmente en disminución de la calidad como producto agrícola.

La respuesta vegetal de defensa frente a los insectos chupadores, como la chinche, puede ser bastante diferente dependiendo de qué especie se trate, pero suele implicar una señalización independiente de JA mediada por SA. Se ha estudiado a *Nezara viridula* y se demostró que su estilo de alimentación vascular no indujo compuestos volátiles a diferencia de especies de chinches que se alimentan por laceración [60].

Hace algunos años Giacometti y colaboradores [58] encontraron que los mecanismos de defensa de soja en semillas dañadas por el ataque de *Nezara viridula* son regulados a través de genes defensivos modulados por ácido salicílico y también por ácido jasmónico (Figura 1.22).

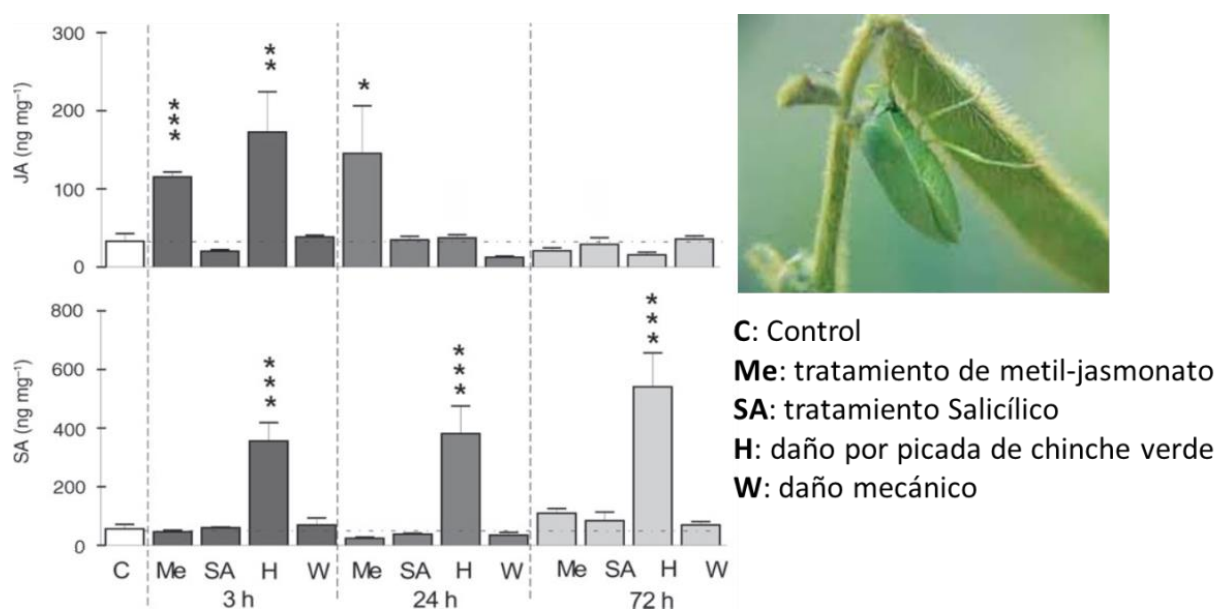


Figura 1.22: Acumulación de fitohormonas en semillas de soja en respuesta a diferentes tratamientos e inducciones con *Nezara viridula*.

1.5 Objetivos

El objetivo general de esta Tesis es el estudio de los polisacáridos de las paredes celulares de semillas de soja, *Glycine max* y como varían sus estructuras respecto a los diferentes tratamientos aplicados sobre las vainas de soja en crecimiento, tales como el ataque de herbivoría por parte de la chinche verde *Nezara viridula* y la aplicación exógena de la hormona vegetal ácido salicílico, con el propósito de estudiar la incidencia de esos tratamientos en la proporción de diferentes pectinas, glicanos de entrecruzamiento, celulosa y otros componentes de la pared celular, y en los distintos factores estructurales que pudieran verse afectados (grado de metilación de galacturonanos Gme, grado de ramificación en arabinanos, variaciones estructurales de ramificaciones y tipos de enlaces o diferencias de azúcares constituyentes, etc.), y, de esta forma, de ser posible, relacionar el mecanismo, a través del cual la soja modula defensas frente a una de sus principales plagas, como lo es la chinche verde. Así, se espera contribuir al mejoramiento vegetal de uno de los cultivos agrícolas de mayor importancia a nivel mundial y regional.

1.6 Hipótesis

Cuando la semilla de soja (*Glycine max*) es picada por la chinche verde (*Nezara viridula*), actúan los mecanismos que liberan la fitohormona ácido salicílico, la cual influiría en la biosíntesis de la pared celular de cotiledones y tegumentos, produciendo cambios en la estructura de la misma, específicamente, sobre los polisacáridos como pectinas y/o hemicelulosas y/o celulosa.

Estos cambios pueden ser estudiados y caracterizados por medio de métodos químicos y espectroscópicos con el fin de intentar relacionarlos con los cambios morfológicos observados en las semillas y así contribuir al mejoramiento vegetal desde un punto de vista de química ecológica.

1.7 Referencias

- [1] A. M. Abdelghany *et al.*, “Profiling of seed fatty acid composition in 1025 Chinese soybean accessions from diverse ecoregions,” *Crop J.*, vol. 8, no. 4, pp. 635–644, 2020.
- [2] M. Thrane, P. V. Paulsen, M. W. Orcutt, and T. M. Krieger, *Soy Protein: Impacts, Production, and Applications*. Elsevier Inc., 2017.
- [3] S. J. Lee, W. Yan, J. K. Ahn, and I. M. Chung, “Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones,” *F. Crop. Res.*, vol. 81, no. 2–3, pp. 181–192, 2003.
- [4] G. L. Hartman, E. D. West, and T. K. Herman, “Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests,” *Food Secur.*, vol. 3, no. 1, pp. 5–17, 2011.
- [5] T. Hymowitz, “On the domestication of the soybean,” *Econ. Bot.*, vol. 24, no. 4, pp. 408–421, Oct. 1970.
- [6] I. S. Middelbos and G. C. Fahey, “Soybean Carbohydrates,” in *Soybeans. Chemistry, Production, Processing, and Utilization*, 1st ed., L. A. Johnson, P. J. White, and R. Galloway, Eds. Illinois: Edward Elgar Publishing, 2008, pp. 1–910.
- [7] E. M. Arrieta, A. Cuchietti, D. Cabrol, and A. D. González, “Greenhouse gas emissions and energy efficiencies for soybeans and maize cultivated in different agronomic zones: A case study of Argentina,” *Sci. Total Environ.*, vol. 625, pp. 199–208, 2018.
- [8] V. Sy, M. Herold, R. Beuchle, J. G. P. W. Clevers, E. Lindquist, and L. Verschoot, “Land use patterns and related carbon losses following deforestation in South America,” *Environ. Res. Lett.*, vol. 10, pp. 1–14, 2015.
- [9] T. Hymowitz and F. I. Collins, “Variability of Sugar Content in Seed of Glycine max (L.) Merrill and G. soja Sieb. and Zucc. 1,” *Agron. J.*, vol. 66, no. 2, pp. 239–240, 1974.
- [10] A. Redondo-Cuenca, M. J. Villanueva-Suárez, M. D. Rodríguez-Sevilla, and I.

- Mateos-Aparicio, "Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*)," *Food Chem.*, vol. 101, no. 3, pp. 1216–1222, 2006.
- [11] D. Cantu, A. R. Vicente, J. M. Labavitch, A. B. Bennett, and A. L. T. Powell, "Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility," *Trends Plant Sci.*, vol. 13, no. 11, pp. 610–617, Nov. 2008.
- [12] L. Denness *et al.*, "Cell Wall Damage-Induced Lignin Biosynthesis Is Regulated by a Reactive Oxygen Species- and Jasmonic Acid-Dependent Process in *Arabidopsis*," *Plant Physiol.*, vol. 156, pp. 1364–1374, 2011.
- [13] M. F. Basanta, "Estudio químico y funcional de pectinas y glicanos entrecruzantes de paredes celulares de prunoideas," p. 201, 2013.
- [14] M. R. Zak, M. Cabido, D. Cáceres, and S. Díaz, "What drives accelerated land cover change in central Argentina? Synergistic consequences of climatic, socioeconomic, and technological factors," *Environ. Manage.*, vol. 42, no. 2, pp. 181–189, 2008.
- [15] V. Fehlenberg, M. Baumann, N. I. Gasparri, M. Piquer-Rodriguez, G. Gavier-Pizarro, and T. Kuemmerle, "The role of soybean production as an underlying driver of deforestation in the South American Chaco," *Glob. Environ. Chang.*, vol. 45, no. August 2016, pp. 24–34, 2017.
- [16] N. C. Carpita and D. M. Gibeaut, "Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth," *Plant J.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–30, 1993.
- [17] K. W. Waldron, M. L. Parker, and A. C. Smith, "Plant Cell Walls and Food Quality," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 2, no. Oliver 1997, pp. 101–119, 2003.
- [18] M. C. McCann *et al.*, "Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall," *Phytochemistry*, vol. 57, no. 6, pp. 811–821, 2001.
- [19] N. C. Carpita, "Update on mechanisms of plant cell wall biosynthesis: How plants make cellulose and other (1→4)- β -D-Glycans," *Plant Physiol.*, vol. 155, no. 1, pp. 171–184, 2011.

- [20] N. C. Carpita and M. C. McCann, "The Cell Wall," in *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, En ed., B. Buchanan, R. Gruissem, and R. Jones, Eds. 15501 Monona Drive, Rockville, MD 20855-2768 USA.: American Society of Plants Physiologists, 2000, pp. 52–108.
- [21] D. Cantu, A. R. Vicente, L. C. Greve, J. M. Labavitch, and A. L. T. Powell, "Genetic Determinants of Textural Modifications in Fruits and Role of Cell Wall Polysaccharides and Defense Proteins in the Protection Against Pathogens," *Fresh Prod.*, 2007.
- [22] H. V. Scheller and P. Ulvskov, "Hemicelluloses," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 61, no. 1, pp. 263–289, 2010.
- [23] M. Handford, "Biosynthesis of plant cell walls.," *Cienc. e Investig. Agrar.*, vol. 33, no. 3, pp. 149–166, 2006.
- [24] M. Pauly, S. Gille, and L. Liu, "Hemicellulose biosynthesis," 2013.
- [25] N. C. Carpita, "Structure and biogenesis of the cell walls of grasses," *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 47, no. 1, pp. 445–476, 1996.
- [26] A. Ebringerová and H. Thomas, "Hemicellulose," no. August, pp. 1–67, 2005.
- [27] M. S. Buckeridge, S. M. C. Dietrich, and D. U. de Lima, "Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds," *Dev. Crop Sci.*, vol. 26, no. C, pp. 283–316, 2000.
- [28] K. H. Caffall and D. Mohnen, "The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides," *Carbohydr. Res.*, vol. 344, no. 14, pp. 1879–1900, 2009.
- [29] P. Taylor, B. R. Thakur, R. K. Singh, and A. K. Handa, "Chemistry and Uses of Pectin — A Review," no. 917340173, 1997.
- [30] J. Vincken *et al.*, "If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture," *Plant Physiol.*, vol. 132, pp. 1781–1789, 2003.
- [31] E. Kirtil, M. H. Oztop, A. Sirijariyawat, P. Ngamchuachit, D. M. Barrett, and M. J. McCarthy, "Effect of pectin methyl esterase (PME) and CaCl₂ infusion on the

- cell integrity of fresh-cut and frozen-thawed mangoes: An NMR relaxometry study,” *Food Res. Int.*, vol. 66, pp. 409–416, 2014.
- [32] S. Y. Chan, W. S. Choo, D. J. Young, and X. J. Loh, “Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 161, pp. 118–139, 2017.
- [33] M. C. Jarvis, “Plant cell walls: Supramolecular assemblies,” *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 2, pp. 257–262, 2011.
- [34] D. Ndeh *et al.*, “Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 544, no. 7648, pp. 65–70, 2017.
- [35] E. R. Lampugnani, G. A. Khan, M. Somssich, and S. Persson, “CELL SCIENCE AT A GLANCE Building a plant cell wall at a glance,” 2018.
- [36] R. Wang, R. Liang, T. Dai, J. Chen, X. Shuai, and C. Liu, “Trends in Food Science & Technology Pectin-based adsorbents for heavy metal ions : A review,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 91, no. May 2018, pp. 319–329, 2019.
- [37] A. Grandis, A. P. de Souza, E. Q. P. Tavares, and M. Buckeridge, “Using Natural Plant Cell Wall Degradation Mechanisms to Improve Second Generation Bioethanol,” in *Plants and BioEnergy*, 4th ed., M. C. McCann, M. S. Buckeridge, and N. C. Carpita, Eds. Nueva York: 2014, 2014, pp. 1–289.
- [38] J. Ralph, R. D. Hatfield, J. H. Grabber, H. J. G. Jung, S. Quideau, and R. F. Helm, “Cell Wall Cross-Linking in Grasses by Ferulates and Diferulates,” *ACS Symp. Ser.*, vol. 697, no. September 1998, pp. 209–236, 1998.
- [39] M. McNeil, A. G. Darvill, S. C. Fry, and P. Albersheim, “Structure and function of the primary cell walls of plants,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 53, no. May 2016, pp. 625–663, 1984.
- [40] L. B. Davin and N. G. Lewis, “Lignin primary structures and dirigent sites,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 16, pp. 407–415, 2005.
- [41] R. A. Burton, M. J. Gidley, and G. B. Fincher, “Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 6, no. 10, pp. 724–732, 2010.

- [42] O. M. Terrett and P. Dupree, “Covalent interactions between lignin and hemicelluloses in plant secondary cell walls,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 56, pp. 97–104, 2018.
- [43] R. R. Selvendran, B. J. H. Stevens, and M. S. Du Pont, “Dietary Fiber: Chemistry, Analysis, and Properties,” *Adv. Food Res.*, vol. 31, no. C, pp. 117–209, 1988.
- [44] L. A. Johnson, P. J. White, and R. Galloway, *Soybeans*, 1st ed. Elsevier, 2008.
- [45] M. S. Buckeridge, “Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation,” *Plant Physiol.*, vol. 154, no. 3, pp. 1017–1023, 2010.
- [46] S. C. Fry, *The growing plant cell wall : chemical and metabolic analysis*, 18a ed. Harlow, Essex.: Longman Scientific & Technical, 1988.
- [47] G. O. Aspinall, R. Begbie, A. Hamilton, and J. N. C. Whyte, “Polysaccharides of Soy-beans. Part III Extraction and Fractionation of Polysaccharides from Cotyledon Meal,” *J. Chem. Soc.*, pp. 1065–1070, 1967.
- [48] G. O. Aspinall and I. . W. Cottrell, “Polysaccharides of Soybeans . VI . Neutral Polysaccharides from Cotyledon Meal,” *Can. J. Chem.*, vol. 49, pp. 1019–1022, 1970.
- [49] G. O. Aspinall, I. . W. Cottrell, S. V. Egan, I. M. Morrison, and J. N. C. Whyte, “Polysaccharides of Soy-beans. Part IV. Partial Hydrolysis of the Acidic Polysaccharide Complex f rorn Cotyledon Meal,” *J. Chem. Soc.*, pp. 1071–1080, 1967.
- [50] A. Nakamura, H. Furuta, H. Maeda, Y. Nagamatsu, and A. Yoshimoto, “The structure of soluble soybean polysaccharide,” *Hydrocolloids*, pp. 235–241, 2000.
- [51] M. M. H. Huisman, “Elucidation of the chemical fine structure of polysaccharides from soybean and maize kernel cell walls,” Wageningen University, 2000.
- [52] G. O. Aspinall and J. N. C. Whyte, “Polysaccharides of Xoy- beans. Part I. Galactomannans from the Hulls.,” *J. Chem. Soc.*, no. 972, pp. 5058–5063, 1964.
- [53] G. O. Aspinall, K. Hunt, and I. M. Morrison, “Polysaccharides of Soy-beans. Part V. Acidic Polysaccharides from the Hulls,” *J. Chem. Soc.*, pp. 1080–1086, 1967.

- [54] G. O. Aspinall, K. Hunt, and I. M. Morrison, "Polysaccharides of Soy-beans. Part II. Fractionation of Hull Cell-wall Polysaccharides and the Structure of a Xylan," *J. Chem. Soc.*, pp. 1945–1949, 1966.
- [55] J. Wu, C. Hettenhausen, S. Meldau, and I. T. Baldwin, "Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata*," *Plant Cell*, vol. 19, no. 3, pp. 1096–1122, 2007.
- [56] J. Glazebrook, "Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens," *Annu. Rev. Phytopathol*, vol. 43, pp. 205–227, 2005.
- [57] J. Wu and I. T. Baldwin, "New insights into plant responses to the attack from insect herbivores," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 44, pp. 1–24, 2010.
- [58] R. Giacometti *et al.*, "Early perception of stink bug damage in developing seeds of field-grown soybean induces chemical defences and reduces bug attack," *Pest Manag. Sci.*, vol. 72, no. 8, pp. 1585–1594, 2016.
- [59] B. B. Buchanan, W. Gruisem, and R. L. Jones, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Second edi. Garsington Road, Oxford: John Wiley & Sons, 2015.
- [60] M. Peiffer and G. W. Felton, "Insights into the saliva of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae)," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, 2014.
- [61] G. D. Thomas, C. M. Ignoffo, C. E. Morgan, and W. A. Dickerson, "Southern Green Stink Bug: Influence on Yield and Quality of Soybeans," *J. Econ. Entomol.*, vol. 67, no. 4, pp. 501–503, 1974.

CAPÍTULO 2

Materiales y Métodos

2.1 Consideraciones generales

Para las extracciones y los fraccionamientos se utilizaron agitadores magnéticos marca IKA modelo C-MAG HS 7 con las respectivas barras magnéticas. El material fue molido en un molino de alta velocidad FW 100 Arcano (China). Para centrifugar, se utilizaron las centrífugas Cavour VT-3216 y Gelelectronic G 42 N° 3839 industria argentina, trabajando a 3.000 rpm, Hermle Z323 K a 6.500 rpm (Alemania) y Eppendorf Centrifuge 5415 R (Canadá) a 9.000-10.000 rpm.

La concentración de las soluciones acuosas se realizó mediante un evaporador rotatorio Büchi 254740 (Suiza) a presión reducida, con temperaturas del baño de agua de 50 °C.

Las muestras en solución acuosa se llevaron a sequedad utilizando un liofilizador Termovac Industries Corp., a presiones inferiores a 0,1 mm Hg (100 mTorr), y a temperaturas del condensador cercanas a - 45 °C.

Para la homogeneización de las soluciones y suspensiones de las muestras se utilizó un vórtex Mixer DLab (China) modelo MX-S. En los casos necesarios, las muestras se sonicaron en un equipo Ultrasonic Cleaner, Arcano (China).

Las hidrólisis se realizaron en viales de 5 mL con tapas de teflón Sigma-Aldrich en bloque calentador Boekel Scientific (Estados Unidos) en seco con control de temperatura.

Las diálisis se realizaron a temperatura ambiente, utilizando tubos de celulosa (Spectra Por, Estados Unidos), seleccionando el diámetro según el volumen a dializar, 3500 kDa o 6000 – 8000 kDa. El corte y rango de peso molecular, tiempo y sistema empleado se detalla en cada caso.

Las determinaciones colorimétricas se llevaron a cabo con un espectrofotómetro PG Instrument T70 UV/Vis Spectrómeter (Reino Unido), empleando celdas de cuarzo de 1 cm de recorrido óptico.

Na₂CO₃, DMSO, D₂O, α-amilasa tipo VI-B de páncreas bovino se adquirieron a Sigma-Aldrich (Saint Louis, Estados Unidos). KOH, H₂SO₄, piridina, anhídrido acético, fenol e NaOH se compraron a Anedra (Buenos Aires, Argentina). HCl se adquirió a Biopack (Buenos Aires, Argentina). CDTA, el reactivo Folin-Ciocalteu, TFA, NaBH₄, ácido gálico, a Merck (Darmstadt,

Germany). LiCl era de la empresa Mallinckrodt (New York, Estados Unidos), acetona, de Sintorgan (Buenos Aires, Argentina), y el ácido D-(+)-galacturónico, de Eastman Kodak (Nueva York, Estados Unidos).

2.2 Material utilizado

El cultivar comercial de soja Williams 82 (PI 518671) se cultivó en diciembre de 2014 en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires y se cosechó durante el otoño en la etapa del ciclo de desarrollo R6, cuando la semilla se encuentra completamente llena. Se realizaron prácticas agronómicas y fechas de siembra estándares. El ciclo reproductivo de *Glycine max* se muestra en la Figura 2.1.

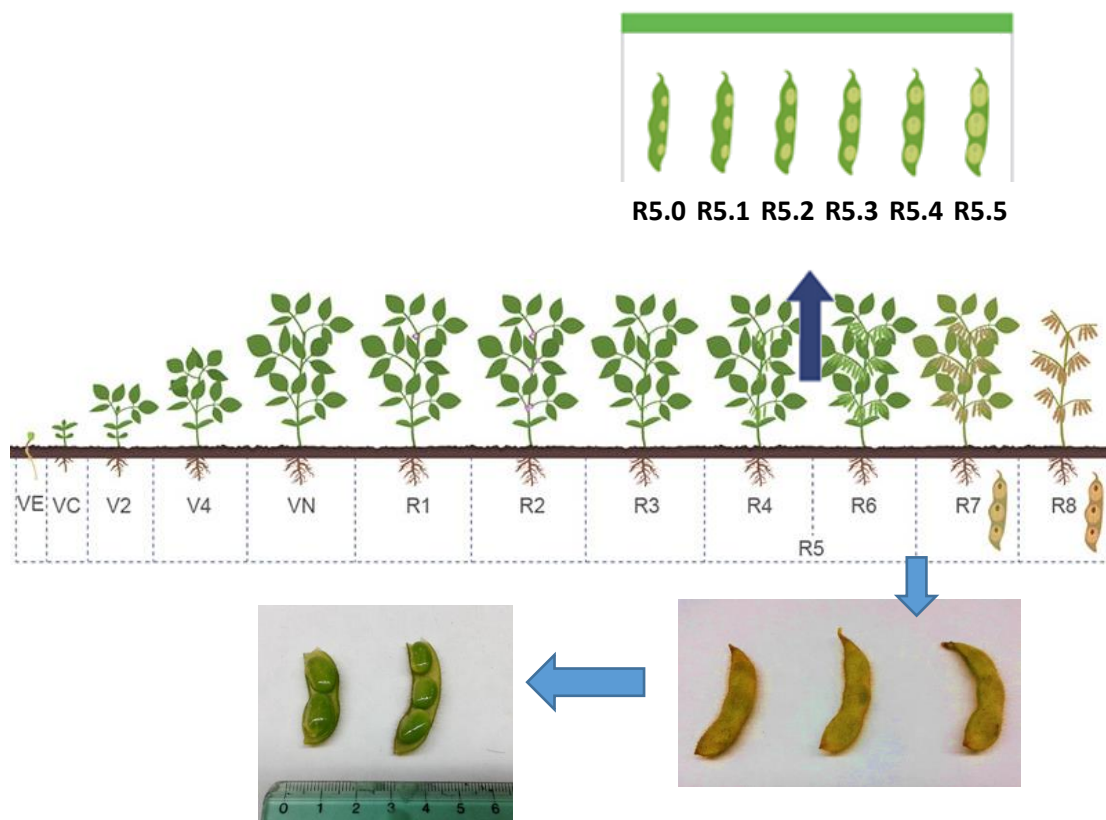


Figura 2.1: Ciclo reproductivo de *Glycine max*. Flechas indican los estadios donde se realizaron los tratamientos (R5).

Para probar los efectos de la herbivoría en semillas de soja de la variedad Williams en desarrollo cultivadas en el campo, se recolectaron adultos de *Nezara viridula* L (Heteroptera: Pentatomidae) de varios campos agrícolas de soja de localidades rurales cerca de Buenos Aires y se mantuvieron durante al menos 5 días bajo control en cámara fotoperiodicas (temperatura: 25 ± 3 °C, humedad relativa: $60 \pm 9\%$ y fotoperíodo 15:9 - luz:oscuridad). Durante la estancia en la cámara, se permitió que las chinches se alimentaran con una dieta artificial, que consistía en semillas de girasol y soja rehidratadas y algodón empapado en agua (suplementado con ácido ascórbico al 0,5% p / v). Antes de realizar la inducción sobre las vainas de soja, se privó a las chinches de alimento por 48 h para aumentar su motivación a alimentarse. Las plantas fueron protegidas contra el ataque de insectos antes de aplicar los tratamientos. Cuando las plantas cultivadas en el campo alcanzaron la etapa reproductiva R5 (semillas comenzando a llenarse; Figura 2.1), se seleccionaron 2/3 vainas de semillas de tamaños similares y del mismo nodo dentro de la planta para los tratamientos; se realizaron dos tratamientos durante 14 días:

- (1) daño por chinches: los insectos se colocaron en vainas y se encerraron en una bolsa de malla fina, realizando recambios de aquellos que morían (Figura 2.2).
- (2) vainas rociadas con 1,5 mM de ácido salicílico (SA) (Sigma, St Louis, Misuri, Estados Unidos) cada 4/5 días.



Figura 2.2: Sistema de obtención de vainas inducidas por la picadura de *Nezara viridula* con plantas de soja cultivadas a campo.

Además, un lote se dejó sin tratamiento como control (CTR), en la Figura 2.3 se muestra cómo se protegen las plantas completas para cosechar vainas sin inducción por insectos. Para los tratamientos de daños por chinches, se recolectaron muestras después de la confirmación visual del daño del estilete por las chinches. El procedimiento es como se describe en Giacometi et al., 2016 [1]



Figura 2.3: Sistema de protección de plantas de soja cultivadas a campo para la obtención de vainas no inducidas por hervivoría.

De este modo, se obtuvieron las vainas cosechadas y cortadas con la mano. Inmediatamente después de extraer las vainas, éstas se guardaron en una conservadora con hielo hasta llegar al laboratorio, donde se reservaron en freezer a -80°C hasta su utilización.

Se retiraron las semillas de las vainas y se remojaron en acetona con el objetivo de retirar el tegumento y separarlo del cotiledón [2], lo que se logró apretando suavemente las semillas. Los cotiledones se molieron y se realizó la extracción con etanol. El sobrenadante se descartó y el sólido se lavó consecutivamente con acetona y éter etílico, se dejó secar, obteniendo el residuo insoluble en alcohol (RIA) que fue el material de partida para la extracción

secuencial y para determinar los rendimientos de las fracciones. La extracción secuencial fracciona la pared celular a medida que aumenta la alcalinidad del medio.

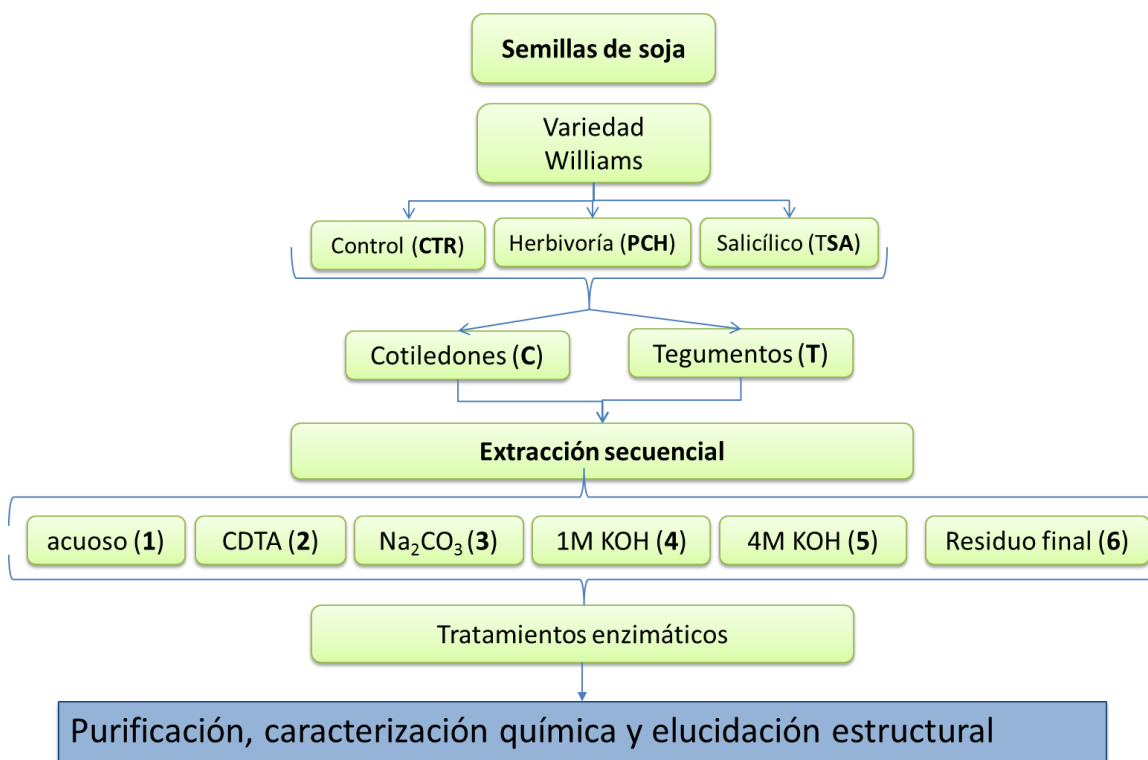


Figura 2.4: Diagrama de obtención de cotiledones y tegumentos de los tratamientos aplicados sobre la variedad Williams.

2.3 Extracción de los polisacáridos de pared celular

A partir de los cotiledones y los tegumentos, se realizó la extracción secuencial de los polisacáridos de pared celular siguiendo los procedimientos de Fry (1988) [2].

10 g de material molido se extrajeron con etanol (80 g/L) durante la noche a temperatura ambiente. El residuo se lavó consecutivamente con acetona y éter

etílico, se secó al aire libre bajo la campana durante 1 día, dando un residuo insoluble en etanol (RIA). Se realizó una extracción secuencial sobre RIA:

- (1) Con agua, a temperatura ambiente
- (2) Con CDTA 0,05 M (ácido trans-1,2-diaminociclohexano-*N,N,N',N'*-tetraacetico monohidratado) a pH= 6
- (3) Con Na_2CO_3 0,05 M
- (4) Con KOH 1 M
- (5) Con KOH 4 M

Cada extracción se realizó en una suspensión de la muestra a extraer de 20 g/L durante al menos 20 h y las suspensiones obtenidas se centrifugaron a 6.500 rpm, dando un sobrenadante y un residuo, los cuales se dializaron (MWCO 6.000-8.000) contra agua potable durante 24 h, luego contra agua destilada por más 8 h, y finalmente se liofilizaron por separado.

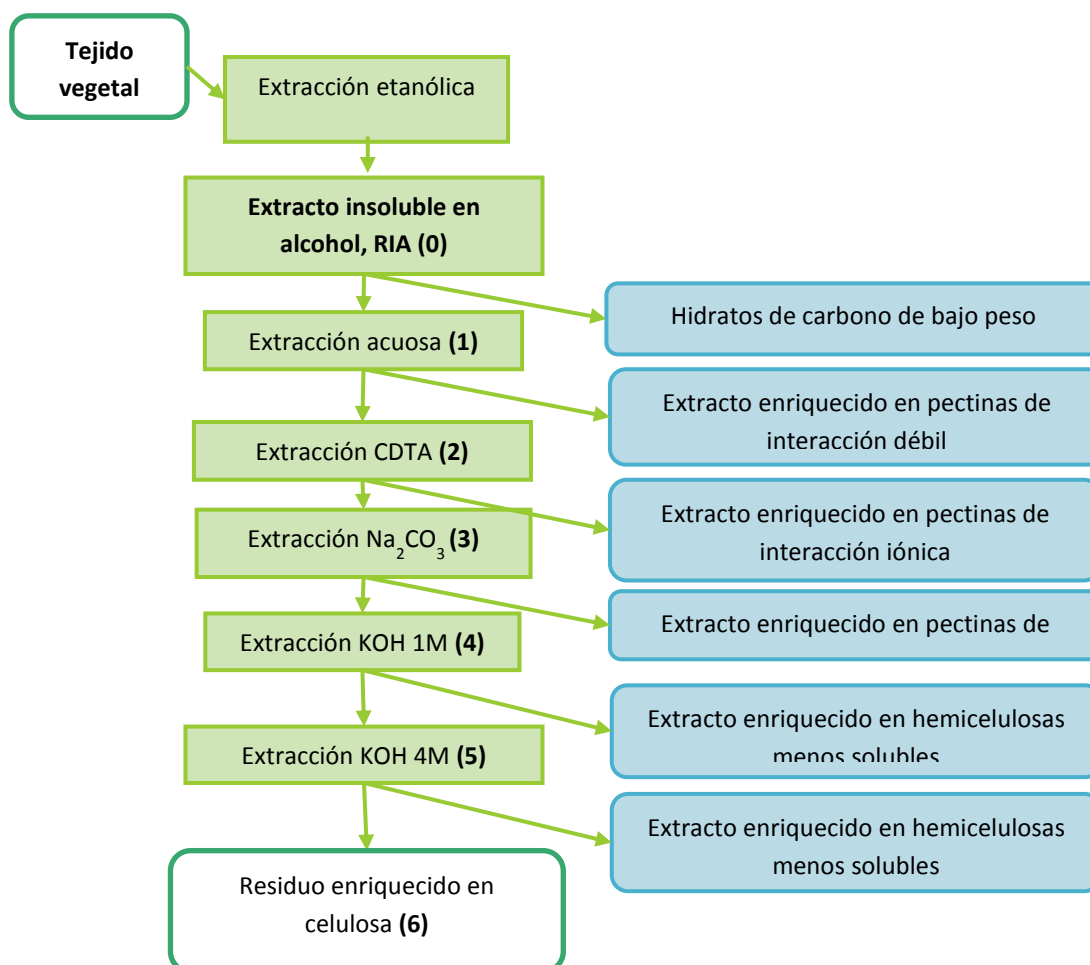


Figura 2.5: Extracción secuencial realizada sobre tegumentos y cotiledones de soja indicando las respectivas fracciones a obtener, según la literatura [3].

Cada extracción se realizó dos veces consecutivas y ambos extractos se juntaron y trataron posteriormente como una sola muestra.

2.4 Análisis químico de polisacáridos de la pared celular

2.4.1 Métodos colorimétricos

El **contenido total de hidratos de carbonos** se analizó mediante el método del fenol-sulfúrico (Dubois et al. 1956 [4]) adaptado para material insoluble (Ahmed y Labavitch 1977 [5]), utilizando galactosa como estándar:

2 mg de cada fracción se trataron con 1 mL de ácido sulfúrico concentrado en un baño de hielo con agitación por 10 minutos. Luego, se agregó cuidadosamente, gota a gota, 1 mL de agua destilada, manteniendo el vial en baño de hielo y se dejó agitando hasta disolución total. Una vez solubilizadas las muestras, se transfirieron a matraces de 5 mL y se enrasó con agua destilada.

Para la determinación, a 0,5 mL de solución conteniendo como máximo 80 µg/mL de hidratos de carbono, se agregaron 0,5 mL de fenol al 5 % p/p y se mezclaron. En seguida, se agregaron 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado de una sola vez para asegurar un calentamiento máximo y se dejaron reposar 10 min. Posteriormente, los tubos se agitaron en vórtex y se mantuvieron 20 min a temperatura ambiente para que se enfríen. El blanco se preparó con agua destilada y se leyó la absorbancia a 490 nm. El contenido de hidratos de carbono totales se cuantificó por referencia a curvas de calibración con patrón de galactosa. El resultado se expresó como porcentaje de azúcar anhidro con factor de corrección $\times (162/180)$.

El contenido de **ácidos urónicos** determinó según el método de Filisetti-Cozzi, 1991 [6]. Reactivos necesarios para la determinación:

Solución A: sulfamato de amonio 4 M (pH 1,6).

Solución B: tetraborato de sodio 0,0125 M en ácido sulfúrico concentrado, grado analítico.

Solución C: 3-Fenilfenol (0,15 %) en hidróxido de sodio acuoso al 0,5 %.

Se tomaron alícuotas de la solución de la muestra de polisacárido conteniendo hasta 200 nmoles de ácido hexurónico y se diluyeron con agua hasta 0,4 mL. Posteriormente, se agregaron 40 μ L de Solución A a cada tubo, con posterior agitación en vórtex. A los tubos colocados en baño de hielo, se agregaron 2,4 mL de Solución B. Nuevamente, se agitaron los tubos, y se llevaron a un baño de agua a 100 °C durante 20 min, tapados con bolitas de vidrio. Luego, se colocaron en un baño de hielo para alcanzar la temperatura ambiente rápidamente y se agregaron 80 μ L de la Solución C. Finalmente, los tubos fueron agitados, y luego se los dejó reposar durante 10 min, leyendo las absorbancias a 525 nm. El color permanece estable por 1 h.

Se preparó un blanco con agua destilada y la curva estándar se obtuvo con una solución de ácido D-galacturónico (0,1 mg/mL). En los cálculos se consideró que la absorbancia producida por reacción con azúcares neutros es 1/40 de la que produce el ácido D-galacturónico. El resultado se expresó como porcentaje de azúcar anhidro con factor de corrección $\times (176/194)$.

El porcentaje de azúcares neutros (NS) se determinó después de restar el contenido de ácido urónico del total de carbohidratos. Para ello, también se llevó a cabo la reacción fenol- H_2SO_4 con un estándar de ácido D-galacturónico, que mostró una relación de absorbancia de 0,42 frente al mismo peso de galactosa.

El contenido de **proteínas** se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Lowry et al., 1951 [7]. Las soluciones a utilizar son:

Solución A, Na_2CO_3 al 2 %, en NaOH 0,1 M.

Solución B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0,5 %, en solución de tartrato de sodio y potasio al 1 %.

Solución C: preparada mezclando 50 mL de la Solución A y 1 mL de la Solución B. Esta mezcla puede ser usada hasta 24 h posteriores a su preparación.

Solución D: dilución al medio de un volumen del reactivo de Folin - Ciocalteu (Merck). Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de ser usada, y su absorbancia contra agua destilada debe ser inferior a 0,040.

Para realizar la determinación, se tomaron alícuotas de la solución de la muestra conteniendo hasta 0,5 mg de proteínas por mL y se llevaron a un volumen final de 0,4 mL con agua destilada. Luego, se agregaron a cada tubo 2,5 mL de la Solución C. Se mezclaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante unos 10 min. Se agregaron 0,2 mL de la Solución D, rápidamente y con agitación. En forma paralela se preparó un blanco de agua destilada. Las muestras se mantuvieron durante 30 min más en reposo y, luego de este tiempo, se leyeron las absorbancias a 500 nm. Para determinar el porcentaje de proteínas presentes en las muestras, se preparó una curva patrón con solución de albúmina de suero bovino de 314 µg/mL.

El **grado de esterificación** (Gme) de los ácidos urónicos (ésteres metílicos) fue determinado utilizando el método colorimétrico descrito por Wood & Siddiqui [8]. Las soluciones necesarias para esta determinación son:

Solución de KMnO_4 2%.

Solución de NaAsO_2 0,5 M (en H_2SO_4 0,12 N); preparar en el día.

Solución de 2,4-pentanodiona (acetilacetona) 0,02 M (en buffer acetato de amonio 2M / ácido acético 0,05M), preparada en el día.

Para proceder con la determinación, se saponificó la muestra con NaOH 0,5 N durante 1 h a temperatura ambiente; luego se acidificó con H_2SO_4 5,5 N. Se tomaron alícuotas de la solución resultante llevándolas a un volumen final de 1 mL con H_2SO_4 1 N en tubos con tapa a rosca. Éstos fueron entonces colocados en un baño de hielo y se agregaron 100 µL de la solución de KMnO_4 sin salpicar las paredes del tubo. A continuación, se agitaron en un vórtex y se los dejó nuevamente durante 15 min en baño de hielo. Luego, se adicionaron 100 µL de la solución de NaAsO_2 y 300 µL de agua destilada. Después de dejarlos reposar

durante 1 h a temperatura ambiente, se agregó 1 mL de solución de 2,4-pentanediona, con posterior agitación, manteniéndolos tapados, durante 15 min en un baño de agua a 58-60 °C. Finalmente, se los dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se leyeron las absorbancias a 412 nm antes de transcurrida la primera hora. Se preparó un blanco con agua destilada y la curva estándar con una solución de metanol (0,1535 mg/mL). El grado de metilación (Gme) se calculó como la relación molar entre el metanol generado y los ácidos urónicos presentes, determinados por el método colorimétrico indicado anteriormente.

El **contenido de grupos acetilo** de polisacáridos acetilados se determinó mediante el método de ácido hidroxámico (Hestrin, [9]). Se utilizaron las siguientes soluciones:

NH₂OH·Cl 2 M guardada en frío.

NaOH 3,5 M.

HCl concentrado (HCl : H₂O = 1 : 2).

FeCl₃ · 6H₂O 0,37 M en HCl 0,1 M.

Cloruro de acetilcolina 0,004 M en CH₃COONa 0,01 N (pH 4,5), se preparó en el momento.

Para la medición, se utilizó acetilcolina como estándar. Se mezclaron 1 mL de NaOH 3,5 M y 1 mL de cloruro de hidroxilamina (NH₂OH·Cl) 2 M y se dejaron durante 3 h a temperatura ambiente. Se agregó 1 mL de una solución de la muestra conteniendo como máximo 5 µmol/mL de ésteres de acetilo y se dejó reaccionar de 2 a 5 min. Se llevó el pH de la mezcla a 1 con una solución de HCl 12% y se agregó finalmente 1 mL de FeCl₃ 0,37 M en HCl 0,1 M. Se midió inmediatamente la absorbancia a 540 nm.

El **contenido de fenoles totales** se determinó mediante el método de Bunzel et al. [10], con hidrólisis alcalina previa de la muestra, que libera los compuestos fenólicos retenidos por uniones covalentes. Se saponificaron ~ 50 mg de RIA con 5 mL de NaOH 2 M y se mantuvieron durante toda la noche en atmosfera de nitrógeno, a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Posteriormente, se agregaron a cada muestra 950 µL de HCl concentrado. Los sobrenadantes fueron separados por centrifugación durante 15 min a 8000 g (6° C). Las hidrólisis se realizaron por duplicado. Los sobrenadantes de la hidrólisis

alcalina se utilizaron para evaluar el contenido de polifenoles totales según Shui & Leong (2006) por la técnica de Folin-Ciocalteu. Para la reacción colorimétrica y posterior medición espectrofotométrica, se tomaron 40 μL de las muestras hidrolizadas y se agregaron 1800 μL de una mezcla de reactivo de Folin-Ciocalteu y H_2O desionizada (relación 1:10). Se agitó y se dejó reaccionar durante 5 min a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 1200 μL de una solución de NaHCO_3 7,5 % (p/v) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h. Finalizada la reacción y completado el desarrollo del color, se evaluó la absorbancia a 765 nm. Para la curva de calibración se usó como estándar una solución de 2 mg/mL de ácido gálico (Anedra, Argentina). El contenido de fenoles se informó como mg ácido gálico/g de RIA (pared celular).

La determinación de **hidroxiprolina** se llevó a cabo a través del método descrito por Leach [11]. Se utilizaron las siguientes soluciones:

HCl 6 M en fenol al 1%.

CuSO_4 0,05 M.

NaOH 2,5 M.

H_2O_2 6% (preparada en el día).

H_2SO_4 3 N.

p-Dimetilaminobenzaldehído 5% en *n*-propanol (se mantuvo protegido de la luz).

Primero, es necesario hidrolizar ~ 2 mg de la muestra en 2 mL de HCl 6 M en fenol al 1%, por 1 día entero. Se tomó 1 mL de hidrolizado, se agregó 1 mL de CuSO_4 y 1 mL de NaOH, se agitó en un vórtex y posteriormente el tubo de ensayo sumergió en un baño de agua a 40 °C durante 3 min. A continuación, se agregó 1 mL de H_2O_2 6%, se mezcló y se dejó en el baño de agua por 10 min más, agitando ocasionalmente. Transcurrido ese tiempo, se agregaron 4 mL de H_2SO_4 3 N y 2 mL de la solución de p-dimetilaminobenzaldehído, se tapó cada tubo con una bolita de vidrio y se dejó en el baño de agua por 16 min más. Se enfrió, se agitó y se midió la absorbancia a 555 nm. Como estándar se utilizó una solución de 104 $\mu\text{g/mL}$ de L-hidroxiprolina (Anedra, Argentina).

2.4.2 Determinación de lignina Klason

El contenido de lignina se estimó a través de este método gravimétrico, según Dence [12], medido como el residuo insoluble en ácido sulfúrico: la muestra de RIA (1 g) en un baño de hielo se trató durante 10 min con ácido sulfúrico concentrado (1 mL); luego, se añadió agua (1 mL) y la muestra se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó agua hasta una concentración de ácido sulfúrico de 3% y se transfirió el material del vaso de precipitados a un matraz. Se hirvió la solución durante 4 h, manteniendo un volumen constante mediante el uso de un condensador de reflujo. Una vez terminado este procedimiento, se obtiene un precipitado que se centrifugó, se lavó con abundante agua al menos 3 veces y se filtró utilizando un embudo tipo Büchner y papel filtro. Una vez filtrado, el precipitado se lava nuevamente con abundante agua para eliminar cualquier residuo de ácido sulfúrico. Sobre un vidrio reloj, se lleva a estufa a 60° C hasta masa constante. Se calcula el porcentaje de lignina con respecto al total de pared (RIA).

2.4.3 Determinación de la composición en monosacáridos neutros.

Se determinaron los monosacáridos componentes de los extractos obtenidos por cromatografía gaseosa (CG), utilizando detección por ionización de llama (FID) o espectrometría de masa (MS). Para ello, la primera etapa consiste en hidrolizar la muestra hasta obtener sus monosacáridos constituyentes:

En un vial provisto de cierre de teflón se pesaron aproximadamente 3 mg de muestra. Se adicionaron 200 µL de ácido trifluoroacético concentrado (TFA 13M) a 37°C durante 1 h, seguidamente se llevó la concentración del ácido a 11,5M con agua destilada y se calentó a 100° C por 1 h, y por último a una concentración 2 M a 121° C por 1,5 h, para alcanzar las condiciones habituales

de hidrólisis para polisacáridos (Morrison, 1988 [13]). Luego, las muestras se llevaron a sequedad bajo corriente de aire. Posteriormente, los hidrolizados se disolvieron en agua y nuevamente se evaporaron; este tratamiento se realizó las veces necesarias como para eliminar totalmente el ácido, reconocible por el olor. Las muestras fueron colocadas en un desecador al vacío durante una noche.

A continuación, los monosacáridos se modificaron químicamente, de forma tal de obtener derivados volátiles para realizar la cromatografía:

A los viales secos se les agregó 0,5 mL de NH_4OH 1 M y los azúcares se redujeron con NaBH_4 (2 mg) durante al menos 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se adicionó ácido acético glacial para neutralizar y eliminar residuos del reductor. Posteriormente, las muestras se descationizaron por agregado de resina Amberlite® IR-120 (H^+). Las muestras fueron filtradas y evaporadas a sequedad. El ácido bórico generado se eliminó como borato de metilo, lavando 5 veces con 0,5 mL de metanol y evaporando a sequedad consecutivamente. Los residuos se dejaron en desecador al vacío durante una noche. Los alditos obtenidos fueron acetilados con 0,5 mL de anhídrido acético + 0,5 mL de piridina, calentando durante 45 min a 100 °C. Se enfrió a temperatura ambiente y se realizó una extracción con cloroformo y agua destilada. Se descartó la fase acuosa y se volvió a extraer con agua destilada y consecutivamente 2 veces con una solución saturada de bicarbonato de sodio y 2 veces con agua destilada. Finalmente, los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro y se llevaron a sequedad. El residuo obtenido se disolvió en 20 μL de cloroformo y se inyectó 1 μL en el cromatógrafo gaseoso.

Las muestras se analizaron usando un cromatógrafo gas-líquido Agilent 7890A, Avondale PA, USA (figura 2.6) equipado con dos detectores, uno de ionización de llama (FID) y otro de espectrometría de masa por impacto electrónico Agilent 5977^a (MS-EI). En el caso de CG FID, se utilizó N_2 como gas portador y una columna capilar SP-2330 (Supelco, Bellefonte PA, USA) de 30m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0,20 μm de espesor de la fase líquida, con un flujo de 1,3 ml min⁻¹ y una relación de split 25:1. La temperatura del inyector y del detector fue de 300°C y las condiciones cromatográficas fueron las

siguientes: de 200°C a 240°C a 2°C min⁻¹, seguido por 15 min manteniendo esa temperatura, para los acetatos de alditos.

Al utilizar CG-MS, se utilizó la misma columna que en el caso anterior, pero en este caso, con He como gas portador con un flujo de 1,3 mL min⁻¹ trabajando a 70 eV, la temperatura del inyector fue de 250°C.

En el cromatograma se identificaron los componentes de las muestras respecto a una corrida patrón, se cuantificó su abundancia según el área bajo los picos, cuyo valor es calculado por el software del integrador. Se corrigió el área de los picos por el peso molecular de los acetatos de alditos peracetilados. Esto permitió calcular la composición molar (%) de cada monosacárido constituyente.



Figura 2.6: Cromatografo gaseoso Agilent© 7890A, acoplado a espectrómetro de masa 5977^a

2.4.4 Análisis por metilación

Para obtener información de la posición de los enlaces glicosídicos, se realizaron los derivados permetilados de los polisacáridos. 10 mg del polisacárido (Ciucanu y Kerec [14]) se disolvieron en DMSO anhidro (1 mL) y se utilizó como base NaOH (10 - 20 mg) finamente pulverizado, la mezcla se agitó vigorosamente durante 1 h y luego se agregó CH₃I (0,5 mL), manteniendo la reacción en baño de hielo hasta terminar de agregar el CH₃I. La reacción se mantuvo con agitación constante durante 1 h. Por último, los polisacáridos obtenidos fueron hidrolizados y los derivados metilados se derivatizaron a los acetatos de alditoles correspondientes, según el procedimiento descrito en 2.4.2 para los polisacáridos nativos. Se realizaron dos o tres secuencias de metilación para lograr la permetilación de las muestras. Para la cromatografía de los derivados, se utilizó un programa para alditoles parcialmente metilados peracetilados: 160 °C→210 °C (1 °C/ min) y 210 °C→230 °C (2 °C/min), a 230 °C durante 30 min.

2.4.5 Cromatografía de intercambio aniónico DEAE-Sephadex A-25

Con el propósito de fraccionar los extractos y lograr la separación de los tipos de polisacáridos, en base al contenido de grupos ácidos, se llevaron a cabo diferentes separaciones por cromatografía de intercambio aniónico: se preparó una solución lo más concentrada posible de cada muestra (~ 0,4 mg/mL) en agua, con agitación magnética durante toda la noche. Se utilizó una columna de vidrio (Econo-Column, BIO-RAD) de 30 cm de largo por 1,5 cm de diámetro, con control de flujo a baja presión con una bomba peristáltica (BIO RAD Econo pump, Estados Unidos) y colector (BIO RAD Modelo 2110, Estados Unidos), con un flujo de 0,9 mL/min. La resina utilizada fue DEAE-Sephadex A-25, eluyendo con agua y posteriormente concentraciones crecientes de NaCl 0,5 M, 1 M, 2 M y 4 M. La recolección de fracciones se realizó en alícuotas de 50 gotas, medidas con

el contador de gotas del colector (~ 5 mL). Las alícuotas recolectadas se analizaron respecto al contenido de hidratos de carbono totales [15] para realizar el perfil de elusión y reconocer las fracciones obtenidas.



Figura 2.7: Equipo para cromatografía en columna, bomba, colector y columna BIO-RAD©

2.4.6 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

A partir de 20 mg de muestra, se desarrolló el intercambio isotópico con agua deuterada (D_2O) por evaporaciones repetidas. La muestra se disolvió en D_2O (0,75 mL) y se colocó en tubos de 5 mm de diámetro. Los espectros se registraron a temperatura ambiente y en algunas oportunidades a 70° en un espectrómetro Bruker Avance II 500 (Karlsruhe, Alemania). Para los experimentos de 1H NMR los parámetros fueron: un ancho espectral de 6,25 kHz, un ángulo de pulso de 76° , un tiempo de adquisición de 3 s, un retardo de relajación de 3 s, para 32 barridos.

Para experimentos de RMN ^{13}C desacoplada de protones de 125 MHz, los parámetros fueron: un ancho espectral de 29,4 kHz, un ángulo de pulso de $51,4^\circ$, un tiempo de adquisición de 0,56 s, un retardo de relajación de 0,6 s, para 25000 escaneos. Las señales se referenciaron a acetona interna a 2,21 ppm para ^1H RMN y 31,1 ppm para experimentos de ^{13}C RMN, respectivamente. Las secuencias de pulsos para las técnicas ^1H - ^1H COSY y ^1H - ^{13}C HSQC fueron suministradas por el fabricante del espectrómetro; los espectros se registraron a temperatura ambiente y se obtuvieron a una frecuencia base de 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C .

Los espectros HSQC se realizaron con la secuencia “hsqcetgpsi2” con los siguientes parámetros: TD de 1532 x 512, NS de 16, y un tiempo de relajación de 1,52 s.

2.4.7 Hidrolisis parciales para aumentar solubilidad en agua

Una vez extraídas las muestras, éstas se insolubilizan parcialmente, por lo que son sometidas a hidrólisis ácida parcial, la cual se llevó a cabo según Bilan et al. [16]. Se aplicó para las muestras 3T-H, 5T-H y 6T-H, éstas se calentaron (50 mg) en 1% CH_3COOH (10 mL) durante 4 h a 100°C , la solución se neutralizó con NaHCO_3 , se dializó y se liofilizó para dar los derivados de polisacáridos solubles en agua. En el caso de 6T, el calentamiento se mantuvo durante 8 h. Mientras que la hidrólisis ácida parcial para la muestra 2T se llevó a cabo según Usov [17], con modificaciones, esta se calentó (80 mg) en 1 M de TFA durante 16 h a 70°C , la solución se neutralizó con NaHCO_3 , se dializó y se liofilizó para dar los derivados de polisacáridos solubles en agua.

2.5 Tratamientos enzimáticos

Para generar la purificación de los polisacáridos de pared, logrando degradaciones específicas, se realizaron digestiones enzimáticas sobre algunos extractos.

Tratamiento con α -amilasa:

Para la eliminación de carbohidratos de reserva, los α -glucanos, se realizó un tratamiento usando α -amilasa tipo VIII-B de malta de cebada (Sigma) y se procedió según lo indicado en las especificaciones del distribuidor: Una solución de la muestra (5 mg/mL) en una solución reguladora de fosfato 0,1M a pH 6,9 se mantuvo 24 h a temperatura ambiente, con agitación constante. Luego, se dializó y liofilizó, obteniendo los residuos tratados.

Tratamiento con proteinasa - K

Para la eliminación de proteínas, se realizó el tratamiento enzimático usando Proteinasa K, una serina proteasa que muestra una especificidad de escisión muy amplia, producida por el hongo *Tritirachium album* (Promega) y se procedió según lo indicado en las especificaciones del distribuidor: La concentración de trabajo fue de 100 μ g/mL. Una solución de la muestra (20 mg/mL) en una solución reguladora de Tris-Cl 10 mM a pH 8 y NaCl 50 mM, se mantuvo durante la noche a 37 °C con agitación constante. Luego se dializó y liofilizó, obteniendo los residuos tratados.

Tratamiento con endo-poligalacturonasa

Para la degradar homogalacturonanos y estudiar los productos de la hidrólisis de éstos se utilizó una poligalacturonasa E-PGALUSP, proveniente del hongo *Aspergillus aculeatus* (Megazyme). Corresponde a una (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-galacturonano glicanohidrolasa y realiza hidrólisis aleatoria de enlaces (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-galactosidurónicos en HG. Se procedió según lo indicado en las especificaciones del distribuidor: La concentración de trabajo fue de 10 mg/mL. Una solución de la muestra (2 mg/mL) en buffer acetato 100 mM a pH 5,5; se mantuvo durante la noche a 40° C con agitación constante. Luego, se dializó en

sistema cerrado obteniendo los residuos tratados en el interior del tubo de diálisis y el producto de la degradación en el exterior. Ambos se obtuvieron por liofilización.

2.6 Obtención de saliva de chinche y tratamiento de las fracciones de paredes celulares con las mismas

Se realizó un tratamiento con saliva de *N. viridula* extraída *in situ*, según Giacometti et al. [18], se describe el procedimiento: para recolectar saliva líquida, las chinches adultas se enfriaron en congelador (freezer) durante ~5 min, luego, se inmovilizaron sobre un vidrio con el lado ventral hacia arriba. Se puso una red sobre las chinches y con ayuda de una lupa se despegó el estilete del aparato bucal, dejándolo a 90° respecto al cuerpo de la chinche. La saliva acuosa fue secretada por la punta del estilete. Esta saliva se recogió en una punta de pipeta, y se recolectó en un tubo de muestra. Después de la recolección se almacenó a -80 ° C. (Figura 2.8).

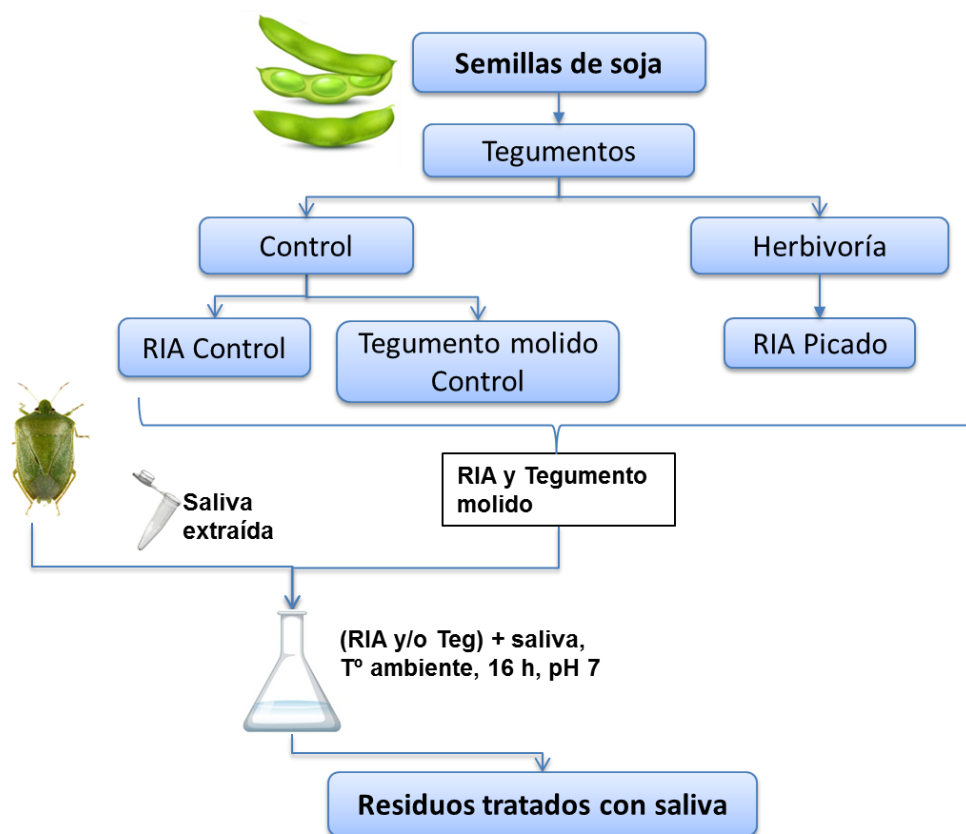


Figura 2.8: Procedimiento para tratamiento de tegumento con saliva de chinche *N. viridula*.

Para realizar la digestión se utilizó un pool de recolección (~30 chinches) que corresponde a ~ 40 μL de saliva, por cada muestra. Se disolvieron 10 mg de sustrato en una pequeña cantidad de buffer fosfato 0,02 M a pH=7, hasta tener una concentración de sustrato del 1% aproximadamente, se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. Luego, se dializó en sistema cerrado y se liofilizó, obteniendo los residuos tratados y el producto que se degradó.

2.7 Estimación de polisacáridos componentes de extractos

La estimación fue realizada partiendo de RGI, que se estimó como ramnosa + ácido galacturónico (proporción 1:1) + arabinosa y galactosa que no formaba parte del GM. Por su parte los galactomananos (GMs) se estimaron como la cantidad total de manosa + la cantidad de galactosa que corresponda según las relaciones Gal:Man encontradas; **1:1.8** para 1T; **1:2.5** para 3T y 4T [19] y **1:3.0** para 5T. El contenido HG se calculó como la cantidad total de UA menos la cantidad de GalA en RGI. Los glucanos/xilanos se infirieron basándose en el comportamiento de extracción, atribuyéndose a los XGs una relación molar estimada Xyl:Glc de **3:4**, y la celulosa se encontraba exclusivamente en el residuo final. Para realizar estas aproximaciones, se consideró además la información de los espectros de RMN.

2.8 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con GraphPad Prism v.5 y v.6. Los valores de contenido molar de monosacáridos constituyentes de algunas muestras se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), la significación estadística se determinó mediante ANOVA unidireccional. Los supuestos del modelo de homogeneidad de varianza y normalidad se probaron utilizando la prueba de Levene y la prueba de Shapiro-Wilk, respectivamente. Cuando no se cumplieron estos supuestos, los datos se transformaron en logaritmo natural para su posterior análisis. Las medias de los tratamientos se compararon con el control mediante la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

2.9 Referencias

- [1] R. Giacometti *et al.*, “Early perception of stink bug damage in developing seeds of field-grown soybean induces chemical defences and reduces bug attack,” *Pest Manag. Sci.*, vol. 72, no. 8, pp. 1585–1594, 2016.
- [2] S. C. Fry, *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*, Primera ed. Caldwell, New Jersey, 1988.
- [3] M. F. Basanta, “Estudio químico y funcional de pectinas y glicanos entrecruzantes de paredes celulares de prunoideas,” p. 201, 2013.
- [4] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, “Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances,” *Anal. Chem.*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, 1956.
- [5] E. R. A. Ahmed and J. M. Labavitch, “Method for accurate determination of cell wall,” *J. Food Biochem.*, vol. 1, no. 4, pp. 361–365, 1977.
- [6] T. M. C. C. Filisetti-Cozzi and N. C. Carpita, “Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars,” *Anal. Biochem.*, vol. 197, no. 1, pp. 157–162, 1991.
- [7] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, “Protein measurement with the Folin phenol reagent,” *J. Biol. Chem.*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.
- [8] P. J. Wood and I. R. Siddiqui, “Determination of Methanol and Its Application to Measurement of Pectin Ester Content and Pectin Methyl Esterase Activity,” *Anal. Biochem.*, vol. 39, pp. 418–428, 1971.
- [9] S. Hestrin, “The reaction of Acetylcholine and other carboxylic acid derivatibed with hydrolylamine and its analytical application,” *J. Biol. Chem.*, vol. 180, pp. 249–261, 1949.
- [10] M. Bunzel, J. Ralph, J. Marita, and H. Steinhart, “Identification of 4-O-5'-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 8, pp. 3166–3169, 2000.
- [11] A. A. Leach, “Notes on a Modification of the Neuman & Logan Method for the Determination of the Hydroxyproline,” *Biochem. J.*, vol. 74, pp. 71–82, 1960.
- [12] C. W. Dence, “The Determination of Lignin,” in *Methods in Lignin Chemistry*, First., S. Y. Lin and C. . Dence, Eds. Verlag Berlin: Springer Berlin, Heidelberg, 1992, pp. 33–61.
- [13] I. M. Morrison, “Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid,” *Phytochemistry*, vol. 27, no. 4, pp. 1097–1100, 1988.
- [14] I. Ciucanu y F. Kerek, “A Simple and Rapid Method for the Permethylation of Carbohydrates,” *Carbohydr. Res.*, vol. 131, pp. 209–217, 1984.

- [15] A. Nakamura, H. Furuta, H. Maeda, T. Takao, and Y. Nagamatsu, "Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 66, no. 6, pp. 1301–1313, 2002.
- [16] M. I. Bilan, E. V. Vinogradova, A. S. Shashkov, and A. I. Usov, "Structure of a highly pyruvylated galactan sulfate from the Pacific green alga *Codium yezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta)," *Carbohydr. Res.*, vol. 342, no. 3–4, pp. 586–596, 2007.
- [17] A. I. Usov, "A new chemical tool for characterization and partial depolymerization of red algal galactans," *Hydrobiologia*, vol. 260–261, no. 1, pp. 641–645, 1993.
- [18] R. Giacometti, V. Jacobi, F. Kronberg, C. Panagos, A. S. Edison, and J. A. Zavala, "Digestive activity and organic compounds of *Nezara viridula* watery saliva induce defensive soybean seed responses," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12, 2020.
- [19] G. O. Aspinall and J. N. C. Whyte, "Polysaccharides of soy-beans. Part I. Galactomannans from the hulls," *J. Chem. Soc.*, no. 5058, pp. 5051–5057, 1964.

CAPÍTULO 3

Cambios en las paredes celulares de tegumentos
de semillas de soja de la variedad Williams.

3.1 Introducción

Cuando se estudia un sistema natural inserto en un ecosistema agronómico como lo es un cultivo de soja a campo, interaccionan directamente herbívoros y defensas vegetales y nos introducimos en la disciplina ecología química. Cuando se genera una interacción planta-insecto, se desarrollan una cascada de reacciones moleculares y señales químicas que se pueden interpretar analizando los metabolitos que producen o secretan cada uno de los organismos que interactúan y descifrar qué tipo de mecanismos utiliza cada uno para llevar a cabo el intercambio necesario. Cuando se produce el ataque de un herbívoro, como es el caso de la chinche verde (*Nezara viridula*), que pica las semillas de soja en crecimiento, se inducen las defensas de la planta [1][2]. La primera frontera física que enfrenta la chinche corresponde a las vainas de soja, que no tienen el valor comercial de las semillas, y, en seguida, antes de llegar al cotiledón, la chinche penetra los tegumentos de la semilla que serían una barrera física de interés para su estudio. Una vez obtenidas las semillas de soja inducidas, se separó el cotiledón del tegumento, según el procedimiento indicado en el Capítulo 2 (Figura 3.1), para arrancar el estudio de este tejido sustancialmente diferente a los cotiledones.

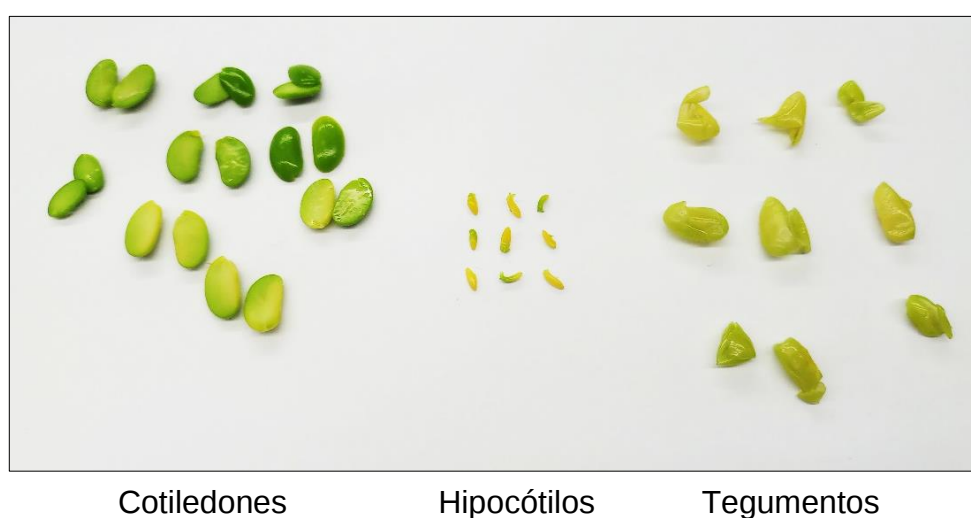


Figura 3.1: Tejidos de semilla de soja cosechados a inicios del estadio R6, del ciclo reproductivo.

El material de partida fue el tejido tegumentario separado del resto de la semilla. Se realizó el análisis de este material para obtener información sobre cómo se modifican estas paredes celulares por la interacción planta-insecto.

3.2 Objetivos

- Aislar pared celular proveniente de tegumentos de semillas cultivadas a campo y sometidas a los diferentes tratamientos.
- Extraer los diferentes polisacáridos constitutivos de las paredes celulares aisladas de los tegumentos a través de la extracción secuencial, con el objetivo de enriquecer los extractos en pectinas, hemicelulosas y celulosa.
- Elucidar la estructura fina de los polisacáridos aislados y comparar sus proporciones y estructuras en función de los tratamientos de los que provengan.
- Encontrar diferencias estructurales y cuantitativas en la composición de los polisacáridos de pared de tegumentos con el fin de explicar los posibles efectos de la inducción por herbivoría sobre la pared.
- Obtener una perspectiva más profunda de la interacción planta-insecto entre chinche y soja.

3.3 Obtención de los tegumentos

Se desarrolló el cultivo a campo de soja para la temporada 2014-2015, en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. La siembra se realizó antes del comienzo del verano y los ensayos y tratamientos se realizaron una vez comenzado el otoño.

Se obtuvieron los tegumentos según el procedimiento descrito (Capítulo 2) [3][4]. A su vez, se procedió a obtener el residuo insoluble en etanol, RIA, seco y pesado, que es el material de partida para la extracción secuencial, respecto al que se calculan los rendimientos de las fracciones.

La extracción secuencial utilizada fracciona las paredes celulares a medida que aumenta la alcalinidad del medio (Figura 3.2). Se obtuvieron los extractos de tegumentos (T) para las semillas picadas por chinche (PCH), tratadas con ácido salicílico (TSA) y control (CTR) a lo largo de la extracción secuencial, asignando los números del 0 (RIA) a 6 (residuo final) para cada fracción obtenida. Con los extractos se desarrolló la caracterización química general de los polisacáridos de pared.

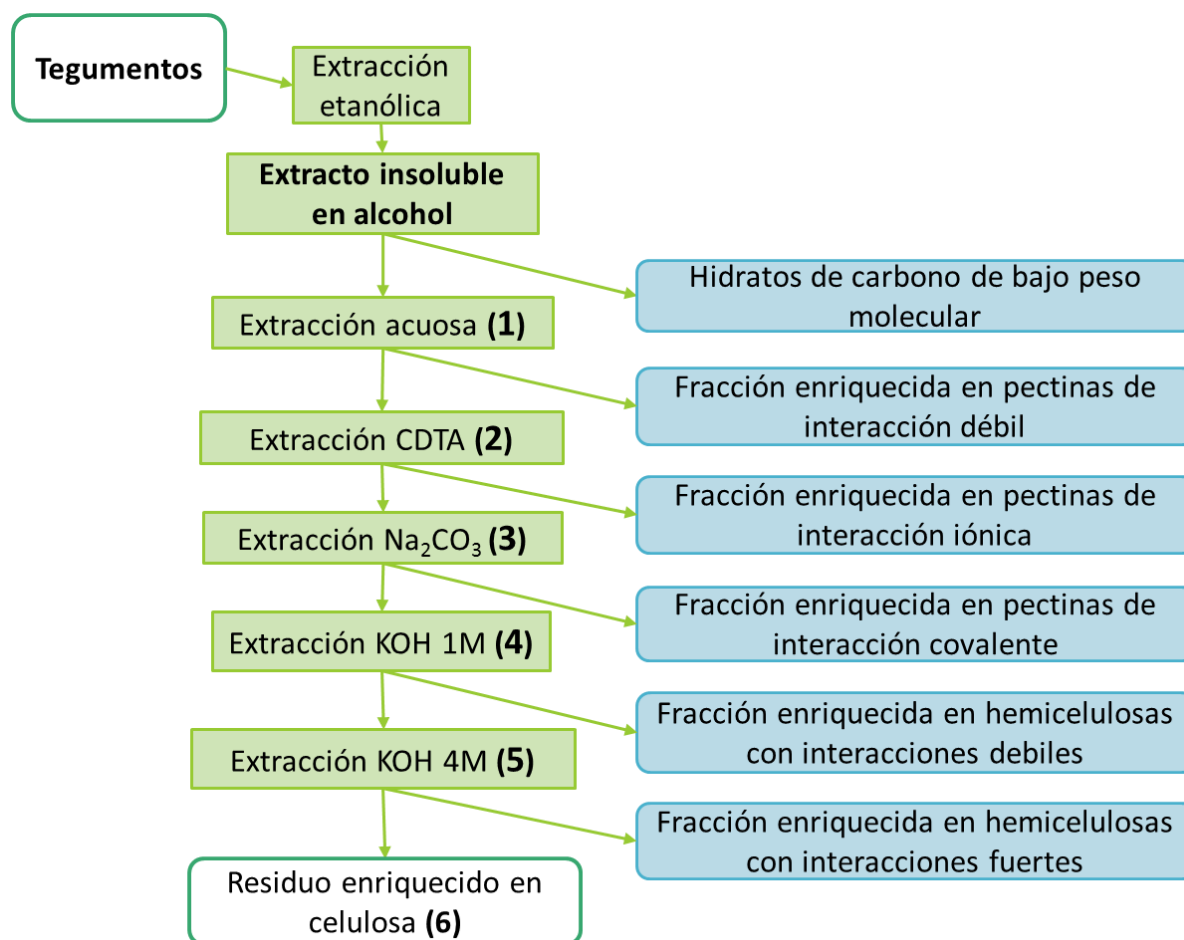


Figura 3.2: Secuencia de extracción de polisacáridos de paredes celulares de tegumentos de soja.

3.4 Resultados de la caracterización química del material

La caracterización general entrega una perspectiva de la composición de cada extracto obtenido en la extracción secuencial. Los rendimientos de las fracciones resultantes muestran cómo se van distribuyendo los polisacáridos, desde los que se encuentran unidos más débilmente a la estructura de la pared, hasta aquellos que se encuentran interaccionando más fuertemente, a medida que se cambian las condiciones de extracción. En las Tablas 3.1 y 3.2 se presenta la composición expresada en porcentaje molar, además de los rendimientos obtenidos de la extracción secuencial, respecto a RIA, de cada uno de los tratamientos y control. Se observan cambios notorios en los monosacáridos constituyentes de cada fracción, lo que indicaría que los polisacáridos que las conforman son diferentes. Además, para cada fracción, se observan cambios entre los tratamientos y las muestras control, tanto en el contenido de ácidos urónicos, como en el de hidratos de carbono neutros y en la composición en monosacáridos constituyentes.

Por otro lado, en la Figura 3.3 se muestran los porcentajes molares de cada extracto, lográndose ver las diferencias en los monosacáridos que se obtienen en cada paso de extracción, además de sus diferencias entre tratamientos y control. Para el extracto acuoso, se observa una mezcla muy heterogénea de monosacáridos, además de diferencias significativas en el contenido de manosa, galactosa y ácido galacturónico, mientras que los extractos 2T contienen ácidos urónicos casi en su totalidad y mayormente sin esterificar (GalAMe). Se observa también, que los extractos obtenidos con la solución de carbonato de sodio (3T), además de gran cantidad de HG, contienen arabinosa, galactosa y ramnosa, pudiéndose tratar mayoritariamente de RGI. A medida que aumenta la alcalinidad del medio, se comienzan a obtener otros monosacáridos componentes, tal como sucede por extracción con KOH 4 M, en que predominan xilosa y manosa, indicando la posible presencia de hemicelulosas.

Table 3.1: Caracterización química general de los extractos obtenidos por extracción secuencial de los tegumentos de semillas de soja (*Glycine max*), con agua, CDTA, y Na₂CO₃¹.

Rend ²		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Monosacáridos neutros		Ácidos urónicos		Proteínas
								Polisacáridos de pared celular	α-glucanos	molar %	Gme ⁴ (%)	
Extracto acuoso												
1T-CTR ³	5,8	5,0 ±0,7	-	24,3 ±5,0	1,6 ±0,1	29,4 ±0,7	39,7 ±2,6	21,9 ± 1,8	2,7 ±0,2	10,9 ± 0,4	49,2 ±0,6	27,4 ± 1,2
1T-PCH	5,9	12,2 ±1,2	1,3 ±0,1	25,8 ±3,7	2,3 ±0,6	22,9 ±2,0	36,5 ±1,0	12,7 ± 1,5	1,6 ±0,2	11,7 ± 0,2	36,3 ± 0,4	31,2 ± 0,4
1T-TSA	4,3	7,2 ±0,7	1,4 ±0,1	37,4 ±5,0	2,1 ±0,1	14,1 ±0,7	37,9 ±2,6	13,5 ± 2,2	1,7 ±0,2	7,9 ± 0,4	40,3 ± 1,4	32,8 ± 0,3
Extracto de CDTA												
2T-CTR	12,1	13,7 ±0,7	4,7 ±0,1	51,4 ±5,0	6,5 ±0,1	6,0 ±0,7	27.9 ±2,6	1,9 ± 0,8	0,1 ±0,0	33,3 ± 3,3	4,3 ± 1,5	3,2 ± 0,1
2T-PCH	13,8	12,3 ±2,4	2,7 ±0,4	43,3 ±6,1	6,4 ±1,9	10,1 ±1,9	25.2 ±2,4	0,7 ± 0,5	0,1 ±0,0	31,9 ± 3,2	5,1 ± 0,7	9,5 ± 0,8
2T-TSA	11,9	22,1 ±2,6	4,5 ±1,1	44,2 ±3,4	6,7 ±1,8	3,4 ±1,8	28.1 ±2,3	2,1 ± 1,0	0,1 ±0,0	38,8 ± 1,7	3,0 ± 0,2	3,4 ± 0,3
Extracto de Na2CO3 0,05 M												
3T-CTR	1,9	14,9 ±0,7	5,3 ±0,1	43,7 ±5,0	7,2 ±0,1	7,9 ±0,7	23,5 ±2,6	18,3 ± 2,5	2,2 ± 0,4	60,8 ± 0,5	-	15,3 ±1,5
3T-PCH	2,8	25,7 ±1,1	4,4 ±0,5	21,9 ±2,1	10,2 ±2,3	7,5 ±2,3	30,3 ±2,5	13,5 ± 1,5	2,1 ±0,3	66,3 ± 1,9	-	20,2 ± 2,0
3T-TSA	2,5	15,5 ±3,2	4,2 ±0,5	29,2 ±1,1	11,3 ±1,8	8,3 ±1,2	18,0 ±3,9	22,4 ± 3,8	5,3 ±1,2	57,1 ± 0,8	-	15,1 ± 1,1

¹Valor promedio ± desviación estándar (n = 3).²Rendimiento calculado respecto a RIA.³CTR: Control, PCH: picados por chinche y TSA: tratados con SA.⁴Gme: Porcentaje de ácidos urónicos como ésteres metílicos.

Tabla 3.2: Caracterización química general de los extractos obtenidos por extracción secuencial de los tegumentos de semillas de soja (*Glycine max*), con KOH 1M, 4M y residuo final¹.

	Rend ²	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Monosacáridos neutros	Ácidos urónicos	Proteínas ⁴
Extracto de KOH 1M											
4T-CTR³	5,8	13,6 ±1,9	2,6 ±0,4	59,1 ±3,4	2,5 ±0,1	4,5 ±0,6	10,9 ±0,7	6,8 ±1,8	22,3 ± 3,0	28,7 ± 3,4	35,2 ± 1,0
4T-PCH	5,4	13,0 ±1,9	3,3 ±0,5	48,6 ±2,8	6,7 ±1,5	4,9 ±0,3	13,9 ±1,2	9,6 ±2,2	18,9 ± 3,1	23,8 ± 1,4	40,5 ± 1,8
4T-TSA	6,1	9,8 ±2,2	1,7 ±0,6	49,4 ±3,0	9,1 ±1,1	3,7 ±0,8	12,6 ±1,8	13,5 ±3,8	31,4 ± 0,5	22,0 ± 0,6	22,9 ± 0,7
Extracto de KOH 4M											
5T-CTR	2,9	5,3 ±0,8	1,6 ±0,5	10,6 ±1,5	24,8 ±3,2	38,8 ±0,2	15,3 ±3,2	5,4 ±2,7	64,5 ± 1,8	16,5 ±2,4	8,6 ± 0,4
5T-PCH	2,5	4,3 ±0,9	2,0 ±0,6	10,4 ±2,2	46,6 ±3,0	20,0 ±1,0	10,4 ±0,8	8,9 ±0,7	56,0 ± 2,0	18,9 ± 0,5	14,1 ± 0,5
5T-TSA	5,0	4,3 ±1,1	1,4 ±0,3	14,0 ±2,7	37,7 ±2,0	27,5 ±2,0	9,8 ±1,0	5,6 ±2,0	63,2 ± 2,0	15,8 ± 1,9	11,7 ± 0,9
Residuo final											
6T-CTR	40,7	0,6 ±0,2	0,4 ±0,3	1,5 ±0,3	7,7 ±2,6	5,9 ±1,5	0,9 ±0,3	83,5 ±3,6	67,0 ±1,0	12,6 ± 0,8	11,4
6T-PCH	28,6	0,5 ±0,2	0,3 ±0,1	1,9 ±0,2	5,6 ±0,8	4,4 ±0,8	0,8 ±0,1	86,9 ±1,3	60,2 ± 0,9	11,7 ± 1,3	17,6
6T-TSA	42,8	0,4 ±0,1	-	1,6 ±0,3	5,0 ±1,4	4,0 ±0,7	0,4 ±0,2	88,8 ±2,2	60,5 ± 3,8	9,3 ± 0,5	18,4

¹Valor promedio ± desviación estándar (n = 3).² Rendimiento calculado respecto a RIA.³ CTR: Control, PCH: picados con chinche y TSA: tratadas con SA.⁴ Valores de proteínas por método de Lowry; para los residuos 6T, se obtuvieron por análisis elemental del contenido de nitrógeno (x 6,25).

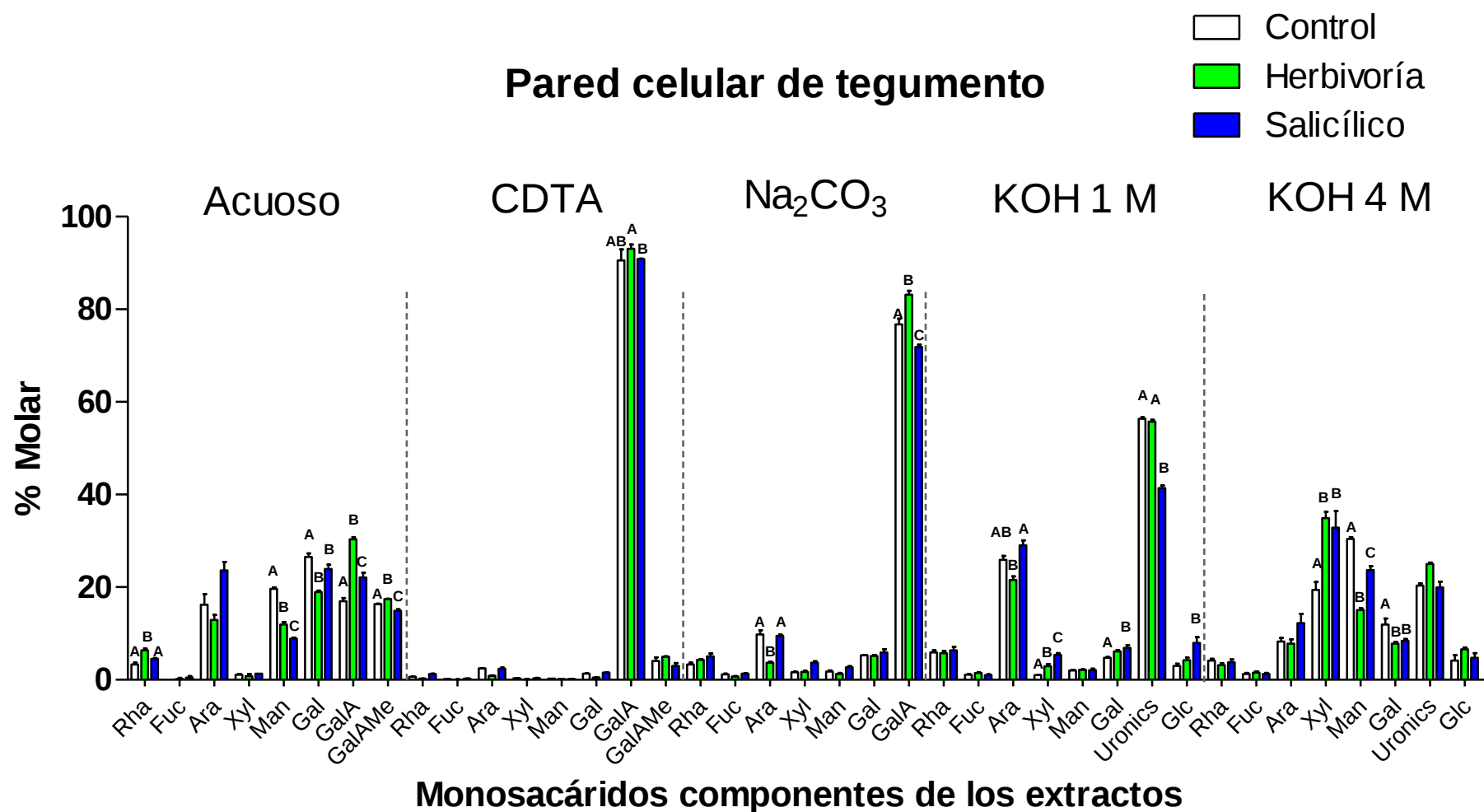


Figura 3.3: Distribución de los monosacáridos constituyentes de las fracciones con mayores rendimientos obtenidas por extracción secuencial de tegumentos de soja. Valor promedio $\pm$ desviación estándar ($n = 3$). Las medidas con una letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$).

En las Tablas 3.1 y 3.2 se obtuvieron los rendimientos de extracción, calculados respecto a RIA, no se observan variaciones importantes entre los tratamientos y el control. El extracto con mayor rendimiento corresponde a 2T con 11,9 – 13,8%, mientras que el rendimiento los residuos finales (6T) fue mayor que 40% respecto al RIA, con excepción de 6T-PCH, que fue 31% menor que 6T-CTR. En la Figura 3.4 se muestra el rendimiento total de cada fracción. El rendimiento total de polisacáridos de pared de tegumento de soja fue de 53 – 54% de RIA para CTR y TSA, respectivamente, y 40% para PCH.

Polisacáridos totales de pared celular de tegumento

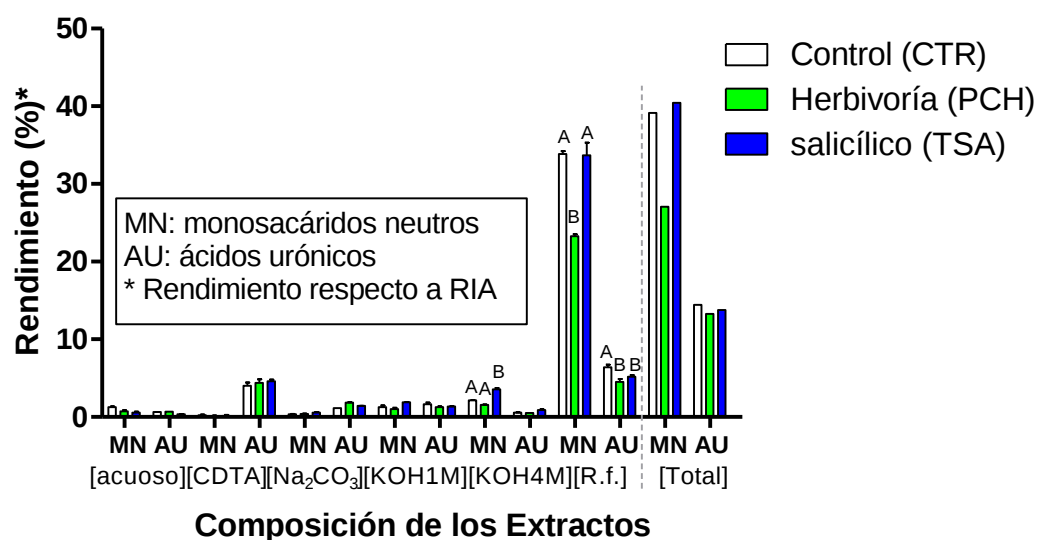


Figura 3.4: Distribución del contenido de hidratos de carbono neutros y ácidos urónicos a través de la extracción secuencial de tegumentos de soja. Las medidas con una letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$).

Los porcentajes de monosacáridos neutros de los tegumentos de PCH son siempre menores que en CTR, principalmente en el residuo final. Este efecto no se observó en tegumentos de TSA. En cambio, el contenido de ácidos urónicos no varía tan notablemente en ningún caso. Los resultados muestran que por efecto de la picadura de chinche hay un descenso del contenido de pared celular en los tegumentos, como producto de la disminución en polisacáridos neutros, principalmente, celulosa. Este efecto no se observó en los tegumentos de TSA, por lo que se podría especular que la hormona ácido salicílico no está

involucrada en este efecto. Esta diferencia hace que el rendimiento total de la extracción secuencial sea inferior para PCH que para el CTR y TSA, tal como se observa en la Figura 3.4.

Otro análisis realizado sobre los extractos de tegumento es la determinación del contenido hidroxiprolina (Hyp) en las proteínas de las fracciones aisladas, que no mostró diferencias significativas. Por otra parte, en el contenido de lignina hubo un aumento en ambos tratamientos, de 51% para TSA y 68% para PCH, respecto al control (Tabla 3.3). Estos resultados sugieren que el aumento de lignina podría tener alguna relación con la hormona ácido salicílico.

Tabla 3.3: Contenido (% en peso) de hidroxiprolina de los extractos de tegumentos de semillas de *Glicine max.* control (CTR), picadas por chinche (PCH) y muestras pulverizadas con ácido salicílico (TSA).

Muestras		Hidroxiprolina ¹ %	Lignina ^{1,2} %
CTR	1T	4.2 ± 0.6	4,7 ± 0,1
	6T	2.1 ± 0.1	
PCH	1T	3.9 ± 0.4	7,9 ± 0,2
	6T	2.2 ± 0.3	
TSA	1T	3.9 ± 0.4	7,1 ± 0,1
	6T	2.3 ± 0.4	

¹Valor medio ± desviación estándar (n = 3). ²Determinaciones realizadas sobre RIA.

Volviendo a los extractos obtenidos, se decidió realizar un estudio más detallado, utilizando para ello diferentes estrategias. Para aquellos provenientes de la extracción acuosa (1T), se encontraron diferencias significativas en el contenido de manosa, disminuyendo en 1T-PCH y, aún más en 1T-TSA, respecto a 1T-CTR. Al tratarse de una mezcla con varios tipos de polisacáridos diferentes, se ensayó un método para la separación de galactomananos y

pectinas. Se realizó con cada una de las muestras 1T, una cromatografía preparativa de intercambio aniónico, con el fin de separar los polisacáridos neutros, de aquellos ácidos. Este método de separación y purificación de los extractos también se aplicó en la purificación de los extractos obtenidos con solución de carbonato de sodio, los cuales contienen pequeñas cantidades de monosacáridos neutros que podrían separarse de forma efectiva del resto de la muestra, por alto contenido de ácido galacturónico (Figura 3.3). En la Figura 3.5 se indica el procedimiento fraccionamiento realizado. También, se profundizó el estudio estructural en los extractos 5T aumentando su solubilidad por medio una hidrólisis suave de los polisacáridos y estudio de las muestras parcialmente degradadas.

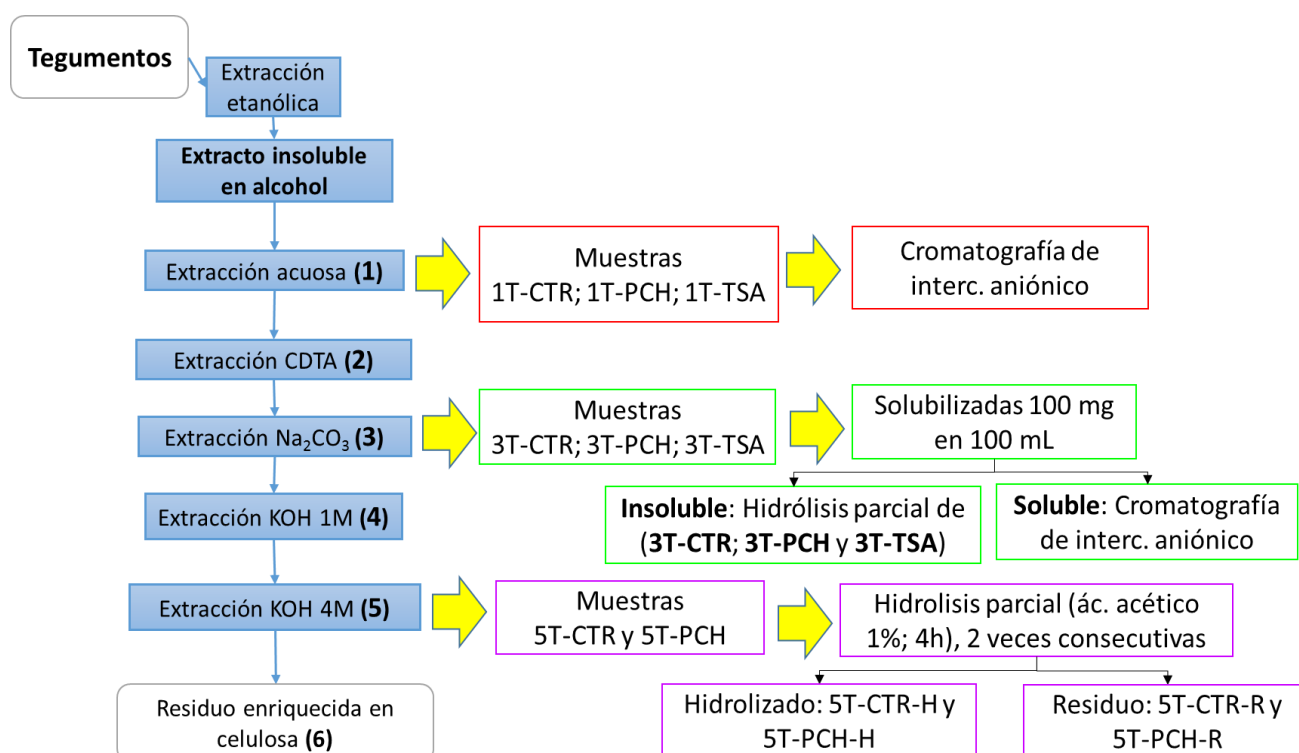


Figura 3.5: Estrategias utilizadas para lograr la caracterización detallada de las fracciones 1T, 3T y 5T.

La cromatografía de intercambio aniónico de los extractos 1T se llevó a cabo, eluyendo con agua y con incrementos consecutivos de la fuerza iónica con

soluciones de concentraciones crecientes de NaCl. Se obtuvo el perfil de elución de la Figura 3.6.

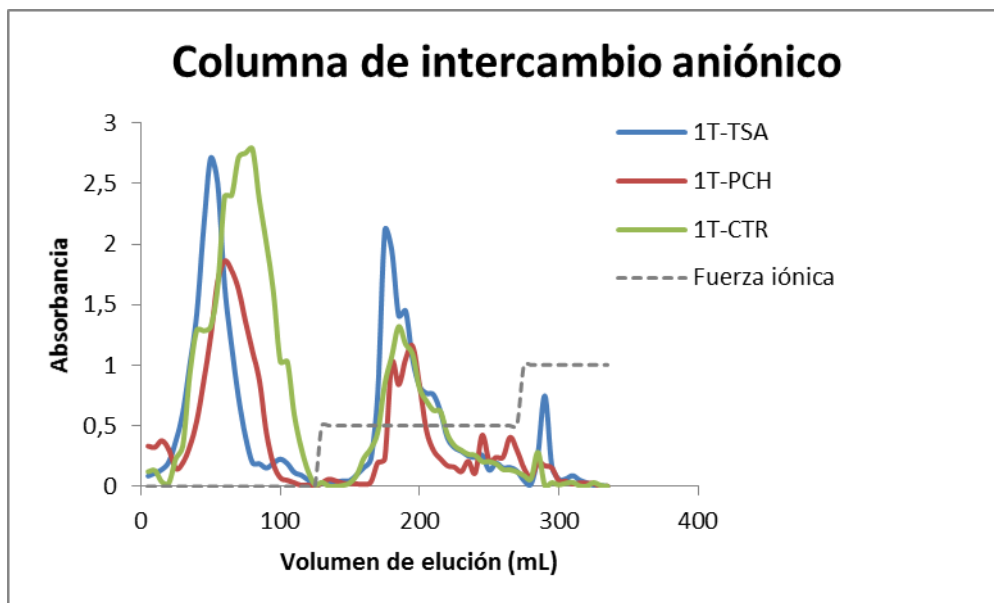


Figura 3.6: Perfil de elución de los extractos acuosos 1T, sometidos a una cromatografía en DEAE-Sephadex A-25.

Las fracciones de 1T obtenidas eluyeron con agua, 0,5 M y 1 M de NaCl, obteniendo las fracciones F1, F2 y F3, respectivamente; su caracterización se muestra en la Tabla 3.4. El material que se logró solubilizar se sembró en la columna cromatográfica y constó de 78%, 84% y 74% de la masa total de 1T-CTR, 1T-PCH y 1T-TSA, respectivamente.

Tabla 3.4: Rendimiento y análisis de las fracciones obtenidas de la columna de intercambio aniónico (1.5 cm x 30cm) para los extractos acuosos de tegumentos de soja.

Muestra	Fraccion ¹	Rend. ² (%)	Monosacáridos neutros	Ácidos urónicos	% molar						
					Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
1T-CTR	H ₂ O	26,1	77,2 ±1,2	6,4 ± 1,5	-	-	3,5	-	59,6	33,1	3,8
	0,5 M	42,7	14,6 ±1,2	44,0 ± 2,3	5,4	-	23,2	1,8	17,8	42,3	9,5
	1 M	31,2	18,6 ±1,0	4,1 ± 0,2	3,8	-	11,9	59	8,5	28,6	41,7
1T-PCH	H ₂ O	14,8	63,7 ±3,3	1,6 ± 0,5	0,9	1,7	35,2	2,2	31,9	19,0	9,0
	0,5 M	66,9	27,9 ±2,6	32,0 ± 2,6	23,2	1,3	24,0	1,8	9,4	32,2	8,0
	1 M	18,3	14,1 ±1,6	7,0 ± 0,5	9,9	-	17,2	8,1	15,2	34,1	15,4
1T-TSA	H ₂ O	29,2	42,0 ±3,3	6,1 ± 1,3	6,8	-	22,0	3,2	23,2	20,5	24,3
	0,5 M	52,1	27,1 ±2,2	23,0 ± 1,4	17,1	3,5	14,3	6,5	19,1	17,0	22,6
	1 M	18,7	34,4 ±1,7	13,4 ± 1,4	19,0	4,0	6,6	4,9	19,6	17,7	28,2

¹ Eluida con concentraciones crecientes de NaCl.² Calculado con respecto al total de masa sembrada en la columna.

La fracción de 1T-CTR eluida con agua (1T-CTR-F1) está compuesta principalmente por Man y Gal, a diferencia de 1T-PCH-F1 y 1T-TSA-F1, que además del galactomanano, contienen otros polisacáridos.

Por otro lado, se ha reportado que existen en semillas de leguminosas mananos con posiciones acetiladas en algunas unidades de la cadena principal [5], y también presencia de grupos acetilo formando ésteres con algunos de los hidroxilos en unidades de GalA de cadenas de RGI [6]. Con el objetivo de detectar si existían diferencias entre tratamientos en el contenido de acetilo sobre la estructura de los polisacáridos presentes en las muestras F1, se calculó la relación molar entre grupos acetilo y las unidades de hidratos de carbono en las fracciones. En la Tabla 3.5 se muestran los moles de acetilo por cada mol de azúcar en las fracciones. El resultado muestra variaciones en el contenido molar de grupos acetilo, entre las muestras medidas.

Tabla 3.5: Relación molar de grupos acetilo a hidratos de carbono de tegumentos de soja, control (CTR), picada por chinche (PCH) y muestras de plantas pulverizadas con ácido salicílico (TSA).

Muestra ¹	Acetilo:unidades de monosacáridos	
	Relación molar	
1T – CTR - F1	1 ($\pm$ 0,05)	4,3
1T – PCH - F1	1 ($\pm$ 0,07)	2,6
1T – TSA –F1	1 ($\pm$ 0,03)	1,5

¹Valor promedio $\pm$ desviación estándar (n = 3).

Las fracciones obtenidas con NaCl 0,5 M (F2) están constituidas por un alto porcentaje de ácidos urónicos y predominio de Ara, Gal y Rha entre los azúcares neutros, indicando la presencia de cantidades importantes de pectinas. Además, en ambos tratamientos y CTR se observaron cantidades apreciables de Man.

Las fracciones eluidas con NaCl 1 M (F3) dieron bajos rendimientos y bajo porcentaje de hidratos de carbono, observándose una mezcla de monosacáridos con predominio de glucosa.

Las estructuras de los polisacáridos presentes en F1 y F2 se estudiaron por espectroscopía de RMN. Para 1T-CTR-F1, el espectro de RMN HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (Figura 3.7) muestra las señales características de un galactomanano en la zona anomérica a 101,1/4,68 $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ y el resto de señales asignadas a la cadena principal de manano $\beta(1\rightarrow4)$ [7]. Para las muestras 1T- PCH y 1T-TSA, el resultado es similar. En la Figura 3.8 se pueden ver la zona anomérica los espectros de F1 y F2 de ambos tratamientos y del control. Estos espectros también indicaron la presencia de galactomananos en F1 de ambos tratamientos, pero, además, se observaron cadenas de $(1\rightarrow5)\text{-}\alpha\text{-L-arabinanos}$. Los espectros en F2 revelaron mezclas de galactomananos y RGI, en diferentes proporciones, mostrando la presencia de cadenas de $(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha}$, y de $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GalA}$. La asignación completa de de los espectros de RMN de las estructuras encontradas se indica en la Tabla 3.6.

En las fracciones F1 y F2 para 1T-CTR, el resultado de la asignación confirmó la presencia de un galactomanano con una relación molar Man:Gal de 1.8:1.0 para F1, sin la presencia de otras señales en la zona anomérica (Figura 3.7). También, se confirmó una mezcla de galactomananos con RGI en F2. El resultado corresponde a de unidades β -D-Manp unida por 4 y ramificada en 6, y unidades de α -D-Galp terminal. Para F2 se observa la presencia de la cadena principal de $\rightarrow 4$)- α -D-GalpA-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Rhap-(1 $\rightarrow$ con ramificaciones de arabinanos, (1 $\rightarrow$ 5)- α -L-Araf, y galactanos (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Galp. Sin embargo, la mayoría de las unidades de ácido galacturónico en F2 se encuentra formando parte del dominio de homogalacturonano, (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-GalpA. La asignación de los espectros se realizó en base a los desplazamientos químicos de este tipo de estructuras estudiadas en nuestro grupo de investigación y los reportados para estas cadenas glicosídicas por otros autores [8]–[10]. Se tuvieron en cuenta, además, los datos obtenidos para cada fracción y el análisis detallado de las señales encontradas.

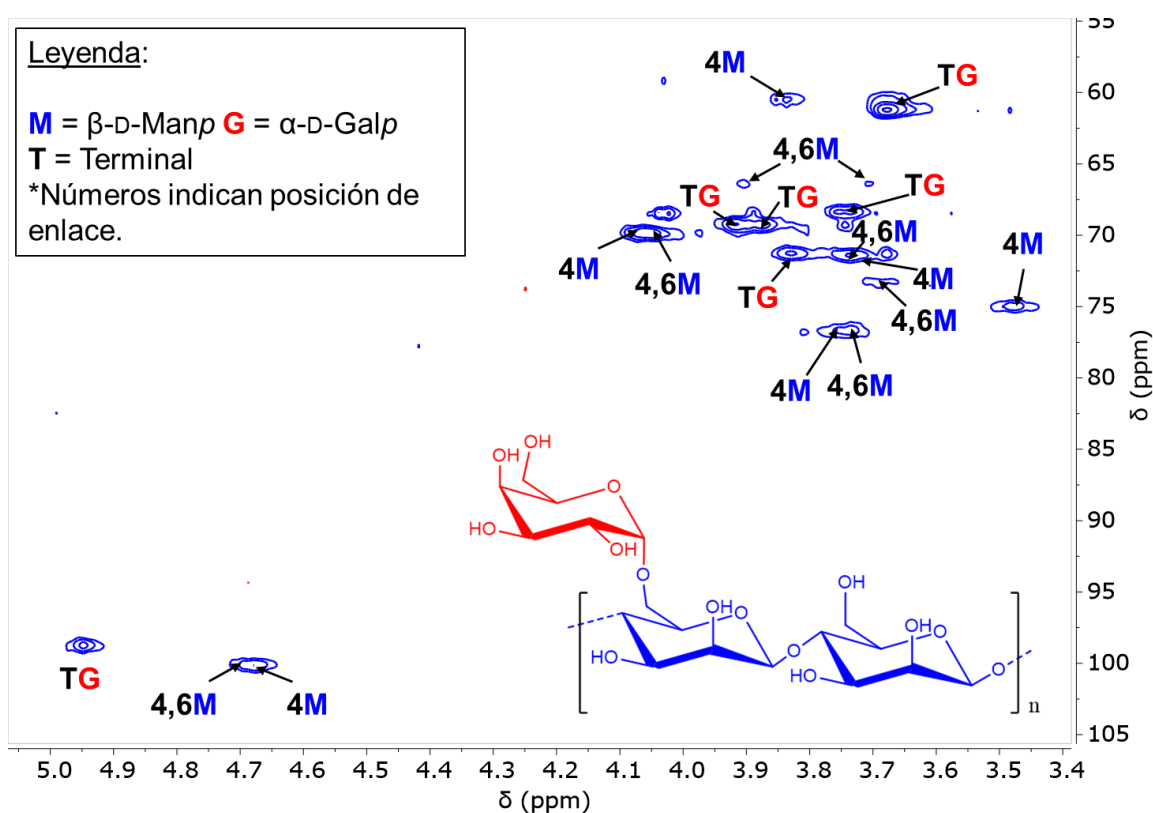


Figura 3.7: Espectro de RMN HSQC la fracción F1 y la estructura principal, correspondiente a un galactomanano.

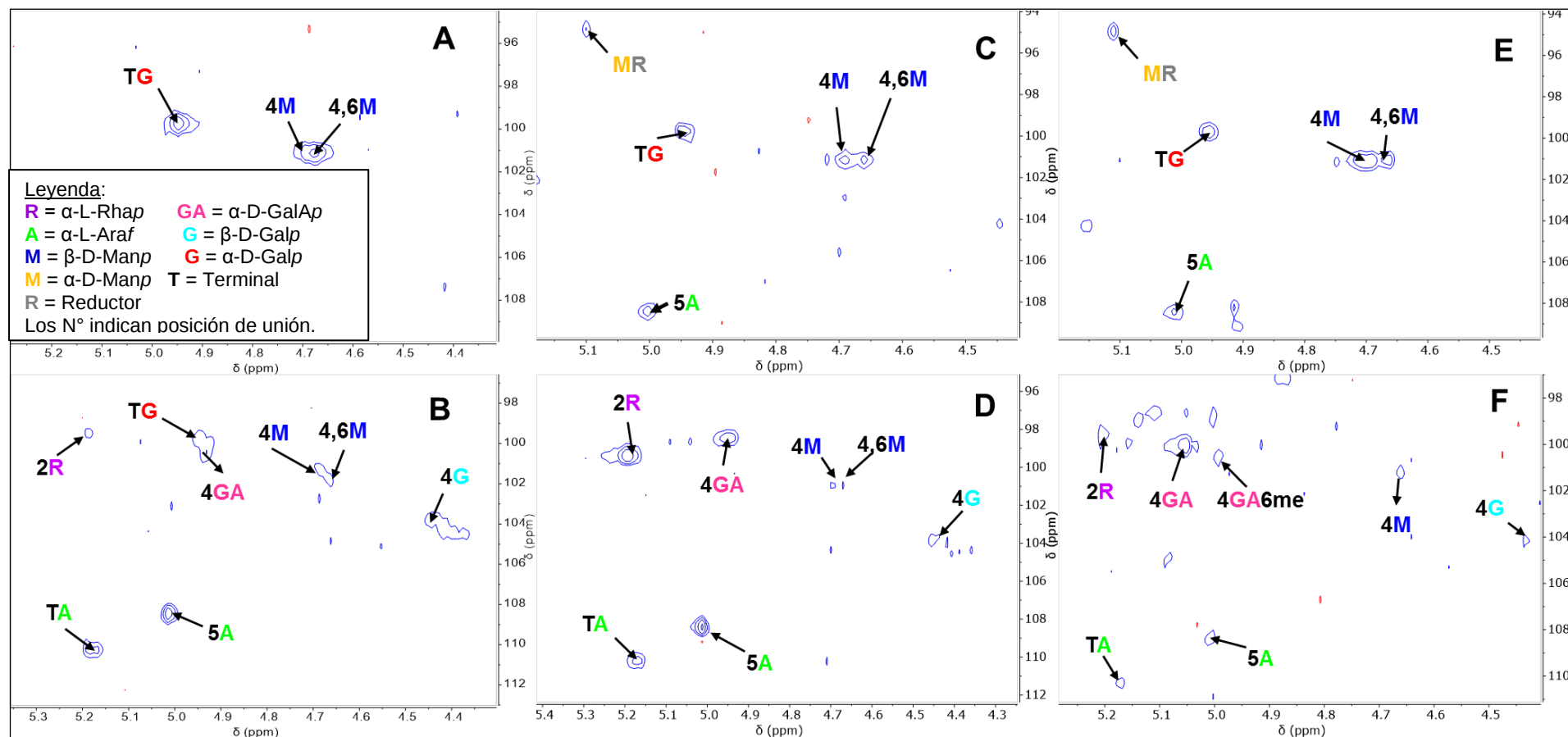


Figura 3.8: Región anomérica de los espectros de RMN HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ para extractos 1T, indicando las principales asignaciones realizadas en, **A:** 1T-CTR-F1; **B:** 1T-CTR-F2; **C:** 1T-PCH-F1; **D:** 1T-PCH-F2; **E:** 1T-TSA-F1; **F:** 1T-TSA-F2.

Tabla 3.6: Asignación de señales (ppm) para las fracciones F1 y F2 obtenidas de 1T-CTR de los espectros de RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC.

Unidad estructural ¹	Desplazamiento químico, ppm ^{2,3}					
	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5,5'	C-6/H-6,6'
1T-CTR-F1						
→4)-β-D-Manp-(1→	101,1/4,68	70,9/4,06	72,4/3,74 ^a	77,7/3,74	76,0/3,48	61,5/3,84
→4,6)-β-D-Manp-(1→			72,4/3,68 ^a	77,8/3,81	74,4/3,68	67,4/3,71;3,91
α-D-Galp-(1→	99,7/4,95	69,4/3,74	70,2/3,88 ^b	70,2/3,92 ^b	72,3/3,83 ^a	62,2/3,68
1T-CTR-F2³						
→2)-α-D-Rhap-(1→	99,5/5,20	77,6/4,07	-	73,0/3,36	71,1/3,71	17,5/1,19
→4)-α-D-GalpA-(1→2	99,8/4,95	-	-	80,7/4,30	72,7/4,69	-
→4)-α-D-GalpA-(1→	100,4/4,94	-	69,6/3,89	78,3/4,36	72,8/4,69	-
→5)-α-L-Araf-(1→	108,5/5,01	81,8/4,05	77,7/3,93	83,3/4,14	67,8/3,71-3,73	
α-L-Araf-(1→	110,3/5,18	83,2/4,18	-	84,9/4,05	62,2/3,77-3,74	
→4)-β-D-Manp-(1→	101,3/4,69	70,9/4,05	72,4/3,75	77,6/3,74	75,9 /3,49	61,8/3,85
→4,6)-β-D-Manp-(1→	101,7/4,67	-	72,2/3,84	-	74,5/3,84	67,8/3,80-3,83
→4)-β-D-Galp-(1→	104,5/4,37	-	-	77,5/3,87	76,9/3,68	61,8/3,79
→6)-β-D-Galp-(1→	104,4/4,40	71,7/3,45	73,6/3,63	69,5/4,01 ^e	74,4/3,87	70,2/3,92
→3,6)-β-D-Galp-(1→	104,3/4,42	70,9/3,56 ^c	84,4/3,86 ^d	69,2/4,08 ^e	74,5/3,84	70,0/3,95
→3)-β-D-Galp-(1→	103,8/4,44	70,9/3,59 ^c	84,3/3,88 ^d	69,4/4,03 ^e	76,0/3,62	62,1/3,68

¹Con referencia de estándar interno de acetona a 31,2/2,15 ppm.²Letras indican asignaciones de señales que podrían estar intercambiadas [11].

Se continuó la elucidación estructural sobre los extractos obtenidos con Na₂CO₃ 0,05 M (3T), según el procedimiento descrito en la Figura 3.5. Estos extractos resultaron ser parcialmente solubles en agua. Se preparó una suspensión de 1mg/1mL, obteniendo en cada caso un precipitado que representaba el 59%, 64% y 66% de la muestra para 3T-PCH, 3T-CTR y 3T-TSA, respectivamente, mientras que la porción soluble de los extractos 3T-PCH-

S, 3T-CTR-S y 3T-TSA-S, correspondieron a 36%, 34% y 29% del extracto de partida, respectivamente.

Una vez solubilizada cada muestra, se fraccionó por medio de una columna de intercambio aniónico en DEAE-Sephadex A-25, se eluyó con agua y soluciones de NaCl de concentraciones crecientes. En la Figura 3.9 se muestra el perfil de elución, donde se observan tres fracciones. En todos los casos, la mayoritaria corresponde a F2.

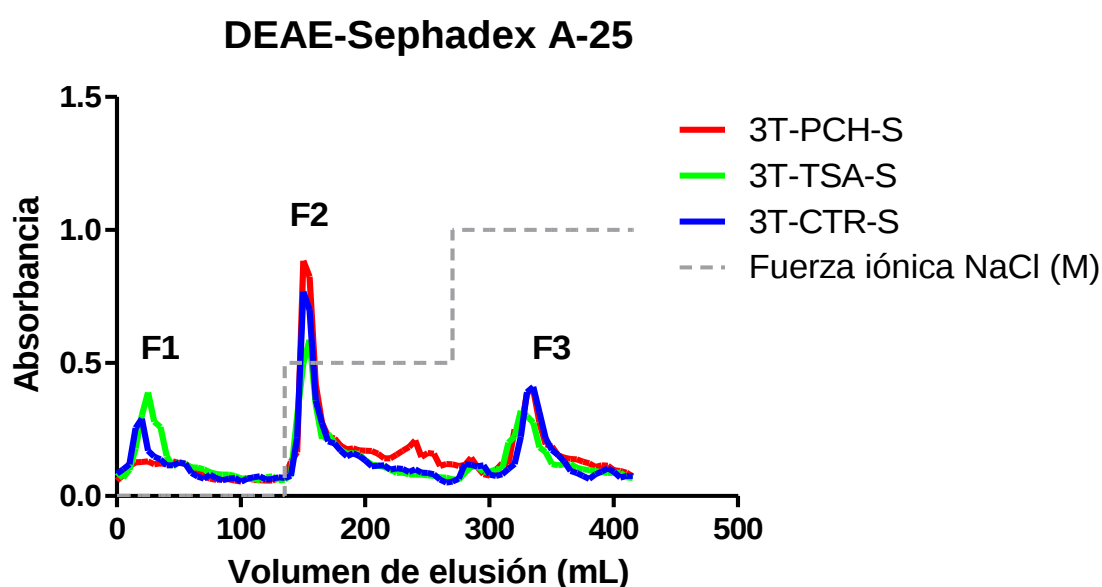


Figura 3.9: Perfil de elución de la columna de DEAE-Sephadex A-25 para los componentes solubles en agua de los extractos obtenidos con Na_2CO_3 0,05 M (3T).

Se midió el contenido de hidratos de carbono neutros y ácidos urónicos de las fracciones (Tabla 3.7). La fracción F2, eluida con NaCl 0,05 M, no solo tiene los mayores rendimientos, sino que, además, corresponde a la de mayor contenido de hidratos de carbono, para ambos tratamientos y el control.

Los monosacáridos componentes de cada muestra se informan en la Figura 3.10, en la que se manifiestan algunas diferencias notorias, en 3T-TSA-S-F2 se ve una disminución en Rha y Gal con respecto a CTR y PCH. El contenido de Xyl y Glc en 3T-PCH-S-F2 es inferior respecto al registrado en 3T-CTR-F2. Por

otro lado, el contenido de Man en 3T-PCH-S-F2 es casi 50% menor que el de 3T-CTR-S-F2 y aún menor con respecto al 3T-TSA-S-F2.

Tabla 3.7: Caracterización química de las fracciones obtenidas por fraccionamiento por cromatografía de intercambio aniónico de extractos solubles (S) de 3T.

Muestra	Fraccion	Rend. (%)	% Molar	
			Monosacáridos neutros	Ácidos urónicos
3T-CTR-S	F1	5	9.0 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,1
	F2	13	43,0 $\pm$ 4,5	9,4 $\pm$ 1,6
	F3	6	19,6 $\pm$ 1,7	7,9 $\pm$ 0,2
3T-PCH-S	F1	6	10,2 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,1
	F2	17	23,5 $\pm$ 2,4	9,5 $\pm$ 0,8
	F3	7	20,8 $\pm$ 0,2	1.8 $\pm$ 0,2
3T-TSA-S	F1	4	13,3 $\pm$ 0,8	0,1 $\pm$ 0,0
	F2	11	17,0 $\pm$ 1,1	6,5 $\pm$ 0,7
	F3	4	6,1 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,1

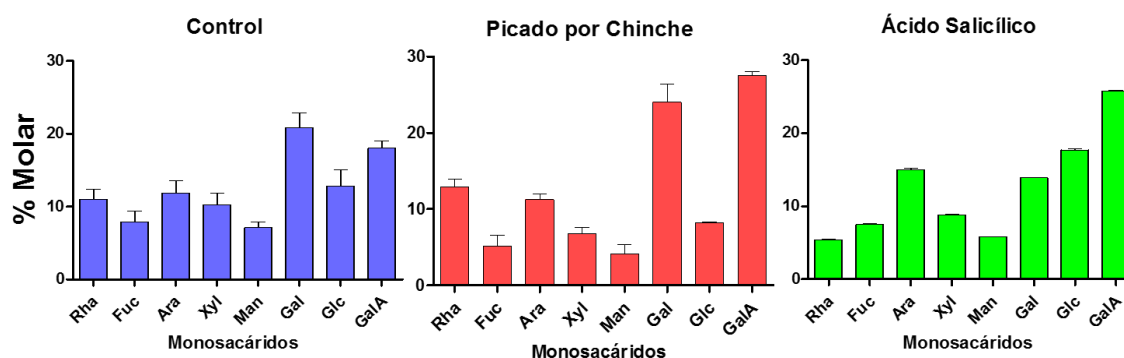


Figura 3.10: Composición en monosacáridos de F2 (enriquecidas en pectinas) de las muestras 3T solubles

La presencia de cadenas de pectinas en la fracción soluble se confirmó por análisis de los espectros de RMN HSQC, en los que se pudo observar la existencia de unidades estructurales como $\rightarrow 2)$ - α -D-Rhap(1 $\rightarrow$, $\rightarrow 5)$ - α -L-Araf(1 $\rightarrow$ y $\rightarrow 4)$ β -D-Galp(1 $\rightarrow$, parte de los RGI (Figura 3.11). Además, se registraron señales de α -D-GalpA y α -D-GalpA-6Me, este último mostró el pico característico de $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ del éster metílico a 53,8/3,80 ppm [12].

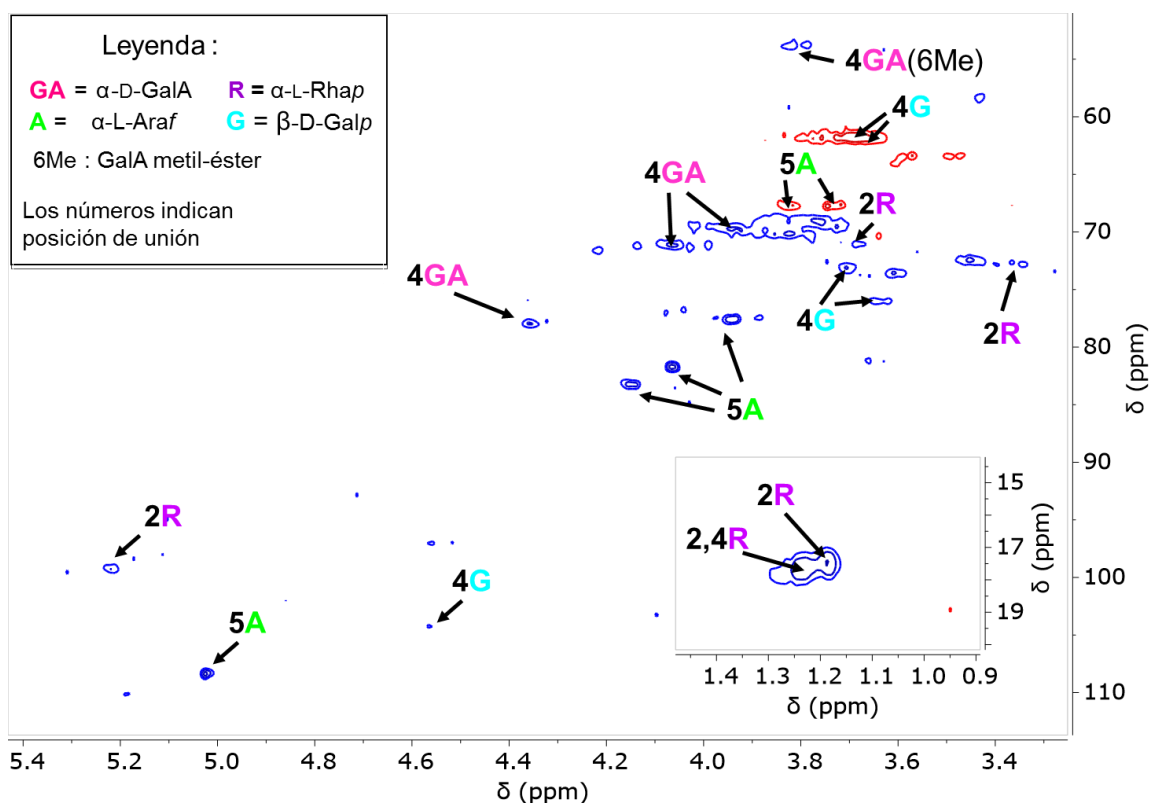


Figura 3.11: Espectro RMN HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de la fracción obtenida de la columna de intercambio aniónico, 3T-CTR-S-F2.

A continuación, se realizó la determinación estructural de la parte insoluble de 3T. Para lograrlo, las fracciones se hidrolizaron parcialmente para solubilizarlas y poder realizar los correspondientes espectros de RMN. Las muestras 3T-CTR-H, 3T-PCH-H y 3T-TSA-H en todos los casos, estaban constituidas mayormente por ácido galacturónico (Tabla 3.8, 74-92% del total de hidratos de carbono).

El producto hidrolizado, soluble en agua, se estudió por RMN HSQC; las Figuras 3.12 A, B y C, muestran los espectros de 3T-CTR-H, 3T-PCH-H y 3T-TSA-H, respectivamente.

Tabla 3.8: Caracterización química de las fracciones insolubles de los extractos obtenidos con Na₂CO₃ 0,05 M parcialmente hidrolizados (H).

Muestra	Rend. (%) ¹	Ácidos urónicos	Azúcares neutros	Monosacáridos totales (moles %)							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA
3T-CTR-H	63,7	27,5 ±1,1	4,2 ±0,9	0,9	0,4	3,7	1,4	0,9	2,3	3,5	86,9
3T-PCH-H	66,1	35,2 ±2,7	3,2 ±0,7	0,8	0,3	1,6	0,8	0,4	1,7	2,7	91,7
3T-TSA-H	59,2	16,6 ±1,4	5,9 ±0,8	1,4	0,7	3,4	2,7	1,3	2,7	14,3	73,7

¹Rendimiento calculado por 100 mg iniciales de 3T-F2-insoluble.

En todas las fracciones parcialmente hidrolizadas se encontró un homogalacturonano como estructura casi única presente en las fracciones insolubles, a excepción de 3T-CTR-H, en la que se lograron identificar señales para un (1→5)-α-L-arabinano. Se determinaron las señales del homogalacturonano presente en todas las muestras (Tabla 3.9), con ayuda de los datos de la bibliografía [12][13].

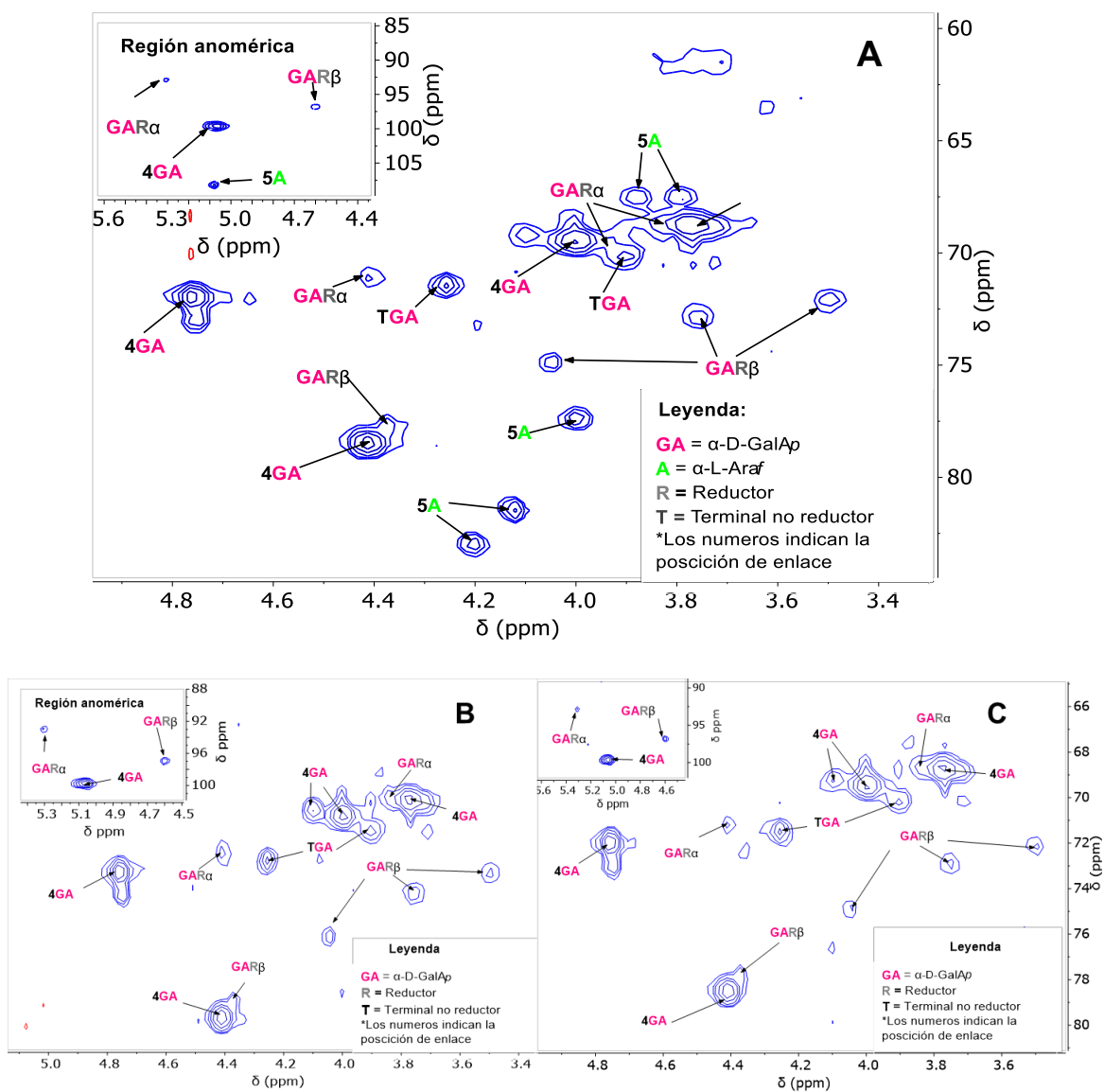


Figura 3.12: Espectros RMN HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ del residuo insoluble parcialmente hidrolizado del extracto obtenido con Na_2CO_3 0,05 M. A: 3T-CTR-H, B: 3T-PCH-H y C: 3T-TSA-H.

Tabla 3.9: Asignación de señales (ppm) de $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ del espectro de RMN de; A: 3T-CTR-H, B: 3T-PCH-H y C: 3T-TSA-H.

Unidad estructural ¹	Desplazamiento químico, ppm					
A	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5,5'	C-6/H-6
→4)-α-D-GalpA-(1→	99,6/5,06	68,8/3,77	69,5/4,00	78,5/4,41	72,0/4,76	176,0
→4)-α-D-GalAp red.	92,8/5,31	68,7/3,83	-	-	71,1/4,41	176,2
→4)-β-D-GalAp red.	96,7/4,60	72,1/3,50	72,8/3,75	77,8/4,38	75,0/4,05	-
α-D-GalpA-(1→	-	-	70,2/3,90	71,5/4,26	-	-
→5)-α-L-Araf-(1→	108,1/5,06	81,5/4,12	77,4/4,00	83,0/4,20	67,5/3,88;3,80	

Unidad estructural ¹	Desplazamiento químico, ppm					
B	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5	C-6/H-6
→4)-α-D-GalpA-(1→	99,6/5,06	68,8/3,77	69,5/4,00	78,5/4,41	72,0/4,76	176,1
→4)-α-D-GalAp red.	92,8/5,31	68,7/3,83	-	-	71,1/4,41	176,1
→4)-β-D-GalAp red.	96,9/4,60	72,1/3,50	73,0/3,76	77,9/4,37	75,0/4,04	-
α-D-GalpA-(1→	-	-	70,3/3,90	71,6/4,26	-	-

Unidad estructural ¹	Desplazamiento químico, ppm					
C	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5	C-6/H-6
→4)-α-D-GalpA-(1→	99,6/5,06	68,8/3,77	69,5/4,00	78,5/4,41	72,0/4,76	176,1
→4)-α-D-GalAp red.	92,8/5,31	68,7/3,84	-	-	71,2/4,41	176,1
→4)-β-D-GalAp red.	96,8/4,60	72,1/3,50	72,9/3,75	77,8/4,37	74,9/4,05	-
α-D-GalpA-(1→	-	-	70,2/3,90	71,5/4,26	-	-

¹Estándar interno de CH₃ de acetona a 31.2/2.16 ppm. Referencias para asignación de todos los productos de hidrólisis de 3T: [12][13].

La caracterización de tegumentos continuó con los extractos obtenidos en medio alcalino fuerte, con KOH 1 y 4 M. Para las fracciones 4T, se observa en la Figura 3.3 un alto contenido de ácidos urónicos, del 56% del total de hidratos de carbono de la muestra para 4T-CTR y 4T-PCH, mientras que para 4T-TSA disminuye a 41%. La arabinosa es el segundo componente mayoritario, con un contenido que va de 22% para PCH, 26 y 29% para CTR y TSA, respectivamente. Por otra parte, el contenido de ramnosa no dio diferencias significativas entre los tratamientos y control, siendo de alrededor de 6%.

Los extractos 5T, extraídos con KOH 4 M, resultaron ser muy diferentes a los 4T, con predominio de Xyl, ácidos urónicos y Man. Estos extractos fueron poco solubles en agua, por lo cual, se llevó a cabo una hidrólisis ácida parcial (H) con el fin de profundizar la caracterización estructural. En la Figura 3.13 (A) se muestra el espectro de RMN de 5T-CTR-H (hidrolizado), en el cual se pueden ver las señales de la región anomérica características de (1→4)-β-D-mananos (101,1/4,69 ppm), también β-D-Manp sustituida en posición 4 y 6 (101,1/4,72 ppm) y unidades de α-D-Galp terminal, además de otras señales de RGI. Asimismo, se calculó la relación molar Gal:Man (B) del galactomanano aislado a través de integración del espectro protónico realizado a 70°C para evitar superposición de señales con la del agua. La relación molar encontrada es de Gal:Man 1:3.

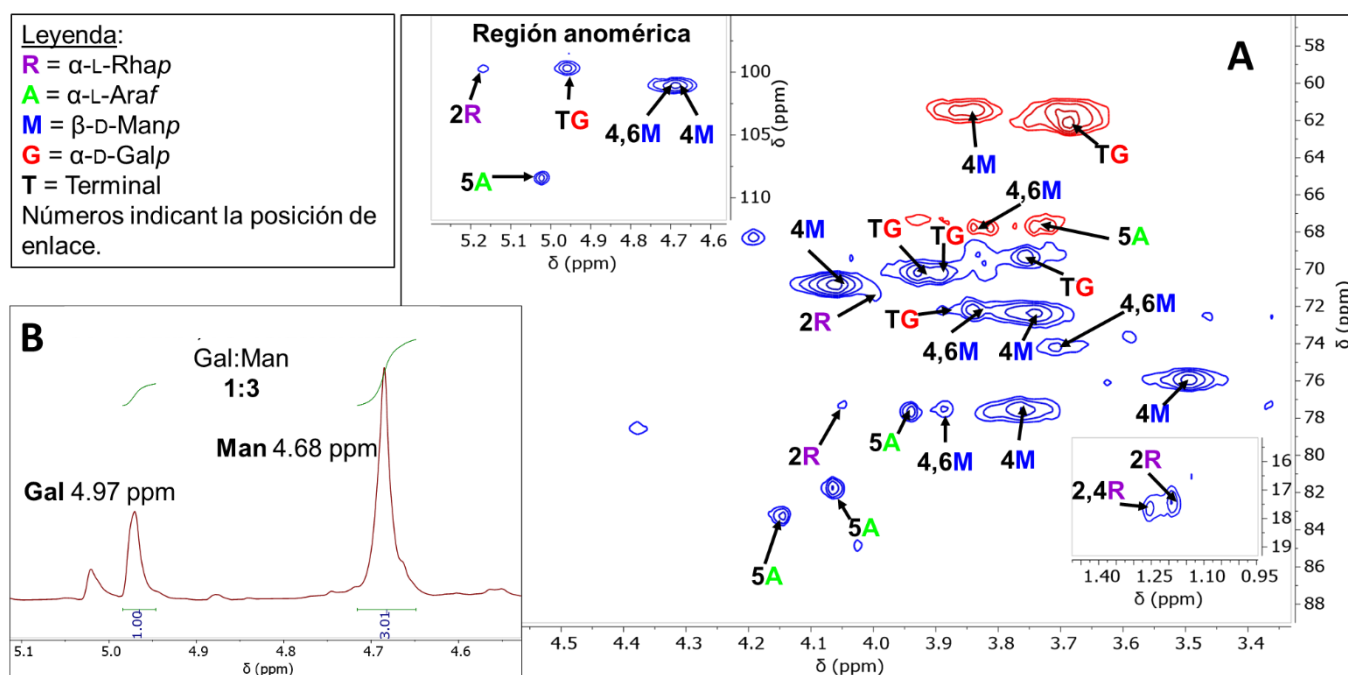


Figura 3.13. A: Espectro de RMN 2D HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de la fracción 5T-CTR-H. B: Relación molar Gal:Man medida en RMN ^1H .

También, se obtuvo el espectro de RMN (Figura 3.14) para la fracción solubilizada del tratamiento inducido por la chinche, 5T-PCH-H. El resultado arrojó que además de GM y cadenas de RGI, se encuentran presentes glucanos y xilanos que lograron ser solubilizados por medio de la hidrólisis parcial en

condiciones suaves. Este comportamiento diferente de solubilidad podría deberse a las diferencias en la estructura de la pared.

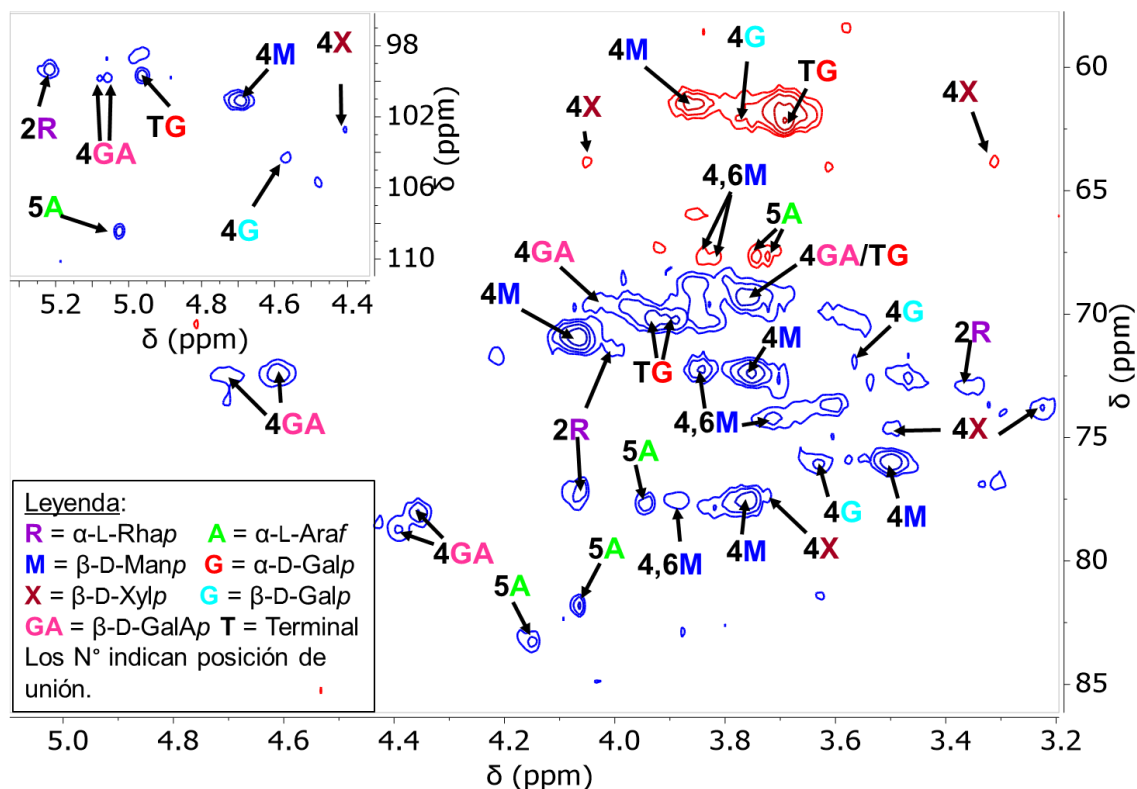


Figura 3.14. Espectro de RMN HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de la fracción solubilizada 5T-PCH-H.

La asignación de las señales para las unidades provenientes del galactomanano y algunos restos de cadenas remanentes de RGI para 5T-CTR-H y 5T-PCH-H se muestran en la Tabla 3.10 y 3.11, respectivamente. Se logró asignar de manera completa el galactomanano de cadena principal de β-D-Manp unida por 4, sustituida en posición 6 por unidades α-D-Galp, además de las unidades de →2)-α-D-Rhap(1→ y →5)-α-L-Araf(1→, ambas pertenecientes a RGI. Asimismo, se lograron asignar las demás estructuras presentes, provenientes de xiloglucanos y glucuronoxilanos, encontradas en 5T-PCH-H.

Tabla 3.10: Asignación de señales (ppm) de la fracción solubilizada 5T-CTR-H obtenidas del espectro de RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC.

Unidad estructural ¹	Desplazamiento químico, ppm ^{a,b}					
	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5,5'	C-6/H-6,6'
Galactomanano						
→4)-β-D-Manp-(1→	101,1/4,69	70,8/4,06	72,4/3,74	77,6/3,76	75,9/3,49	61,4/3,84
→4,6)-β-D-Manp-(1→	101,1/4,72	-	72,2/3,84	77,5/3,89	74,2/3,71	67,8/3,81-3,84
α-D-Galp-(1→	99,7/4,96	69,3/3,76	70,2/3,89	70,2/3,93	72,2/3,89	62,0/3,69
Otras cadenas; RGI						
→2)-α-D-Rhap-(1→	99,7/5,18	77,3/4,05	71,3/3,99	72,6/3,36	-	17,4/1,19
→5)-α-L-Araf-(1→	108,4/5,02	81,8/4,06	77,6/3,94	83,3/4,15	67,8/3,74-3,72	

¹Estándar interno de CH₃ de acetona a 31.2/2.16 ppm. Referencias [15][12].

Tabla 3.11: Asignación de señales (ppm) de la fracción solubilizada 5T-PCH-H obtenidas del espectro de RMN ¹H/¹³C HSQC.

Unidad estructural ¹	Desplazamiento químico, ppm ^{a,b}					
	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5,5'	C-6/H-6,6'
Galactomanano						
→4)-β-D-Manp-(1→	101,1/4,69	70,9/4,07	72,4/3,75	77,5/3,76	75,9/3,50	61,6/3,86
→4,6)-β-D-Manp-(1→	101,1/4,73	-	72,2/3,84	77,5/3,89	74,2/3,71	67,7/3,82-3,84
α-D-Galp-(1→	99,7/4,96	69,3/3,75	70,2/3,88	70,2/3,93	-	62,0/3,69
Otras cadenas; RGI						
→2)-α-D-Rhap-(1→	99,4/5,22	77,2/4,06	71,4/4,00	72,9/3,36	-	17,5/1,19
→4)-β-D-GalAp-(1→	99,8/5,09	69,3/3,77	69,5/4,03	78,0/4,35	72,5/4,71	175,9
→4)-β-D-GalAp-(1→2	99,8/5,05	-	-	78,7/4,39	72,4/4,61	175,8
→5)-α-L-Araf-(1→	108,6/5,02	81,8/4,06	77,7/3,94	83,3/4,15	67,7/3,74-3,72	
→4)-β-D-Galp-(1→	104,3/4,56	72,0/3,57	-	-	76,0/3,63	62,0/3,75;3,77
Xilano						
→4)-β-D-Xylp-(1→	102,8/4,41	73,8/3,22	74,6/3,49	77,3/3,70	63,8/3,31;4,05	

¹Estándar interno de CH₃ de acetona a 31.2/2.16 ppm. Referencias [15][12].

Los residuos 5T fueron hidrolizados y se caracterizó, tanto la fracción hidrolizada, como el residuo insoluble. En la Tabla 3.15 se informa la composición de los hidrolizados solubles y los residuos obtenidos.

Tabla 3.15: Caracterización de las fracciones obtenidas de 5T-CTR y 5T-PCH mediante hidrólisis parcial.

Fracción	Rend. ² (%)	Monosacárido (moles %)							
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	GalA	Glc
5T-CTR ¹	-	4,1	1,3	8,3	19,4	30,4	11,9	20,4	4,2
5T-CTR-H	19	5,6	2,5	9,2	8,1	42,6	15,4	10,9	4,3
5T-CTR-R	43	1,0	0,6	7,5	67,7	10,0	4,0	2,4	8,4
5T-PCH ¹	-	3,2	1,5	7,8	34,5	15,0	7,8	25,1	6,7
5T-PCH-H	16	8,9	3,2	10,0	15,5	22,2	15,6	16,0	8,6
5T-PCH-R	50	1,1	0,7	6,6	72,2	8,1	3,4	1,9	9,4

¹Incluido facilitar el análisis. ²Respecto al total de masa con la que se realizó la hidrólisis.

La hidrólisis parcial dio como resultado la solubilización principalmente de galactomananos, junto con algunas cadenas de RGI para 5T-CTR-H. En el caso de 5T-PCH-H, se logró solubilizar además de GM y RGI, cadenas de xiloglucanos y glucuronoxilanos. Estas cadenas podrían estar mayormente sustituidas haciendo que el polisacárido sea más soluble y disponible para hidrolizarse y/o pesos moleculares inferiores [16], respecto a las cadenas presentes en CTR. Los valores de Glc y Xyl presentes en 5T-PCH son mayores que los de 5T-CTR, lo que indicaría que el contenido de GXs y XGs en 5T-PCH es mayor que en 5T-CTR. Esta diferencia se ve reflejada en el resultado de la hidrólisis ácida parcial, ya que el contenido de Glc y Xyl de 5T-PCH-H es el doble que de 5T-CTR-H, indicando que, al ser más abundantes y el entramado de la pared más laxo, se logra solubilizar más fácilmente y en mayor proporción estas cadenas hemicelulósicas. Los residuos 5T-CTR-R y 5T-PCH-R no varían mayormente en el contenido de monosacáridos constituyentes.

Para las muestras 5T-CTR-H y 5T-PCH-H, se determinó la estructura mediante análisis por metilación, con el fin de profundizar el estudio fino estructural. Los resultados se muestran en la Tabla 3.12. Se puede observar que la hidrólisis parcial logra separar un galactomanano como estructura principal,

además de restos de arabinanos, xilanos y galactanos. Las proporciones varían levemente entre la muestra proveniente de semillas picadas y el control.

Tabla 3.12: Análisis de derivados metilados de los productos parcialmente hidrolizados de los extractos de 5T-CTR-H y 5T-PCH-H.

Monosacárido ¹	Unidad ²	Porcentaje molar	
		5T-CTR-H	5T-PCH-H
2,3-Me Ara	→5)-α-L-Araf-(1→	7,2	7,1
2-Me Ara	→3,5)-α-L-Araf-(1→	1,5	2,8
Ara	nd ³	8,0	5,3
2,3-Me Xyl	→4)-β-D-Xylp-(1→	8,1	1,9
Xyl	nd	9,8	6,7
2,3,6- Me Man	→4)-β-D-Manp-(1→	19,4	11,1
2,6- Me Man	nd	2,1	2,0
2,3-Me Man	→4,6)-β-D-Manp-(1→	16,3	15,5
Man	nd	1,5	2,0
2,3,4,6-Me Gal	α-D-Galp-(1→	11,6	7,6
2,3,6-Me Gal	→4)-β-D-Galp-(1→	0,9	2,9
2,3-Me Gal	→4,6)-β-D-Galp-(1→	4,6	9,6
Gal	nd	2,2	3,2
2,3,6-Me Glc	→4)-β-D-Glcp-(1→	2,7	4,4
Glc	nd	4,1	6,0

¹Monosacáridos parcialmente metilados en las posiciones indicadas. ²La anomeridad y la configuración de las unidades no se deducen del análisis por metilación.

³nd:unidad no definida, podría corresponder a submetilación.

Finalmente, para los residuos 6T se realizó una hidrólisis parcial de los residuos 6T-CTR y 6T-PCH, obteniéndose en cada caso, una fracción soluble en cada caso, denominadas 6T-CTR-H y 6T-PCH-H, respectivamente, las que se estudiaron por RMN. Los espectros de ambas fracciones solubles de 6T se muestran en la Figura 3.16. Las señales encontradas en estos espectros fueron asignadas a acoplamientos de un homogalacturonano; →4)-α-D-GalpA-(1→, con algunas señales de extremos terminales. No se observaron señales de GlcA.

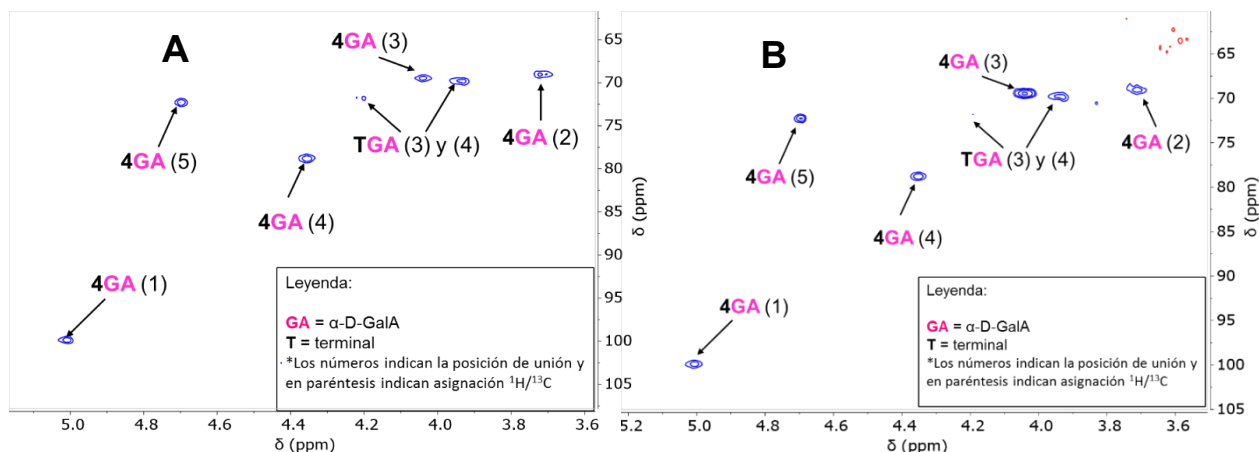


Figura 3.16: Espectro de RMN HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de A: 6T-CTR-H y B: 6T-PCH-H.

3.5 Discusión de resultados

3.5.1 Caracterización química general

Los tegumentos de soja tuvieron buenos rendimientos en polisacáridos de pared celular, más de 50% del total de RIA. Los tegumentos son considerados tejido fibroso, ya que posee alto contenido de polisacáridos muy poco solubles, además de un porcentaje muy alto (en masa) de residuo final obtenido por la extracción secuencial [14][15].

En la Figura 3.4 se puede observar el rendimiento de cada extracto, que denota la importante cantidad de celulosa presente en el residuo final insoluble (6T). Incluso trabajando con la semilla completa se ha observado esta característica [19]. Respecto a la comparación entre tratamientos, existe una diferencia notoria en el rendimiento del residuo final de tegumentos picados (6T-PCH) con respecto a 6T-CTR y 6T-TSA, esta diferencia puede estar asociada a la activación de algunos inhibidores de celulosa sintasa como respuesta al

ataque por herbivoría, encontrados previamente en *Arabidopsis* y trigo inducidos por diferentes insectos [18][19]. Se sabe que regulan positivamente genes asociados con la remodelación de la pared celular [22]. Estos antecedentes podrían explicar la reducción en el contenido de celulosa registrado en los tegumentos inducidos por la picadura de la chinche.

3.5.2 Contenido de hidroxiprolina

Otro análisis realizado sobre los extractos de tegumento es la determinación del contenido de hidroxiprolina (Hyp) en las fracciones. La hidroxiprolina es un aminoácido presente de forma mayoritaria en glicoproteínas propias de plantas. El contenido de estas proteínas en los tejidos vegetales puede variar si dicho tejido se encuentra bajo ataque de agentes patógenos [23], por lo que podría sugerir cambios entre tratamientos. La determinación de hidroxiprolina [24], fue realizada en los extractos acuosos y de los residuos finales de la extracción secuencial, muestras 1T y 6T, ya que existen dos grupos principales de proteínas ricas en hidroxiprolina: arabinogalactano-proteínas (AGPs) y extensinas, que pertenecen al grupo de las proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP, por su sigla en inglés). Sin embargo, los resultados que se presentan en la Tabla 3.3, muestran que los niveles medidos no varían significativamente en los extractos acuosos, ni en los residuos 6T.

En cuanto al contenido de lignina, medida por el método Klason, se observan variaciones significativas, un aumento de 68% en PCH y 51% para TSA, respecto a CTR. Este aumento va de la mano de la diferencia en el contenido total de celulosa/hemicelulosa presentes en 0T-CTR respecto a 0T-PCH con el que se puede inferir que tiene proporcionalmente menor contenido de estos polisacáridos debido a la degradación efectuada por la picadura de la chinche sobre la pared, como indica la Figura 3.4, lo que implicaría un aumento proporcional del contenido de lignina [25]–[27].

3.5.3 Columna de intercambio aniónico para extractos acuosos

En las tablas de caracterización general (Tablas 3.1 y 3.2) de la extracción secuencial, y el perfil de extracción de la Figura 3.3, se puede observar que los extractos 1T y 5T están compuestos por porcentajes importantes de manosa. En las paredes celulares de la familia de las leguminosas, la manosa se puede atribuir a galactomananos, que, si bien son componentes de las paredes celulares, se encuentran formando parte de los polisacáridos de reserva en las paredes celulares de semillas [28]. Con el objetivo de separar y caracterizar estos galactomananos se realizó la columna preparativa de intercambio aniónico de los extractos acuosos para ambos tratamientos y para el control. El perfil de elución de la Figura 3.6 muestra 3 fracciones principales (F1-F3) eluidas con agua, NaCl 0,5 M y 1 M, respectivamente (Tabla 3.4). En todos los casos, F1 está constituida mayoritariamente por monosacáridos neutros, mientras que en F2 el porcentaje de ácidos urónicos aumenta considerablemente. Por otro lado, F3 se caracteriza por tener bajo contenido en hidratos de carbono [29].

El espectro de RMN HSQC 1T-CTR-F1 presentó únicamente las señales correspondientes al galactomanano (Man:Gal de 1.8:1.0), indicado en la Fig. 3.7 A, mientras que 1TPCH-F1 y 1T-TSA-F1 presentaron, además, cantidades importantes de arabinosa, que correspondían a un (1→5)- α -L-arabinano y señales atribuidas a unidades terminales reductoras de manosa (Figura 3.8 C y E), indicando cadenas más cortas en ambas fracciones.

También, para F1 se determinó el contenido de grupo acetilo unido a las cadenas de polisacáridos presentes (Tabla 3.5). Se observan diferencias en las relaciones entre los moles de acetilo y los de unidades monosacarídicas en la muestra.

Además, en los extractos acuosos el porcentaje de esterificación de los grupos carboxilo de los ácidos urónicos es menor en PCH respecto a CTR y TSA (76, 82 y 84%, respectivamente). Se ha indicado en estudios previos que existen grupos acetilo en galactomananos de leguminosas sobre unidades de β -D-manosa en posición 2 y/o 3, también en RGI y/o HG sobre unidades de ácido α -D-galacturónico, generalmente en posición 3 [6][28]. En los espectros 2D HSQC

de las fracciones eluidas con agua 1T-PCH-F1 y 1T-TSA-F1 se logran ver las señales características a 23,1/1.98 ppm y 23.0/1.99 ppm ($^{13}\text{C}/^1\text{H}$), respectivamente, que indican la presencia de grupos acetilo unidos a las cadenas de RGI [29][30]. No se logra divisar esta señal para 1T-CTR-F1.

Se puede especular que el contenido de grupos acetilo en estas fracciones eluidas con agua estaría relacionado con la presencia de cadenas de RGI/HG y no con el contenido de GM. Según los desplazamientos asignados a grupos acetilo encontrados en los espectros de RMN de TSA y PCH y la composición de cada una de las fracciones medidas, es posible que los grupos acetilo liberados en hidrolisis alcalina de las muestras provengan de cadenas de RGI/HG y no de las cadenas de GMs.

En las fracciones F2 eluidas con NaCl 0,5 M; se observa una mezcla de polisacáridos, principalmente RGI, debido que presentan un notable aumento de los ácidos urónicos, indicando mayor cantidad de pectinas. Por otro lado, 1T-CTR-F2, 1T-PCH-F2 y 1T-TSA-F2 presentan aun señales atribuidas a β -D-manosa (Figura 3.8 B, D y F), las cuales forman parte del GM remanente, como se muestra en los espectros de RMN de estas fracciones. Además, todas las fracciones eluidas con 0,5 M de NaCl presentan galactosa y arabinosa que pueden ser parte de AGs con cadenas β -D-galactano unido por 4 y α -L-arabinano unido por 5, con señales de diferente intensidad en los espectros F2 para tratamientos y control, lo que indicaría diferentes solubilidades. En 1T-PCH-F2 se observó, además, un aumento de ramnosa, correspondiente a ramnogalacturonanos (Tabla 3.5) y señales atribuidas a estas unidades estructurales [7][8][31].

La cromatografía de intercambio aniónico fue parcialmente efectiva para separar los galactomananos de las pectinas presentes en los extractos, obteniendo dos fracciones mayoritarias para cada tratamiento. La separación fue más efectiva para 1T-CTR que para los otros tratamientos. La estructura del galactomanano, propuesta en la Figura 3.7A corresponde a un GM bastante sustituido en comparación con GM reportados en literatura [34], casi la mitad de las unidades de manosa se encontraría ramificada con α -D-Galp en posición 6.

En línea con lo anterior, debido a su alto grado de ramificación, estos GMs son muy solubles y es por eso que fueron aislados de los extractos acuosos.

3.5.4 Columna de intercambio aniónico para extractos de Na_2CO_3

Las cromatografías de intercambio aniónico realizadas sobre las muestras extraídas con carbonato de sodio fueron similares a las descritas en la sección 3.5.3. En todos los tratamientos, esta fracción se encuentra compuesta principalmente por pectinas. En 3T-CTR-S se observa 40 % de RG I, mientras que 3T-PCH-S tendría alrededor de un 60 % de RGI. La importante cantidad de Rha en estos extractos indica mayor contenido de ramnoglacturonanos.

En la Tabla 3.13 se pueden observar los tipos de polisacáridos presentes en las fracciones F2. La estimación de los valores se llevó a cabo de la misma forma que para las fracciones F1, del extracto acuoso (sección 3.5.3). Los dominios pectínicos de las muestras varían en su proporción de RGI respecto a HG. Para el extracto 3T-TSA-F2, se puede observar una disminución del contenido de RGI, mientras que aumenta el contenido de HG.

Según lo reportado en bibliografía, el grado de sustitución de los galactomananos con unidades de α -D-galactosa, se relaciona directamente con la solubilidad de estas cadenas. Según las condiciones de extracción de las fracciones 3T, debería tener menor grado de sustitución, si se compara con los extractos acuosos [35][36], pero sería mayor si se compara con los GMs descritos en extractos 5T. Las proporciones en GMs que fueron detectados en 3T y 4T no fueron determinadas por su abundancia poco representativa.

Tabla 3.13: Estimación del contenido de polisacáridos encontrados en F2 provenientes de los extractos 3T, calculados en base a la relación molar entre los monosacáridos componentes.

Muestra	% Molar				
	GM	HG	RGI	Arabinano	Galactano
3T-CTR-F2	10	-	19	12	18
3T-PCH-F2	6	15	26	11	22
3T-TSA-F2	8	20	11	15	12

Para la Tabla 3.14 se consideró una sustitución aproximada de 1:2,4 de Gal:Man, respectivamente, valor que corresponde a los reportados inicialmente para cascarillas (tejido tegumentario) de semillas de soja [37]. Además de los polisacáridos indicados como parte de pectinas, las fracciones F2 contienen cantidades de XGs con relaciones molares Xyl:Glc de 1:1.3 para 3T-CTR-F2, 1:1.2 y 1:1.9 para 3T-PCH-F2 y 3T-TSA-F2, respectivamente, aproximándose bastante a los valores informados para este tipo de hemicelulosas [38]. Estos xiloglucanos corresponden a cadenas de hemicelulosas mayormente solubles y sustituidas debido a que no se necesitan condiciones fuertemente alcalinas para separarlas de la matriz de la pared celular.

Se observaron diferencias en el contenido de XGs de cada fracción, para 3T-PCH-F2 se estima un ~20%, mientras que para 3T-CTR-F2 y 3T-TSA-F2 serían superiores a 30%. Sin embargo, el componente principal de estas fracciones corresponde a RGI, aunque no se puede descartar que parte de la xilosa presente en F2 provenga de restos de xilogalacturonanos (XGAs) que se han encontrado previamente en semillas de soja [39]. Estos extractos de carbonato de sodio poseen una mezcla muy interesante de polisacáridos, pero tienen bajos rendimientos respecto al total de polisacáridos de pared de tegumentos, lo que impidió ensayar nuevos procesos de purificación.

En la fracción insoluble obtenida a partir de 3T (Tabla 3.8), los ácidos urónicos son los monosacáridos mayoritarios. Los rendimientos de estas

fracciones insolubles son de ~60% del extracto original. Para caracterizarlas, se aplicó una hidrólisis parcial según procedimiento descrito [11], con el fin de realizar los espectros de RMN, obteniendo 3T-CTR-H, 3T-PCH-H y 3T-TSA-H. Todas están constituidas por homogalacturonanos, $\rightarrow 4$)- α -D-GalpA-(1 $\rightarrow$; además, se observan para 3T-CTR-H restos de arabinano unido por 5. Al tratarse de muestras provenientes del extracto de carbonato (alcalino débil) no se observó la señal característica del grupo metilo (éster metílico) de GalA, por lo que se desconoce el grado de esterificación (Gme) del correspondiente HG nativo. También, se observaron señales de extremos reductores α y β como consecuencia del acortamiento de las cadenas. Se logró, asimismo, la asignación completa de los HG descritos en la Tabla 3.9 [13].

3.5.5 Extractos obtenidos en medio alcalino fuerte.

Los extractos obtenidos con KOH 1 M presentan una mezcla de HG y RGI con un alto contenido de cadenas laterales de arabinanos y pequeñas cantidades de hemicelulosas. En la Tabla 3.14 se muestra la estimación de los polisacáridos presentes en los extractos 4T para ambos tratamientos y control. Es notorio el bajo contenido de hemicelulosas. Se esperaría que a medida que aumenta la concentración de álcali del medio extractivo, aumente el contenido de hemicelulosas extraídas [40]. Sin embargo, en los extractos 4T predominan aun las pectinas, con un porcentaje de RGI y HG del 90% para 4T-CTR y 4T-PCH, mientras que para 4T-TSA es de alrededor de 80%, con un aumento en el contenido de XG que llega a 13% respecto del total de polisacáridos de pared de esta muestra.

Tabla 3.14: Estimación del contenido de polisacáridos de los extractos 4T, obtenidos con KOH 1 M¹, calculados en base a la relación molar entre los monosacáridos componentes.

Muestra	% Molar					
	HG	RGI	Arabinano	Galactano	GM	XG
4T-CTR	50	12	26	4	3	4
4T-PCH	50	12	22	5	3	7
4T-TSA	35	13	29	6	3	13

¹Se estimó los polisacáridos de la siguiente manera: RGI se estimó como Rha + GalA (1:1), + arabinosa + galactosa que no formaba parte del GM. HG se calculó como la cantidad total de UA menos la cantidad de GalA en RGI. La GM se determinó como la cantidad total de manosa más la cantidad de galactosa estimada según proporción en las fracciones de GM. Los glucanos/xilanos se infirieron basándose en el comportamiento y en la etapa de extracción. Los XGs se determinaron suponiendo una relación molar estimada Xyl:Glc de 3:4.

Estos extractos 4T, se caracterizan por estar compuestos principalmente de cadenas de HG y de RGI que poseen abundantes cadenas laterales de arabinanos. Se han reportado secuencias extractivas similares para semillas de linaza, donde los RGI se encuentran formados mayoritariamente con cadenas de unidades de (1→5)-α-L-arabinanos con ramificaciones en 3 que se distribuyen a lo largo de toda la pared celular conectando los RGI que poseen estas cadenas. Esta distribución de arabinanos en dominios RGI suelen ser adoptados por semillas oleaginosas y las legumbres [41].

Se continuó con la caracterización de los extractos de KOH 4 M, en los que los monosacáridos principales fueron Xyl, GalA y Man (Figura 3.3). Se trataba de polisacáridos bastante insolubles y para poder caracterizarlos se realizó una hidrólisis parcial de los extractos.

Sobre las fracciones solubles 5T-CTR-H y 5T-PCH-H, se analizaron los tipos de enlaces por metilación. En la Tabla 3.16 se logró caracterizar el galactomanano presente en estos extractos, resultando proporciones de Gal:Man de 1:3,1 y 1:3,2 para 5T-CTR-H y 5T-PCH-H, respectivamente. Este

resultado es congruente con la relación molar Gal:Man encontrada para 5T-CTR-H calculada por integración de las señales anoméricas del espectro de RMN ^1H realizado a 70°C (Figura 3.13). Las cantidades de Gal terminal que se obtiene del proceso de metilación, tanto para CTR como para PCH, son menores que la cantidad de 2,3-di-O-metilmanitol detectado por metilación. Sin embargo, se observan cantidades importantes de 2,3-di-O-metilgalactitol (Tabla 3.12), lo que sugiere un cierto grado de submetilación de algunas de estas unidades, que se podrían atribuir a la disminución de Gal terminal (2,3,4,6-tetra-O-metilgalactitol), tanto para 5T-CTR-H como para 5T-PCH-H. En base a esto, podría ocurrir lo mismo en el caso de las unidades de manosa submetilada donde las unidades 2,3-di-O-metilmanitol ó 2,6-di-O-metilmanitol podrían ser unidades de 2,3,6-tri-O-metilmanitol submetiladas, lo que cambiaría las proporciones del análisis. El resultado obtenido en este caso debe considerarse como una aproximación con la posibilidad de ser confirmarlo por RMN.

Tabla 3.16. Resultados referidos a los galactomananos obtenidos del análisis por metilación de 5T-CTR-H y 5T-PCH-H.

Muestra	Monosacáridos metilados	Unidad estructural	Molar (%)	Galactomano	Rel.
CTR	2,3,4,6-Me ₄ -Gal	α -D-Galp-(1→	12	<i>Terminal</i>	0.59
	2,3,6-Me ₃ -Man	→4)-β-D-Manp-(1→	19	<i>Cadena principal</i>	1.00
	2,3-Me ₂ -Man	→4,6)-β-D-Manp-(1→	16	<i>Ramificación</i>	0.84
PCH	2,3,4,6-Me ₄ -Gal	α -D-Galp-(1→	8	<i>Terminal</i>	0.54
	2,3,6-Me ₃ -Man	→4)-β-D-Manp-(1→	15	<i>Cadena principal</i>	1.00
	2,3-Me ₂ -Man	→4,6)-β-D-Manp-(1→	12	<i>Ramificación</i>	0.73

Se sabe que aumento en el grado de sustitución de los galactomananos produce un aumento en la solubilidad de estas cadenas [36][42]. Los galactomananos aislados de 1T-CTR-F1, en particular en las fracciones F1, eluida con agua, poseía un grado de sustitución Gal:Man de **1:1.8**. Si bien, por las condiciones de extracción realizadas, la proporción Gal:Man para 1T-PCH-F1 y

1T-TSA-F1 deberían ser similar a lo restistrado para CTR, sin embargo no fueron calculadas debido a la presencia de galactanos unidos por 4 en estas fracciones por lo que la estimación de volvía imprecisa.

En la Figura 3.15 A, se muestra la estructura propuesta para el galactomanano soluble aislado de la fracción 1T-CTR-F1

Mientras que para el galactomanano aislado de las muestras extraídas con KOH 4 M, 5T-CTR y 5T-PCH, se encontró a través del análisis por metilación que poseen un grado de sustitución Gal:Man de **1:3,1** y **1:3,2** para 5T-CTR-H y 5T-PCH-H, respectivamente. Estos valores se confirmaron en el caso de 5T-CTR-H a través del espectro de RMN ^1H (integración de señales anoméricas) que dio un grado de sustitución de Gal:Man **1:3,0**. Esto indica que se trata de un galactomanano menos sustituido y, como resultado, mucho menos soluble que el aislado del extracto 1T. La estructura sugerida para este GM se muestra en la Figura 3.15 B.

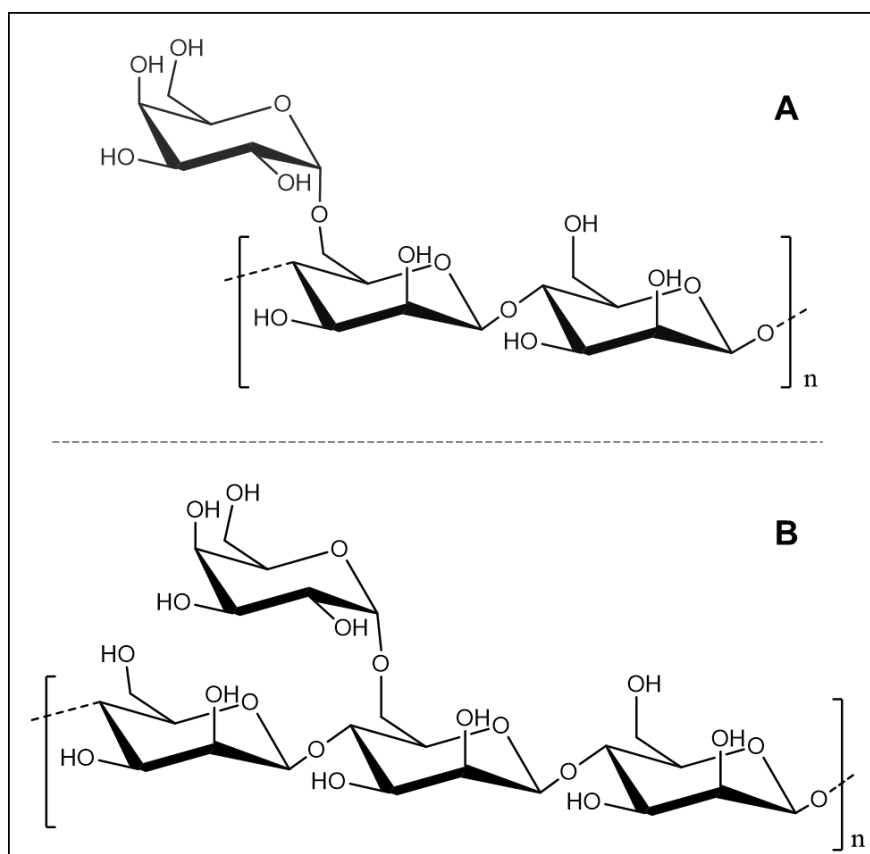


Figura 3.15: Estructuras promedio propuestas para galactomananos de soja extraídos en diferentes condiciones. A: galactomanano extraído con agua a temperatura ambiente. B: galactomanano extraído con solución de KOH 4 M.

El residuo final corresponde al material insoluble que se obtiene al finalizar el proceso de extracción secuencial. En la Tabla 3.2 se puede ver la caracterización general, que muestra que todos los residuos estaban compuestos por 70-77% de glucosa, lo que correspondería eventualmente a una pequeña cantidad de GX, pero, muy mayoritariamente, a celulosa [43]. Asimismo, para ambos tratamientos y el control se encontró 13-16% de ácidos urónicos. Por otro lado, se pudo identificar, por medio de una hidrólisis parcial, residuos de HG que aún permanecían insolubles incluso en las condiciones de KOH 4 M. Además, se caracterizando el HG, asignando las señales encontradas en los espectros de RMN para el material hidrolizado.

3.5.6 Estimación global de los polisacáridos presentes

La extracción secuencial es una herramienta útil para fraccionar una estructura compleja como la pared celular de semillas de soja dependiendo de su afinidad con el medio extractivo. Posterior al análisis de cada fracción a través de técnicas de elucidación estructural, en la Tabla 3.17 se muestra la composición aproximada en polisacáridos componentes de cada fracción. La estimación fue realizada respecto a lo descrito en la sección 2.7 (capítulo 2).

Los resultados de la estimación expusieron que en los primeros cuatro extractos predominan las pectinas. Sin embargo, su composición varió entre estos extractos. 1T mostró que aproximadamente mitad de los residuos GalA de HG estaban esterificados, mientras que en los extractos 2T, casi todas las unidades GalA estaban libres, y HG constituía el único polisacárido presente en cantidades importantes, 94-97% del total de monosacáridos. En 3T y 4T las cantidades de HG disminuyen, mientras que las de RGI aumentan. 5T es el único extracto, en el que predominan las hemicelulosas, representadas por GM y GX. Finalmente, como se indicó anteriormente, en el residuo del procedimiento de extracción la celulosa es el componente mayoritario, pero aún existen porcentajes importantes de HG y pequeñas cantidades de hemicelulosas.

Tabla 3.17: Estimación de la composición de los diferentes extractos y del residuo final del procedimiento de extracción utilizado en tegumento de soja.

Extracto	HG (Me)	RGI	GM	Glucanos/Xilanos		
				XG	GX	celulosa
Control (CTR)						
1T	30 (16)	31	26	2 ¹	-	-
2T	95 (4)	5	-	-	-	-
3T	74	18	2	4 ¹	-	-
4T	50	41	3	4	-	-
5T	11	19	40	6	22	-
6T	14	2	6	-	7	70
Picado por chinche (PCH)						
1T	42 (17)	36	21	1 ¹	-	-
2T	97 (5)	2	-	-	-	-
3T	79	17	2	2 ¹	-	-
4T	50	39	3	8	-	-
5T	22	17	20	13	28	-
6T	16	3	5	-	5	71
Tratado con ácido salicílico (TSA)						
1T	32 (15)	52	14	1 ¹		
2T	94 (3)	5	-	-	-	-
3T	67	25	4	4 ¹	-	-
4T	35	48	3	14	-	-
5T	15	20	29	9	27	-
6T	13	2	4	-	4	77

¹Xilosa podría provenir también de xilogalacturonanos (XGA) [44].

Para tener una visión general del procedimiento de extracción, se estimaron las proporciones de polisacáridos solubilizados en el proceso extractivo e insolubles obtenidos del RIA (Tabla 3.18). Además, se determinó la cantidad total de cada uno de los polisacáridos mayoritarios en la pared celular del tegumento. Las estimaciones realizadas en estos cálculos son las mismas que en la Tabla 3.18.

Tabla 3.18: Estimación de los polisacáridos solubilizados e insolubles obtenidos mediante el procedimiento de extracción utilizado para tegumentos en g/100g de RIA.

		g /100g de RIA ^{1, 2, 3}					
Pared celular		HG	RGI	GM	Glucanos/Xilanos		
					XG	GX	celulosa
	Solubilizado	7,59 (59,2)	2,95 (78,0)	1,74 (41,8)	0,38 (100)	0,59 (17,4)	-
CTR	Insoluble	5,23 (40,8)	0,81 (22,0)	2,42 (58,2)	-	2,82 (82,6)	28,18 (100)
	Total	12,8 [24,4]	3,65 [6,9]	4,15 [7,9]	0,38 [0,7]	3,41 [6,5]	28,18 [53,6]
	Solubilizado	8,02 (70,9)	1,99 (76,2)	0,78 (43,1)	0,43 (100)	0,52 (33,6)	-
PCH	Insoluble	3,29 (29,1)	0,62 (23,8)	1,03 (56,9)	-	1,03 (66,4)	14,60 (100)
	Total	11,31 [35,0]	2,61 [8,1]	1,81 [5,6]	0,43 [1,3]	1,55 [4,8]	14,60 [45,2]
	Solubilizado	7,93 (67,1)	3,57 (85,6)	1,45 (54,7)	0,90 (100)	1,07 (47,3)	-
TSA	Insoluble	3,88 (32,9)	0,60 (14,4)	1,19 (45,3)	-	1,19 (52,7)	23,00 (100)
	Total	11,82 [26,4]	4,17 [9,3]	2,65 [5,9]	0,90 [2,0]	2,26 [5,0]	23,00 [51,3]

¹Estimación en base al porcentaje de carbohidratos de cada fracción. ²Entre paréntesis, porcentajes de cada polisacárido obtenidos (soluble o insoluble). ³Entre corchetes, contribución de cada uno de los polisacáridos mayoritarios al total de pared celular.

Se puede observar en esta tabla resumen, que alrededor de la mitad del contenido de cada tratamiento está compuesto por celulosa, siendo 53,6% para CTR y 45,2% para PCH. De la mitad restante, 31,3% en CTR está constituido por pectinas, aumentando al 43,7% en PCH, y hemicelulosas con contenidos desde 11,7% (PCH) hasta 15,1% (CTR). Las pectinas se consideran la suma de

HG + RGI del total de cada tratamiento y para las hemicelulosas se considera la suma de GM + XG + GX.

Es importante considerar que estos polisacáridos representan el total de la pared respecto a RIA y sus rendimientos varían dependiendo del tratamiento. En el caso de control posee aproximadamente 53% de pared en RIA, mientras que para el picado por chinche disminuye a sólo el 32,3% del total de RIA y para el tratado con ácido salicílico es de un 44,8%. Los componentes que constituyen la masa restante deberían ser proteínas, almidón y lignina [45]–[48], los cuales no fueron cuantificados de forma general en este trabajo.

3. 6 Conclusiones

La extracción secuencial para los polisacáridos de pared celular de tegumentos de soja en estadio madurativo R6 resultó ser una buena opción para la separación de los diferentes tipos de polisacáridos que conforman las paredes celulares vegetales. Existen polisacáridos mayoritarios por fracción y su extracción fue avanzando acorde cambiaba el solvente utilizado.

Para los tratamientos aplicados a la semilla durante el estadio R5 (relleno y crecimiento de semillas), se pudieron detectar cambios específicos en grupos de polisacáridos determinados, donde destacan la disminución del total celulosa en paredes de PCH respecto a CTR y a TSA, que va ligada a la disminución del rendimiento total de pared, respecto a RIA, disminuyendo 40% en PCH respecto a CTR. El contenido total de galactomananos disminuyó 36% en TSA y 56% en PCH, ambos respecto a CTR.

Se concluye que los cambios más notorios entre tratamientos corresponderían a la disminución de la celulosa encontrada en PCH, respecto a CTR y TSA. Además, la disminución de GMs y GXs de PCH respecto a control como efecto del tratamiento inductivo aplicado a campo.

Con el análisis completo de las paredes y las estimaciones respecto a cada grupo de polisacáridos, medidos en tegumentos se puede focalizar en cuáles grupos de estos polisacáridos se observan cambios entre tratamientos y aplicar estos estudios de caracterización estructural a áreas de ecología química y mejoramiento vegetal de forma más específica.

Las rutas biosintéticas de los diferentes tipos de polisacáridos de pared son conocidas y estudiadas por la biología molecular hace décadas. Es a partir desde esta perspectiva bioquímica y molecular donde se puede focalizar el estudio directo del ataque herbívoro de sobre los tejidos conformados por pared celular vegetal de soja. Tomando en consideración algunos de los cambios más sustanciales mencionados anteriormente y relacionándolos con la información de los metabolitos involucrados en la biosíntesis de estos polisacáridos, se podrían estudiar las rutas, mecanismos fisiológicos y de señalización de manera predictiva para algunos sistemas de estudios agronómicos ecológicos y químicos.

3.7 Referencias

- [1] Romina Giacometti and Jorge A. Zavala, "Soybeans cultivation, nutritional properties and effects on health," in *Nova Science Publishers, Inc.*, vol. 22, no. 1, B. Fletcher, Ed. Buenos Aires, 2017, pp. 35–62.
- [2] B. S. Corrêa-Ferreira and J. De Azevedo, "Soybean seed damage by different species of stink bugs," *Agric. For. Entomol.*, vol. 4, no. 2, pp. 145–150, 2002.
- [3] S. C. Fry, *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*, Primera ed. Caldwell, New Jersey, 1988.
- [4] R. Giacometti *et al.*, "Early perception of stink bug damage in developing seeds of field-grown soybean induces chemical defences and reduces bug attack," *Pest Manag. Sci.*, vol. 72, no. 8, pp. 1585–1594, 2016.
- [5] A. Ebringerová and H. Thomas, "Hemicellulose," no. August, pp. 1–67, 2005.
- [6] S. Y. Chan, W. S. Choo, D. J. Young, and X. J. Loh, "Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology," *Carbohydr. Polym.*, vol. 161, pp. 118–139, 2017.
- [7] P. V. Fernández, J. M. Estevez, A. S. Cerezo, and M. Ciancia, "Sulfated β -d-mannan from green seaweed *Codium vermilara*," *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 1, pp. 916–919, 2012.
- [8] E. N. Makarova, E. G. Shakhmatov, and V. A. Belyy, "Structural studies of water-extractable pectic polysaccharides and arabinogalactan proteins from *Picea abies* greenery," *Carbohydr. Polym.*, vol. 195, no. April, pp. 207–217, 2018.
- [9] P. Virginia, V. Martín, L. Cobello, and A. Susana, "Glucuronoarabinoxylans and other cell wall polysaccharides from shoots of *Guadua chacoensis* obtained by extraction in different conditions," *Carbohydr. Polym.*, vol. 226, no. September, p. 115313, 2019.

- [10] E. G. Shakhmatov, E. V. Udoratina, K. V. Atukmaev, and E. N. Makarova, “Extraction and structural characteristics of pectic polysaccharides from *Abies sibirica* L,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 123, pp. 228–236, 2015.
- [11] M. I. Bilan, E. V. Vinogradova, A. S. Shashkov, and A. I. Usov, “Structure of a highly pyruvylated galactan sulfate from the Pacific green alga *Codium yezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta),” *Carbohydr. Res.*, vol. 342, no. 3–4, pp. 586–596, 2007.
- [12] E. G. Shakhmatov, K. V. Atukmaev, and E. N. Makarova, “Structural characteristics of pectic polysaccharides and arabinogalactan proteins from *Heracleum sosnowskyi* Manden,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 136, pp. 1358–1369, 2016.
- [13] B. O. Petersen, S. Meier, J. Duus, and M. H. Clausen, “Structural characterization of homogalacturonan by NMR spectroscopy-assignment of reference compounds,” *Carbohydr. Res.*, vol. 343, no. 16, pp. 2830–2833, 2008.
- [14] E. N. Makarova, O. A. Patova, E. G. Shakhmatov, S. P. Kuznetsov, and Y. S. Ovodov, “Structural studies of the pectic polysaccharide from Siberian fir (*Abies sibirica* Ledeb.),” *Carbohydr. Polym.*, vol. 92, no. 2, pp. 1817–1826, 2013.
- [15] E. N. Makarova and E. G. Shakhmatov, “Characterization of pectin-xylan-glucan-arabinogalactan proteins complex from Siberian fir *Abies sibirica* Ledeb.,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 260, no. February, p. 117825, 2021.
- [16] T. R. Patel *et al.*, “Global conformation analysis of irradiated xyloglucans,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 74, no. 4, pp. 845–851, 2008.
- [17] M. Wiederstein, S. Baumgartner, and K. Lauter, “Soybean (*Glycine max*) allergens—A Review on an Outstanding Plant Food with Allergenic Potential,” *ACS Food Sci. Technol.*, vol. 3, no. 3, pp. 363–378, 2023.
- [18] M. Thrane, P. V. Paulsen, M. W. Orcutt, and T. M. Krieger, “Soy Protein,” in *Sustainable Protein Sources*, S. R. Nadathur, L. Scanlin, and J. P. D. Wanasundara, Eds. Elsevier, 2017, pp. 23–45.

- [19] M. M. H. Huisman, H. A. Schols, and A. G. J. Voragen, "Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterisation," *Carbohydr. Polym.*, vol. 37, no. 1, pp. 87–95, 1998.
- [20] X. Liu *et al.*, "Gene Expression of Different Wheat Genotypes During Attack by Virulent and Avirulent Hessian Fly (*Mayetiola destructor*) Larvae," pp. 2171–2194, 2007.
- [21] C. Ellis, I. Karafyllidis, C. Wasternack, and J. G. Turner, "The Arabidopsis Mutant *cev1* Links Cell Wall Signaling to Jasmonate and Ethylene Responses," vol. 14, no. July, pp. 1557–1566, 2002.
- [22] F. L. Goggin, "Plant – aphid interactions : molecular and ecological perspectives," pp. 399–408, 2007.
- [23] J. Sommer-Knudsen, A. Basic, and A. E. Clarke, "Hydroxyproline-rich plant glycoproteins," *Phytochemistry*, vol. 47, no. 4, pp. 483–497, 1998.
- [24] H. Stegemann and K. Stalder, "Determination of Hydroxyproline," *Clin. Chim. Acta*, vol. 18, pp. 267–273, 1967.
- [25] J. J. Lyczakowski *et al.*, "Removal of glucuronic acid from xylan is a strategy to improve the conversion of plant biomass to sugars for bioenergy," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, 2017.
- [26] L. B. Davin and N. G. Lewis, "Lignin primary structures and dirigent sites," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 16, pp. 407–415, 2005.
- [27] O. M. Terrett and P. Dupree, "Covalent interactions between lignin and hemicelluloses in plant secondary cell walls," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 56, pp. 97–104, 2019.
- [28] M. S. Buckeridge, "Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation," *Plant Physiol.*, vol. 154, no. 3, pp. 1017–1023, 2010.
- [29] S. Ray, J. Vigouroux, B. Quémener, E. Bonnin, and M. Lahaye, "Novel and diverse fine structures in LiCl – DMSO extracted apple hemicelluloses," *Carbohydr. Polym.*, vol. 108, pp. 46–57, 2014.

- [30] N. C. Carpita, J. Ralph, and M. C. McCann, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Second Edi. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd Registered, 2015.
- [31] C. T. M. Fransen, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenthart, H. A. Schols, and A. G. J. Voragen, "The CDTA-Soluble Pectic Substances from Soybean Meal are Composed of Rhamnogalacturonan and Xylogalacturonan but not," vol. 58, pp. 279–294, 2001.
- [32] Z. Hromádková and Z. Košť, "Non-cellulosic polysaccharides from the leaves of small balsam (*Impatiens parviflora* DC .)," vol. 389, pp. 147–153, 2014.
- [33] E. N. Makarova, E. G. Shakhmatov, and V. A. Belyy, "Structural characteristics of oxalate-soluble polysaccharides of Sosnowsky's hogweed (*Heracleum sosnowskyi* Manden)," *Carbohydr. Polym.*, vol. 153, pp. 66–77, 2016.
- [34] V. Kumar, A. K. Sinha, H. P. S. Makkar, G. de Boeck, and K. Becker, "Dietary Roles of Non-Starch Polysachharides in Human Nutrition: A Review," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 52, no. 10, pp. 899–935, 2012.
- [35] S. Singh, G. Singh, and S. K. Arya, "Mannans: An overview of properties and application in food products," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 119, pp. 79–95, 2018.
- [36] P. B. S. Albuquerque *et al.*, "Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*," *Carbohydr. Polym.*, vol. 104, no. 1, pp. 127–134, 2014.
- [37] G. O. Aspinall and J. N. C. Whyte, "Polysaccharides of soy-beans. Part I. Galactomannans from the hulls," *J. Chem. Soc.*, no. 5058, pp. 5051–5057, 1964.
- [38] M. Handford, "Biosynthesis of plant cell walls.," *Cienc. e Investig. Agrar.*, vol. 33, no. 3, pp. 149–166, 2006.
- [39] K. H. Caffall and D. Mohnen, "The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides," *Carbohydr. Res.*, vol. 344, no. 14,

- pp. 1879–1900, 2009.
- [40] A. E. Percy, L. D. Melton, and P. E. Jameson, “Xyloglucan and hemicelluloses in the cell wall during apple fruit development and ripening,” *Plant Sci.*, vol. 125, no. 1, pp. 31–39, 1997.
- [41] H. H. Ding, S. W. Cui, H. D. Goff, J. Chen, and Q. Wang, “Arabinan-rich Rhamnogalacturonan-I from Flaxseed Kernel cell wall,” *Food Hydrocoll.*, vol. 47, pp. 158–167, 2015.
- [42] N. Geshi, B. L. Petersen, and H. V. Scheller, “Toward tailored synthesis of functional polysaccharides in plants,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1190, pp. 50–57, 2010.
- [43] M. Busse-Wicher *et al.*, “Evolution of xylan substitution patterns in gymnosperms and angiosperms: Implications for xylan interaction with cellulose,” *Plant Physiol.*, vol. 171, no. 4, pp. 2418–2431, 2016.
- [44] G. O. Aspinall, K. Hunt, and I. M. Morrison, “Polysaccharides of Soybeans. Part II Fractionation of Hull Cell-wall Polysaccharides and the Structure of a Xylan,” *J. Chem. Soc. C Org.*, no. 0, pp. 1945–1949, 1967.
- [45] G. I. Cassab, “Plant cell wall proteins,” *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 49, pp. 281–309, 1998.
- [46] X. Saldivar, Y. Wang, P. Chen, and A. Hou, “Changes in chemical composition during soybean seed development,” *Food Chem.*, vol. 124, no. 4, pp. 1369–1375, 2011.
- [47] O. Lerouxel, D. M. Cavalier, A. H. Liepman, and K. Keegstra, “Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process,” *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 621–630, 2006.
- [48] N. C. Carpita and M. C. McCann, “The Cell Wall,” in *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, En ed., B. Buchanan, R. Gruissem, and R. Jones, Eds. 15501 Monona Drive, Rockville, MD 20855-2768 USA.: American Society of Plants Physiologists, 2000, pp. 52–108.

CAPÍTULO 4

Cambios en las paredes de tegumentos de
semillas de soja Por tratamiento con saliva de
chinche verde

4.1 Introducción

Los polisacáridos de pared celular son separados del resto de los componentes celulares como lípidos, hidratos de carbono de bajo peso molecular (sacarosa, rafinosa, estaquiosa y otros oligosacáridos) y algunas proteínas solubles en alcohol por medio de la extracción etanólica. El residuo insoluble en alcohol (RIA) está compuesto por polisacáridos estructurales que componen también la denominada fibra dietaria [1], que comprende, entre otros grupos de moléculas, todos los polisacáridos de pared celular vegetal. El RIA es el material de partida de estudio de la pared y de referencia para informar rendimientos de extracciones y fraccionamientos como la extracción secuencial desarrolladas los capítulos 3 y 5.

El RIA, además de los componentes de pared celular, también contiene elementos estructurales que no son hidratos de carbono, como lignina, compuestos fenólicos y proteínas estructurales [2]. La fibra dietaria de semillas soja (*Glycine max*) ha sido bastante estudiada desde diferentes enfoques productivos y agronómicos. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la importancia y caracterización de la fibra dietaria en la soja, en relación a las interacciones entre los polisacáridos de pared celular y patógenos o insectos herbívoros, como el daño producido la chinche verde *Nezara viridula* [3]. Tampoco se han desarrollado estudios al respecto en estadios de desarrollo de las semillas de soja previos a la maduración, como es el caso de R5, que es conocido por ser el momento de mayor ataque de las chinches [4]. En esta misma línea, es importante desarrollar investigaciones que puedan establecer cambios precisos de los componentes de las paredes celulares desde un punto de vista molecular y de química ecológica, ya que este tipo de enfoque podría introducir prácticas agronómicas y ecológicas que lleven a minimizar el uso de agroquímicos [2]. Además, si se desarrolla la incorporación de defensas vegetales podría permitir reducir la cantidad de aplicaciones de pesticidas y la información podría transferirse a programas de mejoramiento genético, lo que podría apuntar a mejoramientos en la producción de la industria alimentaria humana. En base a lo anterior, en este estudio se analiza el efecto de la saliva acuosa en residuos de pared celular de tegumentos de semillas en desarrollo de *Glicine max*. Resultados previos mostraron cambios importantes en la expresión de genes que codifican algunas enzimas como consecuencia del daño causado por chinches en semillas de soja en desarrollo [5].

Los daños causados por *N viridula* se inician con una lesión mecánica, al sondear y perforar con sus estiletes, y posteriormente se produce la inyección de saliva líquida, que actúa disolviendo los tejidos, registrando un elevado aumento de estrés oxidativo en la semilla [6].

En este capítulo se desarrolla la caracterización general de las estructuras de polisacáridos de las paredes celulares de tegumentos de los residuos insolubles en alcohol de los tegumentos control y picados por chinches, cosechados en R6, cuando son tratados directamente con saliva de chinche.

4.2 Objetivos

Se estudió la etapa R5 del ciclo reproductivo (mayor ataque), siendo este trabajo de tesis, la primera caracterización de dicho material en esa etapa. Los objetivos fueron:

- Determinar si existen cambios en la composición y estructura de los polisacáridos presentes en paredes celulares extraídos de tegumentos de semillas de soja, cuando estos son tratados con saliva de chinche.
- Aislar y trabajar directamente sobre la pared celular proveniente de tegumentos cultivados a campo y sometidos a los diferentes tratamientos.
- Caracterizar la composición de los polisacáridos de pared de tegumentos tratado con saliva de chinche, con el fin de explicar los posibles efectos de la inducción por herbivoría sobre la pared.

4.3 Obtención de residuos a tratar

Se obtuvieron los tegumentos según el procedimiento descrito (Capítulo 2 [7]). Seguidamente, se procedió a obtener el RIA seco y pesado que para ser tratado directamente con saliva de chinche. En la Figura 4.1 se describe el proceso de obtención de las muestras.

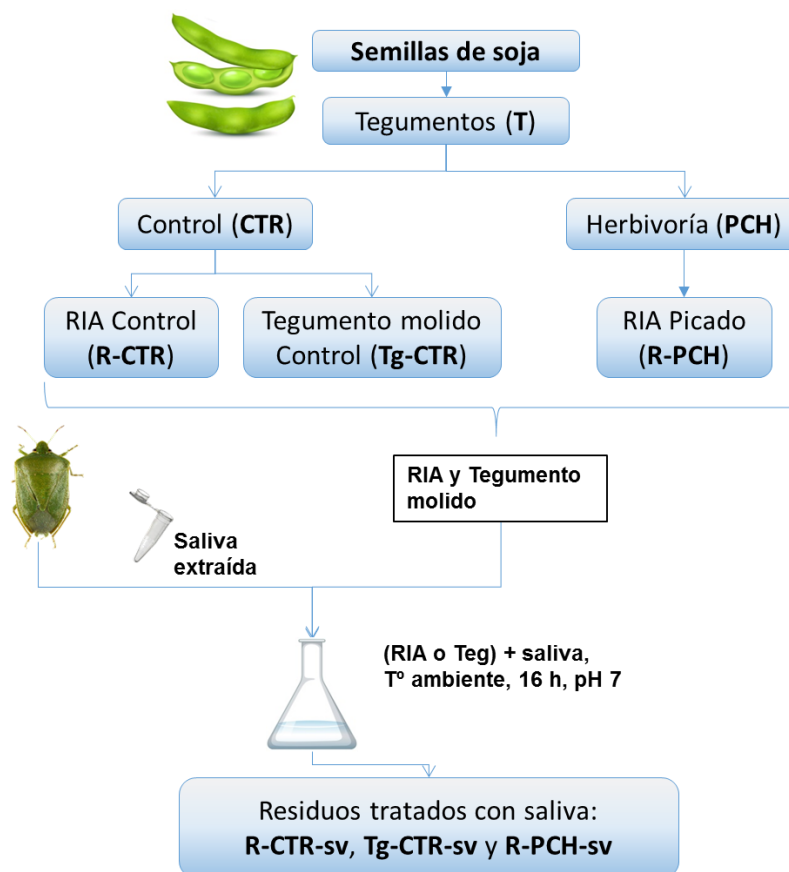


Figura 4.1: Procedimiento para el tratamiento de residuos insoluble en alcohol de CTR, PCH y tegumentos molidos de CTR (Teg-CTR) con saliva de chinche *Nezara viridula*.

A partir de los tegumentos por extracción con alcohol, se obtuvo el RIA proveniente de las semillas control y las picadas, además se trabajó con tegumento de control, que se trató directamente con saliva. Una vez realizada la digestión del RIA de las semillas picadas (R-PCH) y control (R-CTR) con saliva, se obtuvieron los residuos tratados (sv), según el procedimiento descrito por Giacometti et al. [8], que propone dejar actuar la saliva de chinche sobre una suspensión del material durante toda la noche a pH 7.

Por otro lado, se realizó la digestión enzimática con endo-poligalacturonasa (E-GALUSP; Megazyme®) de los residuos R-CTR y R-PCH, llevando a cabo posteriormente en los dos casos una extracción secuencial simplificada. El procedimiento se muestra en la Figura 4.2.

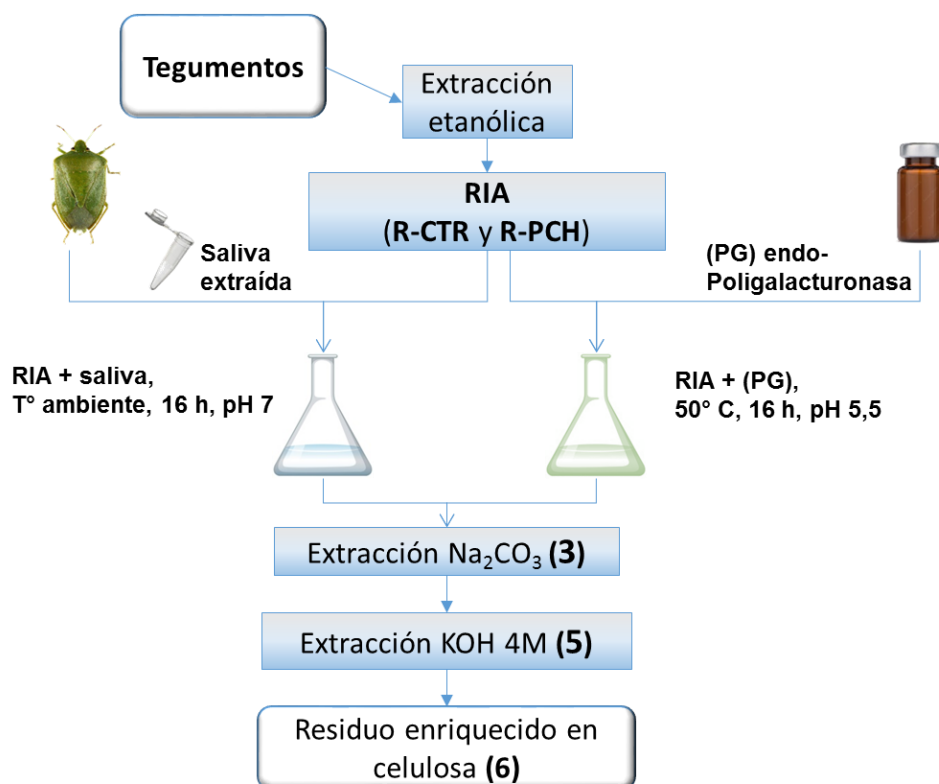


Figura 4.2: Procedimiento para el tratamiento de RIA con poligalacturonasa y posterior extracción secuencial simplificada.

La extracción secuencial simplificada es similar a la extracción secuencial desarrollada en los Capítulos 3 y 5, pero con la diferencia que solamente se extrae en medio alcalino suave con Na₂CO₃ 0,05 M (extractos R3T) y con medio alcalino fuerte de KOH 4 M (extractos R5T), obteniéndose el residuo final, R6T.

Para todos los estudios anteriores se realizó una caracterización química general de cada uno de los extractos originales y tratados.

4.4 Resultados de la caracterización química general.

Se determinaron los rendimientos y la composición en monosacáridos de los extractos con posterioridad al tratamiento con saliva de chinche, los resultados se muestran en la Tabla 4.1, se expresan en g de monosacárido por kg de RIA, teniendo en cuenta la caracterización realizada en el Capítulo 3 para estas paredes celulares (R-CTR y R-PCH) y los resultados de la espectroscopía de RMN de cada uno de los extractos. Se observa una disminución en la mayoría de los monosacáridos componentes de pared, especialmente Man, Gal y Glc para R-PCH-sv y de Ara, Man y Gal para R-CTR-sv con respecto a cada residuo original. En el caso de tegumento (Tg-CTR-sv), también se observa una disminución de más de la mitad del contenido de Man y Gal, además de una disminución de Glc, respecto a Tg-CTR.

Tabla 4.1: Caracterización de RIA de tegumentos de soja, control (CTR) y picado (PCH) antes y después del tratamiento con saliva de chinche (sv).

Muestras tratadas ¹	Rend. ² (%)	Ácidos urónicos	Monosacáridos neutros	Monosacáridos totales (g/Kg) ³							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GaIA
R-PCH	-	18,1 ±2,5	50,8 ±3,1	10,7 ±2,5	3,8 ±0,6	46,8 ±3,9	41,6 ±7,1	23,8 ±2,1	27,3 ±2,0	335,1±7,9	199,9±24,2
R-PCH-sv	78	22,3 ±0,9	40,0 ±2,8	8,9±2,7	2,2±0,5	34,2±6,9	36,6±6,6	12,3±2,1	13,8±2,5	192,1±12,5	192,0±6,7
R-CTR	-	16,7 ±2,3	56,5 ±1,5	8,7±3,3	2,7±1,1	50,8±9,7	63,5±14,1	35,7±7,9	18,6±0,8	366,1±35,2	184,1±26,2
R-CTR-sv	72	19,3 ±2,8	47,5 ±4,4	6,2±1,0	2,2±0,4	22,5±2,5	31,4±4,6	16,1±0,5	12,1±2,2	266,6±23,0	163,0±17,5
Tg-CTR	-	18,6 ±1,8	62,5 ±2,2	7,1±2,1	2,0±0,6	71,3±8,9	64,7±6,5	22,1±4,1	33,3±1,9	408,5±9,2	216,8±19,0
Tg-CTR-sv	84	19,6 ±1,8	69,6 ±4,1	7,1±1,4	-	55,8±4,9	82,7±2,5	8,9±1,5	14,5±2,6	349,0±12,6	183,5±16,9

¹Valor medio ± desviación estándar (n = 3).²Calulado refiriendo todas las muestras al RIA respectivo original posterior a los tratamientos enzimáticos³Calulado en gramos de cada azúcar por kilogramo de RIA sin los % de rendimiento

Una vez procesados los RIA del tratamiento control e inducido por chinche con saliva de chinche (R-CTR-sv y R-PCH-sv), se realizó el tratamiento con (PG) para todos los residuos de ambos tratamientos y control, obteniendo R-CTR-PG y R-PCH-PG. La caracterización general de la extracción secuencial acortada de estos seis residuos se muestra en la Tabla 4.2.

Los resultados muestran cómo van distribuyendo los diferentes polisacáridos a través de la extracción secuencial simplificada. Los extractos RT3 presentaron alto contenido de GalA, 70 - 90% del total de hidratos de carbono de cada muestra, en acuerdo con altos contenidos de HG en los extractos 1T-3T (Capítulo 3) y también diferentes proporciones de RGI como segundo polisacárido en abundancia. En los extractos R5T, el contenido de GalA baja a valores de 25 - 56% del total de hidratos de carbono y se observan cantidades importantes de Ara, posiblemente proveniente de los arabinanos de las cadenas laterales de RGI, y Xyl, que correspondería a cadenas de XG y GX extraídas con medio alcalino fuerte. En el residuo final, R6T, se muestra que predomina la Glc, con porcentajes de 40 - 60%, dependiendo de cada tratamiento y corresponde principalmente a las cadenas insolubles de celulosa presentes en los tegumentos de semillas de soja. Otros componentes importantes de estos residuos son los ácidos urónicos, que representan alrededor de 30 - 10%, de Xyl que podría provenir de cadenas de HG muy insolubles y/o xilanos poco sustituidos.

Tabla 4.2: Tabla de extracción secuencial acortada realizada sobre RIA de tegumentos R-CTR y R-PCH, tratadas previamente con poligalacturonasa (PGA) y saliva de chinche (sv).

Muestra ¹	Rend ² . (%)	Ácidos urónicos	Monosacáridos neutros	Monosacáridos totales ³ (%)							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA
R-CTR		16,7 ±2,3	56,5 ±1,5	1,3±0,7	0,4±0,2	8,4±2,1	10,5±2,6	4,8±0,9	2,5±0,1	49,3±5,2	22,8±2,7
R-PCH		18,1 ±2,5	50,8 ±3,1	1,7 ±0,4	0,6±0,1	8,2±0,7	7,3±1,7	3,4±0,3	3,9±1,2	47,9±2,2	26,5±2,9
R3T-CTR-PG	6,6	41,3 ±1,4	11,2 ±2,2	1,9	-	4,1	0,8	1,2	2,8	10,5	78,6
R3T-PCH-PG	6,6	51,4 ±3,1	8,7 ±1,6	1,7	-	5,5	0,5	0,5	2,4	3,9	85,5
R3T-CTR-sv	5,8	54,8 ±1,6	7,1 ±1,4	1,9	0,6	1,9	0,7	1,2	1,8	3,3	88,5
R3T-PCH-sv	5,1	31,4 ±1,6	13,2 ±3,3	4,1	-	6,7	0,9	1,6	3,5	12,8	70,4
R5T-CTR-PG	9,6	33,6 ±2,6	26,1 ±0,5	1,7	0,6	18,8	8,7	5,3	4,0	4,5	56,3
R5T-PCH-PG	9,0	18,9 ±1,3	24,6 ±0,4	2,7	0,8	25,9	8,4	3,3	6,0	9,4	43,4
R5T-CTR-sv	8,6	30,6 ±3,0	32,3 ±0,4	1,5	0,8	24,3	11,3	3,0	4,2	6,4	48,6
R5T-PCH-sv	7,6	15,8 ±0,2	38,6 ±0,6	2,1	0,7	33,1	20,9	2,9	5,0	6,3	29,0
R6T-CTR-PG	49,1	11,9 ±0,4	39,1 ±0,1	-	-	1,5	11,1	2,6	1,3	60,2	23,3
R6T-PCH-PG	25,9	25,1 ±3,0	41,7 ±0,4	0,6	-	1,9	8,0	1,7	0,6	49,6	37,6
R6T-CTR-sv	41,0	17,6 ±2,6	38,1 ±2,4	0,7	0,4	1,9	12,6	1,5	0,8	50,5	31,6
R6T-PCH-sv	49,4	38,1 ±3,0	40,4 ±1,3	0,4	0,3	2,2	7,0	1,4	0,9	39,4	48,5

¹Extracción secuencial con Na₂CO₃ (3T), KOH 4M (5T), y residuo final (6T).

²Rendimientos calculados en base a material obtenido con posterioridad a tratamientos enzimáticos

³Calulado en base al total de azúcares presente en la muestra.

4.5 Discusión de resultados

4.5.1 Tratamientos enzimáticos en RIA y tegumento.

Se trabajó directamente con RIA de tegumentos de las semillas CTR y PCH, sobre los que se realizó un tratamiento de digestión con saliva de chinche. Se cuantificaron los resultados del tratamiento con saliva en base a g de monosacáridos constituyentes por kg de RIA aislado, con el fin de poder comparar los resultados para las diferentes muestras y así determinar qué componentes se perdieron durante el tratamiento. En la Figura 4.3 se observan los resultados obtenidos. La mayor diferencia se encontró en la disminución del total de Glc, tanto para CTR y PCH con una disminución de 27 y 43%, respectivamente.

Se ha estudiado la disociación de los polisacáridos estructurales de la pared celular en los procesos de maduración de los frutos y como resultado de la acción de algún patógeno directamente sobre los tejidos, descomponiendo la pared [9]. Entre las principales enzimas detectadas en procesos de degradación de las paredes celulares están las β -glucanasas, que actúan hidrolizando celulosa [10]. Este tipo de enzimas y otras que participan en la desarticulación de la estructura de las paredes celulares, pueden provenir intrínsecamente de los tejidos debido a un proceso propio de la planta o pueden ser producidas por algún organismo invasor, como hongos, incluso secretadas directamente dentro de los tejidos, como en el caso de insectos herbívoros, como áfidos y orugas de Lepidópteros [8]. Además, hay antecedentes sobre actividades enzimáticas presentes en otros tipos de chinches que inyectan saliva toxica y producen daños en los tejidos [11], al igual que lo hace *N. viridula*. Los resultados obtenidos en este trabajo indicarían la presencia de actividad para β -glucanasa en la saliva de chinche. Si bien esta actividad es la más evidente, se observa que podría haber degradación de otros polisacáridos componentes (Figura 4.3), aunque en pequeña proporción. Es de destacar que se esperaba una importante degradación de pectinas que no se observó, ya que la disminución en el contenido de ácidos urónicos fue muy poca, a pesar de que se ha

reportado la susceptibilidad de las pectinas presentes en semillas por actividad poligalacturonasa y/o ramnogalacturonano-hidrolaza [14][15]

La acción de la saliva sobre el tegumento es un poco diferente. Aunque se observa degradación de celulosa, esta es menor, en cambio, la pérdida de ácidos urónicos es levemente mayor. El primer hecho podría justificarse por la menor accesibilidad de las enzimas de la saliva a la celulosa en el tegumento que en el RIA.

Se conoce la presencia de enzimas endógenas que hidrolizan las cadenas de polisacáridos de pared cuando son activadas, si no se adopta un paso de desactivación de estas enzimas [16][17] cuando se prepara el material, como es el tratamiento con etanol para obtener el RIA; este efecto se ha observado trabajando con semillas de soja [16]. En el caso del ensayo con tegumento, este material solamente fue molido y no hubo una extracción etanólica, tampoco desactivación por calor, previo al tratamiento enzimático, por lo que se podría especular que la disminución del contenido en monosacáridos constituyentes (Figura 4.3) podría provenir de un efecto enzimático endógeno, en el momento que el material es sumergido en el buffer fosfato (pH 7) durante 16 h [17].

Tratamientos con saliva de chinche

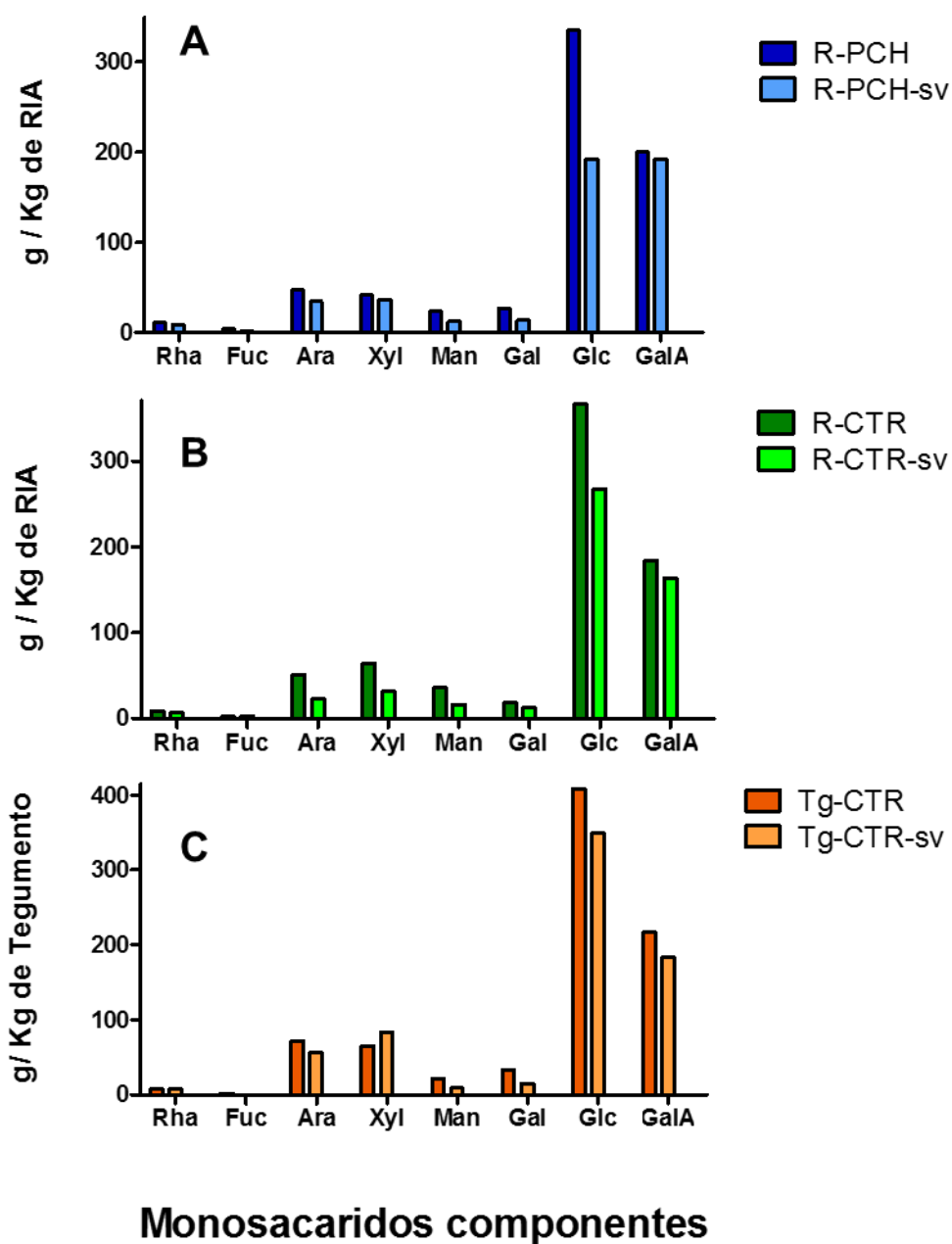


Figura 4.3: Monosacáridos constituyentes de RIA y tegumento antes y después del tratamiento con saliva de chinche verde. A: R-PCH; B: R-CTR y C: Tg-CTR

Hasta ahora, no se había encontrado actividad de β -glucanasa en la saliva de la chinche verde *N. viridula*. En este trabajo de tesis, se determinó esta actividad por el análisis de los cambios en polisacáridos de pared celular y no con el uso de herramientas de biología molecular, como para otras actividades degradativas. [18]

Se analizaron los azúcares que provenían de los fragmentos de las cadenas degradadas recuperadas en un sistema de diálisis cerrado, utilizando tubos de corte de peso molecular de 3.500 Da (oligosacáridos de menos de 20 unidades). Se pudo registrar la presencia de arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, ácido galacturónico y glucosa, tanto para R-CTR-sv como para R-PCH-sv. Estos resultados corresponden al contenido de material degradado por el efecto de la saliva. Sería interesante profundizar esta línea para poder correlacionar las proporciones de las cadenas recuperadas con la disminución de las cantidades de los diferentes polisacáridos degradados.

Los resultados sugieren la degradación de varios tipos de polisacáridos, además de glucosa proveniente de celulosa, que se encontró en menor proporción que lo esperado, como homogalacturonanos, galactomananos, arabinanos y xiloglucanos por parte de las enzimas presentes en la saliva de la chinche.

Se observa recuperación de manosa, lo que podría indicar algún tipo de actividad de β -mananasa en la saliva de chinche. Se ha demostrado que la presencia de β -mananasa es efectiva para degradar componentes de pared en otras especies de leguminosas [19] y obtener nutrientes más disponibles para su eficiencia alimentaria. En todas las muestras tratadas con saliva se ve una disminución de más de 50% en el contenido de Man respecto a los residuos originales.

Se puede ver también en la Figura 4.3 B, la disminución de los contenidos de Ara Gal y Xyl de los residuos tratados con saliva, atribuibles al efecto de las enzimas presentes, mientras que en el análisis del sistema de diálisis posterior a la digestión se ve recuperación de estos monosacáridos (Ara, Gal y Xyl). Los resultados del efecto de la degradación de los polisacáridos por parte de la saliva en R-PCH parecieran ser más intensos que en R-CTR, sin embargo, es importante considerar las estimaciones de polisacáridos completa para estos residuos insolubles en alcohol respecto al total de pared celular.

4.5.2 Extracción secuencial acortada de las muestras tratadas enzimáticamente

A partir de los residuos insolubles en alcohol R-CTR y R-PCH se desarrolló una extracción secuencial acortada (Tabla 4.2), similar a la descrita por Moore et al. [20], con algunas modificaciones, como se muestra en la Figura 4.2.

Se caracterizaron los extractos y los resultados obtenidos dan cuenta de la separación producida a medida que aumenta la concentración alcalina del medio acuoso de extracción. Si bien existen diferencias en las proporciones, los extractos obtenidos con Na_2CO_3 0,05 M (R3T) se componen principalmente de HG y en menor proporción RGI, como se deduce por su alto contenido de GalA y Rha, respectivamente. Los extractos que se obtuvieron con 4 M de KOH (R5T) se componen de cadenas de HG y RGI, que estarían unidas mas fuertemente a las paredes celulares, con gran proporción de arabinanos, lo que se infiere de su alto contenido de Ara. Aparecen cantidades menores de hemicelulosas, evidenciadas por el aumento en el contenido de Xyl y Man respecto de los extractos RT3. El residuo final (R6T) obtenido en cada una de las muestras tratadas mostró alto contenido de Glc lo que indica la presencia de celulosa. Además, se obtuvieron HG muy poco solubles o que interaccionan fuertemente en estos residuos.

Para entender mejor los resultados obtenidos, se realizó la estimación de los tipos de polisacáridos presentes en cada extracto, según las proporciones de monosacáridos que conforman cada uno [21]–[23] y tomando en consideración la caracterización de los tegumentos realizada en el Capítulo 3. En los extractos R3T, se obtuvo Glc y que podría corresponder a almidón [24]. Los resultados de la estimación se presentan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4: Estimación de la composición de los diferentes extractos y del residuo final de la extracción secuencial de RIA tratado con saliva de chinche (sv) y poligalacturonasa (PG), expresados como porcentajes molares.

Extracto	HG	RGI	GM	Glucanos/Xilanos		
				XG ^a	GX	celulosa
Extracto con 0,05 M de Na ₂ CO ₃						
R3T-CTR-PG	77	10	2	2	-	-
R3T-PCH-PG	84	11	1	2	-	-
R3T-CTR-sv	87	7	2	2	-	-
R3T-PCH-sv	66	18	3	2	-	-
Extracto con 4 M de KOH						
R5T-CTR-PG	54	25	7	9	5	-
R5T-PCH-PG	41	35	4	18	2	-
R5T-CTR-sv	47	30	4	13	6	-
R5T-PCH-sv	27	40	4	13	16	-
Residuo final						
R6T-CTR-PG	23	2	3	-	12	60
R6T-PCH-PG	37	3	2	-	8	50
R6T-CTR-sv	31	3	2	-	13	51
R6T-PCH-sv	48	3	2	-	7	39

^aXilosa podría provenir también de xilogalacturonanos (XGA) [25].

Se observa cómo se distribuyen y van variando los polisacáridos de pared respecto a cada extracto de la secuencia extractiva. Estos resultados pueden compararse con los extractos originales obtenidos en la extracción secuencial desarrollada para tegumentos (Capítulo 3).

Para los resultados obtenidos por tratamiento de los RIA con PG, se calculó el total de homogalacturonanos obtenidos en cada fracción, según su rendimiento y contenido total de hidratos de carbono de cada extracto. En la Tabla 4.5 se muestra el total de HG obtenido en la extracción secuencial de tegumentos de soja (Tabla 3.18, Capítulo 3) y se compara con el total de HG obtenidos en la extracción secuencial acortada para el tratamiento con PG por cada 100g de RIA de cada tratamiento y control.

Tabla 4.5: Estimación de los contenidos de homogalacturonanos totales obtenidos mediante el tratamiento enzimático con PG, expresados en g/100g de RIA.

Extractos originales	g /100g de RIA			Tratamiento PG	g /100g de RIA		
	CTR	PCH	TSA		CTR-PG	PCH-PG	TSA-PG
HG (1T+2T+3T)	5,73	6,73	6,20	R3T	2,68	3,27	2,52
HG (4T+5T)	1,74	1,29	1,73	R5T	3,07	1,60	1,11
HG 6T	4,52	3,29	3,88	R6T	5,76	6,34	6,83
Total	11,99	11,31	11,82	Total	11,52	11,22	10,46

La estimación se realizó en base al porcentaje respecto al total de hidratos de carbono y al rendimiento obtenido de cada fracción. Se observa que no hay diferencias en el total de HG entre los residuos originales y los tratados con PG. Cada RIA de los tegumentos es principalmente pared celular que se encuentra interaccionando de diversas maneras con todos sus componentes que, una vez obtenidos y secados, se vuelven material insoluble (fibra) [26]. Los polisacáridos que se encuentran formando la estructura de la pared, comienzan el proceso de desmontaje y la degradación de las estructuras, una vez que se someten a las diferentes extracciones y tratamientos para su posible estudio. Sin embargo, en estas condiciones, es posible que las cadenas no se encuentren disponibles, ni en solución, lo que haría más difícil o, incluso imposibilitaría su digestión enzimática [27], y podría ser por ello no se vieron efectos importantes en las degradación de RIA con PG, respecto a los residuos originales de tegumento.

También, se observa la diferencia en la distribución de los HG a través de ambas secuencias extractivas. Estas diferencias podrían deberse a que la extracción en pocos pasos no es eficiente y por eso se extrae menor cantidad en las primeras etapas y que, además, habría una cierta proporción de HG que se extraen exclusivamente con CDTA (2T), ya que la disminución en el contenido de HG de RT3 respecto a HG (1T+2T+3T), se ve reflejada en el aumento de los HG en los residuos finales de R6T de todas las

muestras. Además, la extracción con CDTA logra obtener los homogalacturonanos de manera intacta debido a la neutralidad del medio extractivo [28].

De igual manera, se desarrolló un análisis para los residuos tratados con saliva de chinche, pero incluyendo todos los polisacáridos presentes. En la Tabla 4.6, se ve claramente cómo varían algunos de los polisacáridos presentes. El contenido de celulosa de todas las muestras tratadas con saliva disminuye respecto de los RIA originales cuando se considera el porcentaje total de celulosa en cada residuo. En las muestras CTR, la celulosa disminuye su contenido en peso, mientras que para PCH, este valor se mantiene casi constante. Este resultado indicaría que la saliva de chinche aplicada sobre los residuos insolubles en alcohol degradaría celulosa y tendría actividad β -glucanasa como respuesta enzimática. Este resultado coincide con los obtenidos en la sección 4.4.1, donde se observó la degradación del contenido de Glc (celulosa) presente en RIA. La actividad de β -glucanasa ha sido reportada en muchos sistemas vegetales, tanto para patógenos, como para insectos elicitores (herbivoría).

En estos estudios se determinó que la pared celular era degradada con el fin de obtener nutrientes por parte de los organismos externos, tal como el ataque de la chinche [11][29]. Si bien existen estudios metabólicos de muchas chinches de la familia Pentatomidae (Hemiptera) y sus mecanismos de herbivoría, no se ha estudiado hasta este trabajo de tesis el efecto directo de la saliva de chinche verde *N. viridula* en polisacáridos de paredes celulares de tegumentos, ni la actividad β -glucanasa como factor fundamental en su degradación.

También, se observó la disminución de los contenidos de galactomananos como producto de acción de la saliva de chinche, tanto para CTR como para PCH. Existen en bibliografía reportes sobre actividades de mananasas como efecto de ataques de patógenos y/o herbívoros [30]. Las β -mananasas son enzimas que cataliza la hidrólisis de enlaces manosídicos β -(1 $\rightarrow$ 4) en forma aleatoria [31], por lo que la saliva de chinche podría incluir estas enzimas en sus efectos de degradación de paredes, esta posibilidad no había sido considerada hasta el momento para *N. viridula*.

Tabla 4.6: Estimación de los polisacáridos de los tratamientos y control para tegumentos, originales y digeridos con saliva de chinche (sv) en g/100g de RIA

Tratamiento	g /100g de RIA					
	HG (%) ¹	RGI (%)	GM (%)	Glucanos/Xilanos		
				XG (%)	GX (%)	Celulosa (%)
R-CTR	12,0 (26,9)	3,4 (7,6)	3,5 (7,8)	0,4 (0,8)	2,8 (6,2)	22,6 (50,7)
R-CTR-sv	12,8 (40,1)	2,6 (8,1)	0,7 (2,4)	0,8 (2,4)	3,3 (10,4)	11,7 (36,7)
R-PCH	11,3 (35,0)	2,6 (8,1)	1,8 (5,6)	0,4 (1,3)	1,6 (4,8)	14,6 (45,2)
R-PCH-sv	21,4 (47,3)	3,5 (7,8)	1,0 (2,3)	0,7 (1,5)	3,5 (7,7)	15,1 (33,4)

¹Entre paréntesis se muestra el porcentaje que aporta cada tipo de polisacárido respecto al total de cada residuo.

Por otro lado, no se observan cambios importantes en el contenido de Rha de los RGI, pero sí en el de Ara que conforma los arabinanos ramificados de las cadenas laterales de RGI, que suelen ser muy abundantes en paredes de semillas oleaginosas y leguminosas [32]. La α -arabinasa corta los enlaces α -(1→5) de cadenas de L-Araf en los procesos de modificación de las pectinas de paredes de leguminosas [13]. Los resultados en la disminución del contenido total de RGI, posterior a los tratamientos con saliva podrían indicar que ésta posee actividad α -arabinasa.

4.6 Conclusiones

Se logró degradar parcialmente los polisacáridos de las paredes celulares de los RIA por acción de saliva de chinche, lo que evidencia su actividad sobre los polisacáridos de tegumentos. Este estudio prueba que, como consecuencia del ataque de chinches, se producen cambios significativos en las paredes celulares, que pueden medirse a través de la caracterización química de los hidratos de carbono de paredes celulares presentes en los RIA.

Además, la diferente degradación sufrida por los residuos tratados con saliva sugiere diferencias en la reestructuración de la pared celular de tegumentos como consecuencia del daño ocasionado por las chinches en el caso de los tegumentos de las semillas picadas por chinches. A medida que los polisacáridos de pared de tegumento se van caracterizando, se van encontrando disponibles (solubilizados) diferentes tipos de polisacáridos al momento de cada degradación o proceso, lo cual indicaría que los efectos de las inducciones son aditivos (picadura de la chinche y posterior tratamiento con saliva), viéndose en los resultados de cada RIA variaciones diferentes en los polisacáridos medidos.

Las actividades enzimáticas principales que sugiere este estudio para la saliva de la chinche verde *N. viridula* son: β -Glucanasa, β -mananasa y α -arabinasa. Estos resultados evidencian el amplio rango de actividad enzimática que presenta la saliva de chinche para lograr la degradación de las paredes celulares de los tegumentos.

Se observó una disminución de 27 - 25% en la celulosa total obtenida con posterioridad a la extracción secuencial acortada que es atribuida al efecto de la saliva de chinche y la actividad β -glucanasa encontrada. De la misma forma, el contenido total de galactomananos presente en los RIA disminuyó 60% para PCH y 70% para CTR, como resultado de la digestión enzimática de los residuos por el efecto de la actividad β -mananasa atribuida a la saliva de chinche.

No se concluye la efectividad de la PG (E-GALUSP; Megazyme ®) para la degradación de los homogalacturonanos presentes en los residuos R-CTR y R-PCH. En esta misma línea, no se observó actividad de enzimas que degradan homogalacturonanos en la saliva.

Una posible explicación para este efecto es que, según lo informado en bibliografía, los estudios proteómicos de la saliva de la chinche [8], los principales componentes encontrados entre las proteínas de saliva serían enzimas hidrolasas (15%), mientras 56% de las proteínas de la saliva de chinche no tiene una función especificada aun, por lo que alguna de estas proteínas podría ejercer una función coadyuvante para el proceso de hidrolisis enzimática dejando más disponibles los polisacáridos para su degradación. Este posible efecto no se vería en los tratamientos con PG y entonces podría ser una de las razones por las cuales no observaron efectos de degradación de HG. Se ha estudiado en áfidos que el fluido salival que contiene enzimas y proteínas ayudan a la digestión de los nutrientes vegetales de los cuales se alimentan [33] y en el caso de *N. viridula* se han encontrado a través de ontología génica efectos similares en proteínas presentes en la saliva secretada que reflejan las capacidades digestivas altamente evolucionadas de *N. viridula*. [34].

4.7 Bibliografía

- [1] I. S. Middelbos and G. C. Fahey, "Soybean Carbohydrates," in *Soybeans. Chemistry, Production, Processing, and Utilization*, 1st ed., L. A. Johnson, P. J. White, and R. Galloway, Eds. Illinois: Edward Elgar Publishing, 2008, pp. 1–910.
- [2] A. Redondo-Cuenca, M. J. Villanueva-Suárez, M. D. Rodríguez-Sevilla, and I. Mateos-Aparicio, "Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*)," *Food Chem.*, vol. 101, no. 3, pp. 1216–1222, 2006.
- [3] B. Romero, F. M. Dillon, and J. A. Zavala, "Different soybean cultivars respond differentially to damage in a herbivore-specific manner and decrease herbivore performance," *Arthropod. Plant. Interact.*, vol. 14, no. 1, pp. 89–99, 2020.
- [4] M. Peiffer and G. W. Felton, "Insights into the saliva of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae)," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, 2014.
- [5] R. Giacometti, N. Ilina, P. A. Eduardo, and J. A. Zavala, "Stink bug *Nezara viridula* sustains late MAPKs phosphorylation status and induces expression of genes related with cell wall rearrangement in developing soybean seeds," *Arthropod. Plant. Interact.*, vol. 12, no. 4, pp. 531–541, 2018.
- [6] R. A. Depieri and A. R. Panizzi, "Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (heteroptera: pentatomidae)," *Neotrop. Entomol.*, vol. 40, no. 2, pp. 197–203, 2011.
- [7] S. C. Fry, *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*, 18a ed. Harlow, Essex.: Longman Scientific & Technical, 1988.
- [8] R. Giacometti, V. Jacobi, F. Kronberg, C. Panagos, A. S. Edison, and J. A. Zavala, "Digestive activity and organic compounds of *Nezara viridula* watery saliva induce defensive soybean seed responses," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12, 2020.
- [9] D. Cantu *et al.*, "The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 3, pp. 859–864, 2008.
- [10] D. A. Brummell, V. Dal Cin, C. H. Crisosto, and J. M. Labavitch, "Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit," *J. Exp. Bot.*, vol. 55, no. 405, pp. 2029–2039, 2004.
- [11] I. O. Ozdemir, O. Karakaya, U. Ates, B. Ozturk, and M. Uluca, "Characterization of hazelnut kernel responses to brown marmorated stink bug [*Halyomorpha halys* Stal (Hemiptera : Pentatomidae)] infestations : Changes in bioactive compounds and fatty acid composition," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 124, no. September, p. 105696,

2023.

- [12] M. M. H. Huisman, H. A. Schols, and A. G. J. Voragen, "Enzymatic degradation of cell wall polysaccharides from soybean meal," vol. 38, pp. 299–307, 1999.
- [13] K. H. Caffall and D. Mohnen, "The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides," *Carbohydr. Res.*, vol. 344, no. 14, pp. 1879–1900, 2009.
- [14] C. G. Biliaderis and M. S. Izydorczyk, *Functional Food Carbohydrates*, 1st Edditi. New York: CRC Press, 2007.
- [15] Z. Burkus and F. Temelli, "Effect of Extraction Conditions on Yield , Composition , and Viscosity Stability of Barley β -Glucan Gum," vol. 75, no. 6, pp. 805–809, 1998.
- [16] F. Yan, S. Tong, J. Zhang, Y. Zhao, and L. Ping, "Mechanism study on the effect of heat shock on the functional characteristics of soybean protein isolate by regulating the change of endogenous enzyme activity in soybeans," *Food Hydrocoll.*, vol. 150, p. 109625, 2024.
- [17] S. De Fátima Viana *et al.*, "Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean α -galactosidase," *Food Chem.*, vol. 93, no. 4, pp. 665–670, 2005.
- [18] S. Liu, P. R. Lomate, and B. C. Bonning, "Tissue-speci fi c transcription of proteases and nucleases across the accessory salivary gland , principal salivary gland and gut of *Nezara viridula*," *Insect Biochem. Mol. Biol.*, vol. 103, no. April, pp. 36–45, 2018.
- [19] C. G. S. Lisboa, P. P. Tonini, M. A. S. Tiné, and M. S. Buckeridge, "Endo- β -mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): Purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth," *Brazilian J. Plant Physiol.*, vol. 18, no. 2, pp. 269–280, 2006.
- [20] J. P. Moore, E. Nguema-Ona, J. U. Fangel, W. G. T. Willats, A. Hugo, and M. A. Vivier, "Profiling the main cell wall polysaccharides of grapevine leaves using high-throughput and fractionation methods," *Carbohydr. Polym.*, vol. 99, pp. 190–198, 2014.
- [21] G. O. Aspinall and J. N. C. Whyte, "Polysaccharides of soy-beans. Part I. Galactomannans from the hulls," *J. Chem. Soc.*, no. 5058, pp. 5051–5057, 1964.
- [22] H. M. M.H., "Elucidation of the chemical fine structure of polysaccharides from soybean and maize kernal cell walls."
- [23] H. V. Scheller and P. Ulvskov, "Hemicelluloses," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 61, pp. 263–289, 2010.
- [24] M. S. Buckeridge, H. Pessoa dos Santos, and M. A. S. Tiné, "Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 38, no. 1–2, pp. 141–156, 2000.
- [25] G. O. Aspinall, K. Hunt, and I. M. Morrison, "Polysaccharides of Soy-beans. Part II. Fractionation of Hull Cell-wall Polysaccharides and the Structure of a Xylan," *J.*

- Chem. Soc.*, pp. 1945–1949, 1966.
- [26] W. J. Mullin and W. Xu, “A study of the intervarietal differences of cotyledon and seed coat carbohydrates in soybeans,” *Food Res. Int.*, vol. 33, no. 10, pp. 883–891, 2000.
- [27] S. Posé *et al.*, “A nanostructural view of the cell wall disassembly process during fruit ripening and postharvest storage by atomic force microscopy,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 87, no. August 2017, pp. 47–58, 2019.
- [28] J. U. Fangel, C. Y. Jones, P. Ulvskov, J. Harholt, and W. G. T. Willats, “Analytical implications of different methods for preparing plant cell wall material,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 261, no. October 2020, p. 117866, 2021.
- [29] D. Cantu, A. R. Vicente, J. M. Labavitch, A. B. Bennett, and A. L. T. Powell, “Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility,” *Trends Plant Sci.*, vol. 13, no. 11, pp. 610–617, 2008.
- [30] M. Hrmova, R. A. Burton, P. Biely, J. Lahnstein, and G. B. Fincher, “Hydrolysis of (1,4)- β -D-mannans in barley (*Hordeum vulgare* L.) is mediated by the concerted action of (1,4)- β -D-mannan endohydrolase and β -D-mannosidase,” *Biochem. J.*, vol. 399, no. 1, pp. 77–90, 2006.
- [31] S. Singh, G. Singh, and S. K. Arya, “Mannans: An overview of properties and application in food products,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 119, pp. 79–95, 2018.
- [32] H. H. Ding, S. W. Cui, H. D. Goff, J. Chen, and Q. Wang, “Arabinan-rich Rhamnogalacturonan-I from Flaxseed Kernel cell wall,” *Food Hydrocoll.*, vol. 47, pp. 158–167, 2015.
- [33] S. Pavithran, M. Murugan, J. Mannu, H. Yogendra, K. Balasubramani, V. Sanivarapu, S. Harish, and S. Natesan, “Identification of salivary proteins of the cowpea aphid *Aphis craccivora* by transcriptome and LC-MS/MS analyses,” *Insect Biochem. Mol. Biol.*, vol. 165, p. 104060, 2024.
- [34] S. Liu, P. R. Lomate, and B. C. Bonning, “Tissue-specific transcription of proteases and nucleases across the accessory salivary gland, principal salivary gland and gut of *Nezara viridula*,” *Insect Biochem. Mol. Biol.*, vol. 103, pp. 36–45, 2018.

CAPÍTULO 5

Cambios en las paredes celulares de cotiledones
de semillas de soja de la variedad Williams.

5.1 Introducción

Las espermatofitas son un grupo del reino vegetal que se caracterizan por generar la formación de semillas. Una semilla generalmente viene con todo lo que necesita para la germinación y el crecimiento vegetal, requiriendo solamente la temperatura adecuada, agua y oxígeno del medio ambiente para transformarse en plántula. Además, en muchos casos, la semilla, más propiamente, el embrión, ejerce su propio control sobre la germinación [1].

Las semillas de soja, al igual que el resto de las dicotiledóneas, poseen un par cotiledones, el tegumento que las cubre, y el hipocótilo. Los cotiledones representan aproximadamente el 90% del peso total de la semilla. La composición química de los polisacáridos que componen las paredes celulares de cotiledones son fundamentalmente diferentes que las de tegumentos, ya que ambas estructuras tienen funciones diferentes [2], como ya se describió en el Capítulo 1. En los cultivos industriales de soja, los ataques de herbívoros sobre las semillas pueden producir disminuciones de los rendimientos al momento de cosechar, como consecuencia del daño que producen sobre los tejidos y, específicamente, sobre las semillas que se encuentran en desarrollo, en el estadio reproductivo conocido como R5. Esto puede causar aborto de las semillas, lo que se traduce como pérdida de su calidad comercial. Los insectos fitófagos usan el estilete de su aparato bucal para penetrar las semillas y alimentarse extrayendo nutrientes. Blanco et al. [3] estudiaron cómo la penetración del estilete del pulgón *Myzus persicae* a través de la matriz de la pared celular induce cambios en sus polímeros constituyentes. Específicamente, el estilete le permite atravesar las paredes celulares hasta alcanzar los haces vasculares, perforando elementos cribosos para succionar los nutrientes transportados por el floema [3]. Otro tipo de herbívoro es la chinche verde, que también pica las semillas de soja y se alimenta de los nutrientes. Durante el periodo de crecimiento de las vainas, la secreción oral de las chinches es el primer fluido que entra en contacto con la planta. Los efectores que causan la actividad y degradación sobre los cotiledones pueden inyectarse directamente en el tejido, junto con la saliva [4].

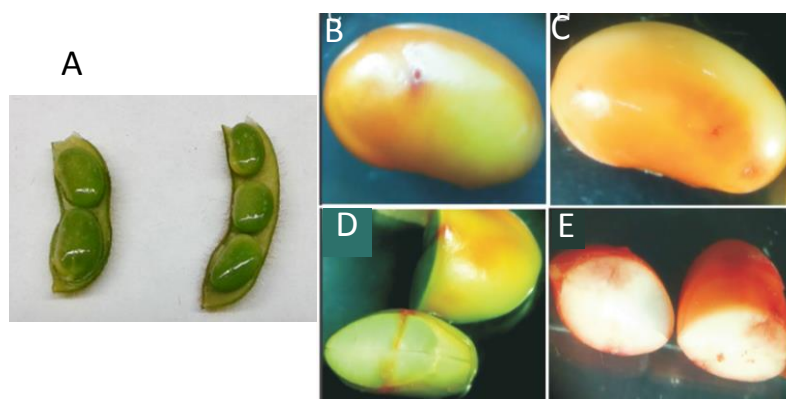


Figura 5.1: Semillas y cotiledones de soja cosechados en R6. **A:** semillas sanas. **(B, D)** cotiledones afectados por daño mecánico (aguja). **(C, E):** cotiledones inducidos por la picadura de la chinche verde.

Debido a que la chinche verde es un comensal generalista, su manejo ambiental como plaga no puede enfocarse en un sistema de cultivo específico de forma restringida. Es por ello, que se plantea el objetivo de desarrollar el mejoramiento vegetal para los cultivos de soja a través de un punto de vista ecológico. En esta investigación se busca identificar específicamente qué polisacáridos de paredes celulares de cotiledón han sido modificados por la picadura de la chinche, si es que los hubiera. Además, se buscó determinar qué sucede por el tratamiento externo con la hormona ácido salicílico, que actúa mediando la resistencia contra patógenos biotróficos, teniendo efectos a nivel de pared celular, como fue descrito en el Capítulo 1. Esto permitiría la utilización e inducción de las defensas vegetales naturales contra insectos herbívoros, lo que podría aumentar la resistencia del cultivo y podría redundar en la disminución de pesticidas [5].

5.2 Objetivos

- Aislar paredes celulares provenientes de cotiledones de *Glycine max* cultivados a campo y sometidos a los diferentes tratamientos.
- Extraer de las paredes celulares aisladas los diferentes polisacáridos constitutivos de los cotiledones de soja a través de una extracción secuencial, obteniendo extractos enriquecidos en pectinas, hemicelulosas y un residuo final rico en celulosa.

- Realizar la elucidación estructural fina de los polisacáridos aislados y comparación de sus proporciones y estructuras.
- Encontrar diferencias estructurales y cuantitativas en la composición de los polisacáridos de paredes celulares de cotiledón, con el fin de entender los posibles efectos de la inducción por herbivoría y poder tener una perspectiva más profunda de la interacción planta-insecto, específicamente, entre chinche y soja.

5.3 Obtención de los cotiledones

El cultivo de soja se desarrolló a campo durante la temporada 2014-2015, en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Según el proceso descrito (Capítulo 2) se obtuvieron los extractos de cotiledón (C) para las muestras picadas por chinche (PCH), tratadas con ácido salicílico (TSA) y las muestras control (CTR) a lo largo de la extracción secuencial, asignando los números del 0 (RIA) al 6 (residuo final) para cada fracción obtenida.

La extracción secuencial fracciona la pared celular a medida que aumenta la alcalinidad del medio (Figura 5.2). Los grupos de polisacáridos extraídos en cada paso de la extracción secuencial suelen corresponder a los reportados en literatura [6]. Sin embargo, estos pueden cambiar dependiendo de la naturaleza del tejido y la especie extraída.

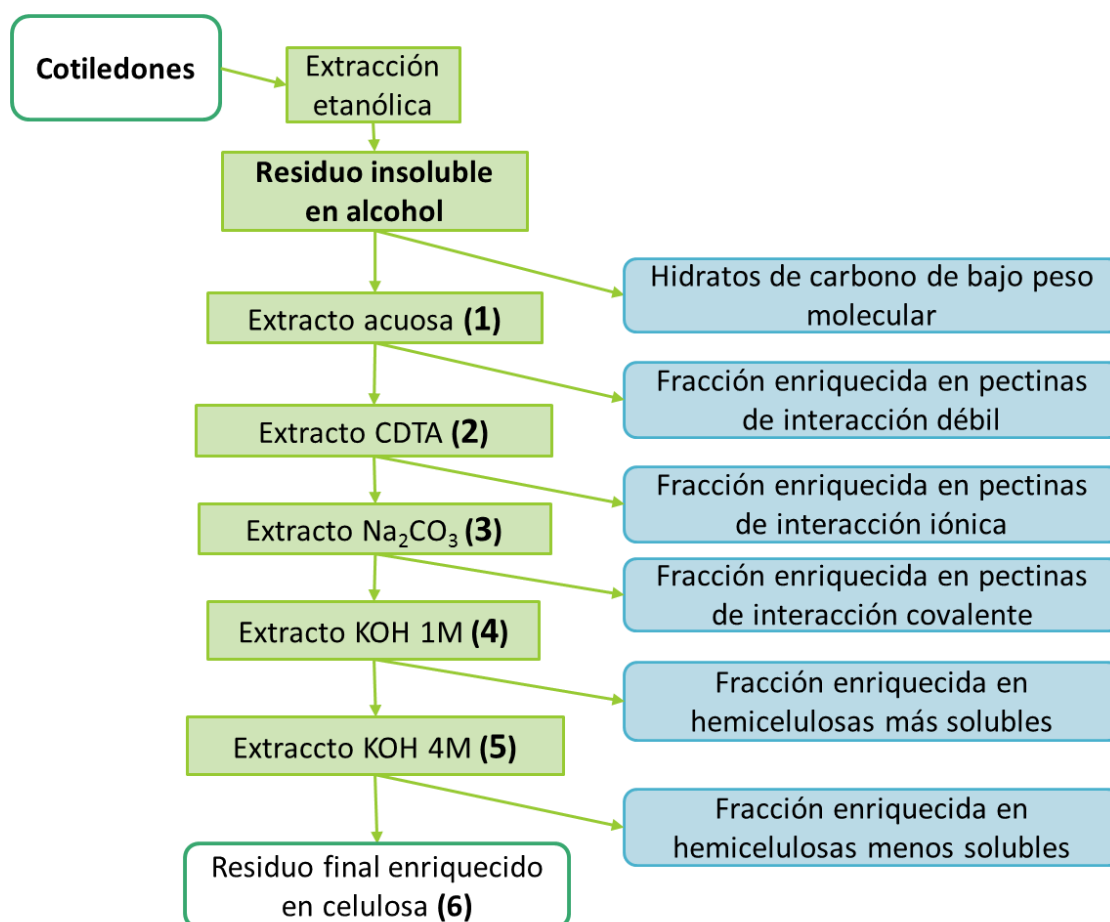


Figura 5.2: Secuencia de extracción de polisacáridos de pared celular de cotiledones de soja. En los cuadros celestes se indica lo que se esperaba encontrar en los extractos correspondientes según la [6]–[8].

5.4 Caracterización química del material

La caracterización química entrega una perspectiva general inicial de la composición de cada extracto. Los rendimientos de las fracciones resultantes de la extracción secuencial (respecto al residuo insoluble en alcohol, RIA) muestran cómo se van distribuyendo los polisacáridos en función del tipo de interacciones a medida que se cambian las condiciones de extracción, de cada uno de los tratamientos y control. Se observan cambios en los monosacáridos constituyentes de cada fracción, mostrando que los polisacáridos que conforman cada una son notablemente diferentes y/o se encuentran en diferentes proporciones. Además, para cada fracción se observan cambios entre tratamientos y las muestras control, tanto en el contenido

de ácidos urónicos como de monosacáridos neutros y la relación molar entre los monosacáridos constituyentes.

El rendimiento total en polisacáridos de pared fue de 8,6 - 9,3 % con respecto al RIA, como se muestra en la Figura 5.3, en la que se observa el total de polisacáridos estructurales de pared de los cotiledones que arrojó cada extracto. En la Figura 5.4 se muestra el total de monosacáridos neutros y además el de ácidos urónicos de cada fracción y muestra.

Polisacáridos totales de pared celular de cotiledón

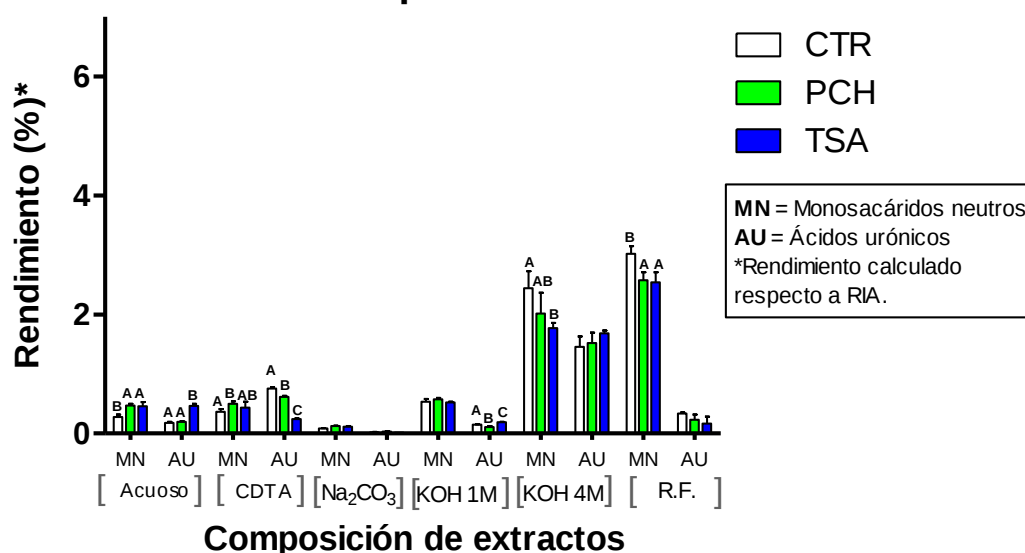


Figura 5.3: Distribución del contenido de monosacáridos neutros y ácidos urónicos en los extractos obtenidos por extracción secuencial de cotiledones de soja.

Polisacaridos de pared de cotiledón

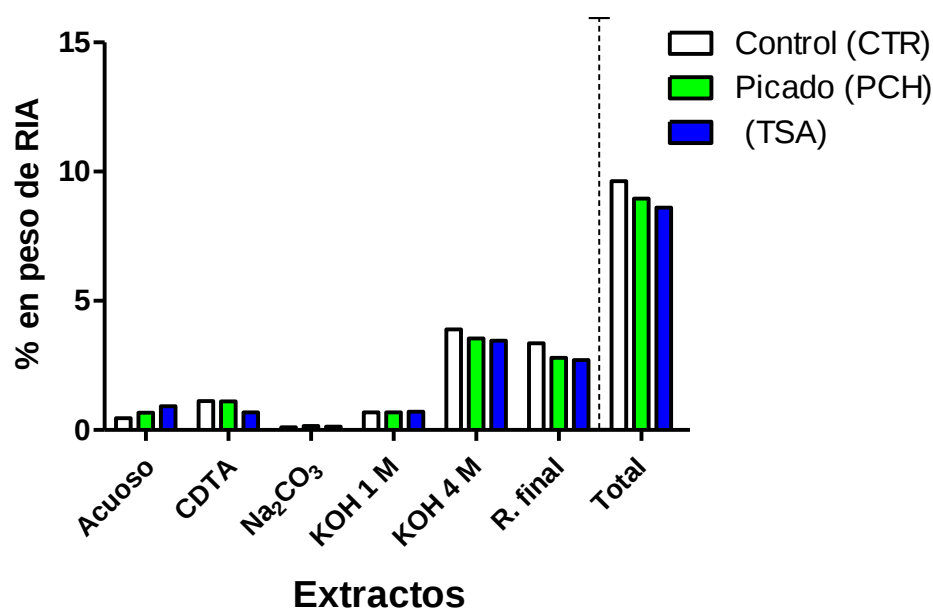


Figura 5.4: Porcentaje de polisacáridos de pared por extracto, respecto al peso total de RIA.

El porcentaje total de ácidos urónicos fue similar para ambos tratamientos y el CTR aumentó levemente (Figura 5.3), mientras que los valores de monosacáridos neutros son inferiores consecutivamente para las paredes celulares de cotiledones de PCH y TSA con respecto a CTR.

En la Figura 5.4 se puede observar con claridad cómo se distribuye el contenido de diferentes monosacáridos de la extracción secuencial, lo que corresponde al perfil de monosacáridos constitutivos de los extractos más importantes respecto a su rendimiento, siendo los extractos KOH 4 M y el residuo final los que presentan los mayores rendimientos.

Una vez obtenidas las fracciones de cada tratamiento y control, se desarrolló la caracterización química general de los polisacáridos obtenidos. Las Tablas 5.1 y 5.2 presentan la composición como porcentaje molar para cada extracto y para el residuo final. En la Figura 5.5 se visualizan los datos correspondientes a los extractos principales.

Tabla 5.1: Caracterización química de los extractos obtenidos por extracción secuencial de los cotiledones de semillas de soja (*Glycine max*), con agua, CDTA, y Na₂CO₃, previamente purificados por digestiones enzimáticas¹.

Muestra	Rend ²	Monosacáridos neutros, moles %						Monosacáridos neutros		Ácidos urónicos		Proteínas
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	estructurales	α-glucanos de reserva	%	Gme ⁴ (%)	
Extracto acuoso tratado con α-amilasa y proteinasa-K												
1C-CTR	3,3	2,1 ±0,3	1,9 ±0,3	12,3 ±2,0	10,3 ±1,8	8,0 ±0,9	65,7 ±6,1	12,1 ±1,0	3,6 ±0,7	5,4 ±0,2	73,4 ±3,5	36,6 ±1,5
1C-PCH	3,7	3,4 ±0,8	2,2 ±0,3	16,0 ±0,1	5,3 ±0,9	6,3 ±0,7	66,3 ±4,4	15,0 ±0,6	2,3 ±0,1	5,3 ±0,5	66,5 ±3,0	34,7 ±2,2
1C-TSA	3,9	5,4 ±0,7	3,2 ±0,6	23,0 ±2,3	6,5 ±1,4	8,2 ±0,6	53,7 ±2,5	14,3 ±1,6	2,5 ±0,4	11,8 ±1,0	31,4 ±0,8	31,3 ±1,0
Extracto de CDTA tratado con α-amilasa												
2C-CTR	3,3	5,3 ±0,4	3,5 ±0,1	34,9 ±0,4	7,7 ±1,5	-	48,7 ±0,4	11,2±0,8	4,3 ±0,3	22,9 ±0,7	16,5 ±2,8	3,1 ±1,0
2C-PCH	3,7	6,2 ±0,3	3,5 ±0,3	32,6 ±1,6	7,5 ±0,6	-	50,1 ±1,3	13,4 ±0,9	6,7 ±0,5	16,6 ±0,5	25,4 ±2,8	5,5 ±0,7
2C-TSA	3,0	6,4 ±0,1	3,5 ±0,3	32,3 ±0,1	7,0 ±0,7	-	50,8 ±0,8	12,4 ±2,5	10,7 ±1,9	8,1 ±0,3	71,8 ±5,3	8,3 ±0,9
Extracto de Na ₂ CO ₃ 0,05M												
3C-CTR	0,9	4,8 ±0,1	2,2 ±0,1	34,6±0,1	5,2 ±0,3	-	53,2 ±0,9	9,6 ±0,2	64,0 ±1,6	2,0 ±0,8		8,0 ±0,1
3C-BD	0,8	4,6 ±0,2	2,6 ±0,1	34,0±0,3	5,2 ±0,2	-	53,6 ±0,1	15,4 ±0,6	51,4 ±2,0	4,0 ±0,3		12,9 ±0,3
3C-TSA	1,4	4,6 ±0,3	3,1 ±0,2	26,2±0,7	9,2 ±0,4	-	56,9 ±0,9	8,0 ±0,1	44,1 ±0,7	1,0 ±0,2		13,3 ±2,1

¹Valor promedio ± desviación estándar (n = 3).²Rendimiento calculado respecto a RIA.³CTR: Control, PCH: picados por chinche y TSA: tratados con SA.⁴Gme: Grado de metilación de los ácidos urónicos.

Tabla 5.2: Caracterización química básica de los extractos obtenidos por extracción secuencial de los cotiledones de semillas de soja (*Glycine max*), con KOH 1M, KOH 4M y residuo final (RF) previamente purificados por digestiones enzimáticas¹.

	Rend ²	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Monosacáridos neutros	Ácidos urónicos	Proteínas ⁴
Extracto de KOH 1M tratado con α-amilasa											
4C-CTR	4,4	2,2 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 0,5	16,7 $\pm$ 3,0	3,8 $\pm$ 1,8	7,5 $\pm$ 0,7	49,3 $\pm$ 4,6	18,8 $\pm$ 1,4	11,6 $\pm$ 0,4	3,4 $\pm$ 0,2	65,4 $\pm$ 0,7
4C-PCH	4,7	1,8 $\pm$ 0,9	1,4 $\pm$ 0,7	14,9 $\pm$ 2,8	3,6 $\pm$ 1,4	5,8 $\pm$ 0,4	46,0 $\pm$ 4,0	26,6 $\pm$ 2,0	12,2 $\pm$ 1,0	2,3 $\pm$ 0,3	70,6 $\pm$ 0,9
4C-TSA	4,5	3,4 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 0,7	27,4 $\pm$ 1,8	4,6 $\pm$ 0,1	5,5 $\pm$ 0,5	50,4 $\pm$ 5,7	7,6 $\pm$ 1,1	12,2 $\pm$ 0,5	4,3 $\pm$ 0,1	66,0 $\pm$ 0,7
Extracto de KOH 4M											
5C-CTR	5,7	4,1 $\pm$ 1,2	3,1 $\pm$ 1,2	25,1 $\pm$ 2,8	6,3 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,4	53,9 $\pm$ 3,2	6,9 $\pm$ 2,0	42,8 $\pm$ 3,2	24,8 $\pm$ 3,0	8,7 $\pm$ 0,2
5C-PCH	6,9	3,1 $\pm$ 0,7	2,3 $\pm$ 0,4	25,0 $\pm$ 3,4	7,4 $\pm$ 1,1	0,7 $\pm$ 0,6	51,1 $\pm$ 3,3	10,1 $\pm$ 1,6	32,2 $\pm$ 3,0	26,9 $\pm$ 3,0	12,0 $\pm$ 0,5
5C-TSA	6,6	4,6 $\pm$ 1,0	3,6 $\pm$ 0,7	40,1 $\pm$ 4,7	9,5 $\pm$ 1,0	1,4 $\pm$ 0,2	32,7 $\pm$ 3,3	8,8 $\pm$ 1,1	28,3 $\pm$ 0,7	26,4 $\pm$ 0,8	11,3 $\pm$ 0,7
Residuo final											
6C-CTR	2,6	0,5 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,0	4,0 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,7	6,9 $\pm$ 0,3	78,3 $\pm$ 0,8	53,0 $\pm$ 2,7	5,9 $\pm$ 1,2	11,4
6C-PCH	2,6	0,4 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	3,1 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,2	6,2 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,2	83,0 $\pm$ 0,4	45,2 $\pm$ 3,3	4,0 $\pm$ 0,3	17,6
6C-TSA	2,7	0,1 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,9	2,3 $\pm$ 0,5	11,0 $\pm$ 0,8	3,7 $\pm$ 0,7	80,3 $\pm$ 2,5	44,6 $\pm$ 1,5	2,9 $\pm$ 0,2	18,4

¹Valor promedio $\pm$ desviación estándar (n = 3).² Rendimiento calculado respecto a RIA.³ CTR: Control, PCH: picados por chinche y TSA: tratados con SA.⁴ Valores de proteínas por método de Lowry, salvo para el caso de los residuos 6C, para los cuales se obtuvieron del contenido de nitrógeno (microanálisis elemental).

Pared celular de cotiledon

□ Control (CTR)
 ■ Herviboría (PCH)
 ■ Trat. salicílico(TSA)

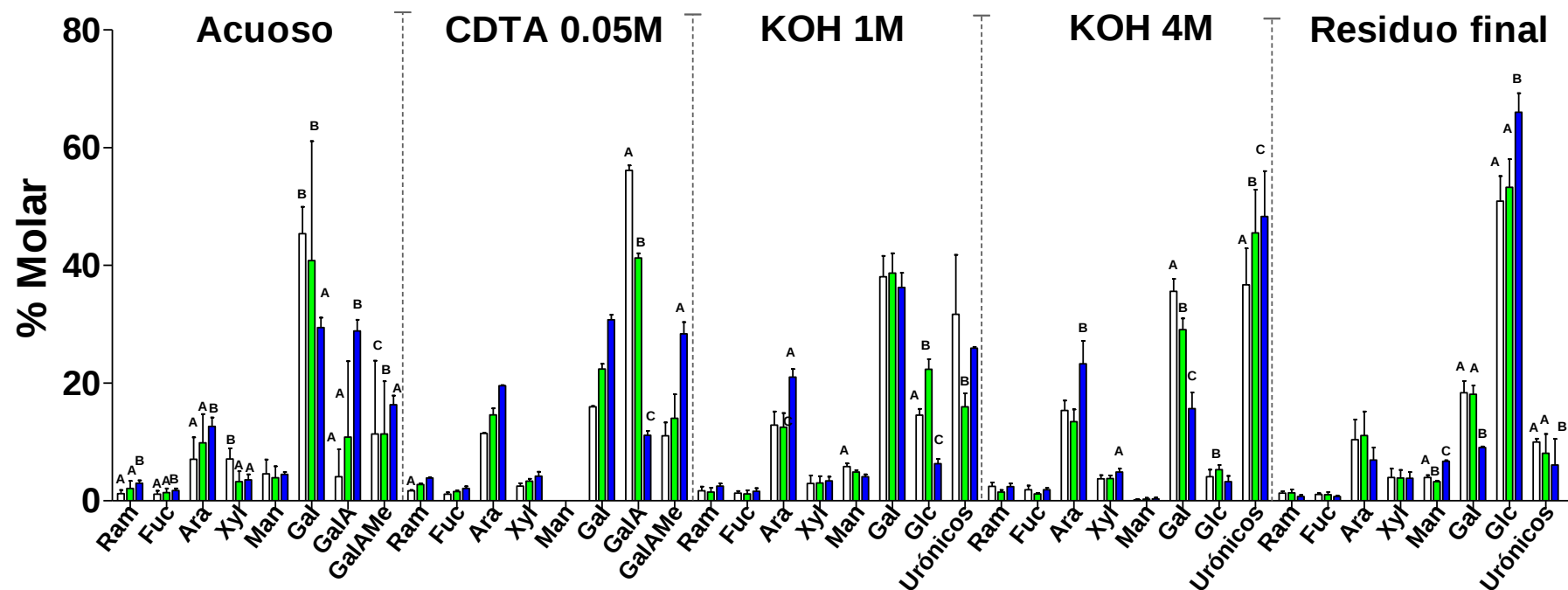


Figura 5.5: Distribución de los monosacáridos constituyentes de los extractos con mayores rendimientos obtenidas a través de la extracción secuencial de cotiledones de soja. Valor promedio $\pm$ desviación estándar ($n = 3$). Las medidas con una letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$).

A medida que cambia el medio de extracción, se observan cambios en la composición y solubilidad de los polisacáridos fraccionados. Los rendimientos mayores en polisacáridos de pared se encontraron en el extracto obtenido con KOH 4 M con muy altos contenidos de Ara, Gal y GalA, y en el residuo final, con Glc como monosacárido mayoritario. Además, se observó que todos los extractos contienen cantidades importantes de Ara y Gal en diferentes proporciones.

El extracto acuoso mostró diferencias significativas en el contenido y grado de esterificación (Gme) con grupos metilo de los ácidos urónicos entre CTR y ambos tratamientos. El extracto de CDTA presentó también diferencias significativas en cuanto a los ésteres metílicos de ácidos urónicos, pero sólo en TSA con respecto a PCH y CTR.

En los extractos con CDTA, se observó una disminución en el contenido de GalA y un aumento en el grado de metilación para PCH, y mas importante para TSA respecto a CTR. No se observaron diferencias en la composición en monosacáridos neutros. Por otro lado, en los extractos de KOH 4M se encontraron diferencias en los porcentajes molares de Ara y Gal en PCH versus CTR. Estas diferencias son más importantes para TSA (relación Ara:Gal: 1,0:2,3 y 1,0:0,7 para CTR y TSA, respectivamente).

En cuanto al residuo final (6C), se obtuvo un alto contenido de Glc, alrededor del 60% del total de hidratos de carbono, tanto para CTR como para PCH y TSA, esto indicaría que el residuo de la extracción es rico en celulosa, insoluble incluso en condiciones de álcali concentrado [9]. Esta fracción es también llamada fibra cruda, y el total de celulosa presente en cotiledones fue obtenido en el residuo final debido a su alta insolubilidad.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de fenólicos totales, ni lignina (Tabla 5.3). En el caso de la determinación de hidroxiprolina, en la Tabla 5.4 se vio un aumento considerable del contenido para tanto para PCH y TSA, respecto a CTR, tanto para los extractos 1T, con un aumento

de más del doble de su contenido, como para los residuos 6T en los que aumentó para PCH y TSA aproximadamente 20% respecto a CTR.

Tabla 5.3: Contenido fenólico total y porcentaje de lignina (Klason) de cotiledones de soja, calculados sobre RIA. CTR: control, PCH: picado por chinches y TSA: tratados con ácido salicílico¹.

Muestra	Compuestos fenólicos totales mg ácido gálico/g pared celular	Lignina %
0C - CTR	9,2 ± 0,1	3,9 ± 1,0
0C - PCH	10,3 ± 0,2	5,1 ± 2,1
0C - TSA	9,5 ± 0,2	4,3 ± 1,2

¹Valor promedio ± desviación estándar (n = 3).

Tabla 5.4: Contenido (%) de hidroxiprolina de los cotiledones de semillas de *Glicine max*. Control (CTR), muestras picadas por chinche (PCH) y muestras pulverizadas con ácido salicílico (TSA).

Muestras	Hidroxiprolina (%)
1C - CTR	1,6 ± 0,2
1C - PCH	3,8 ± 0,4
1C - TSA	3,4 ± 0,4
6C - CTR	3,3 ± 0,3
6C - PCH	4,4 ± 0,4
6C - TSA	4,0 ± 0,3

¹Valor medio ± desviación estándar (n = 3).

En los extractos acuosos se logró determinar, a través de espectroscopía de RMN, desplazamientos correspondientes a los arabinanos, galactanos y señales pequeñas correspondientes a GalA y Rha. En el espectro para 1C-TSA (posterior a

purificación enzimática), mostrado en Figura 5.6, se pudieron identificar señales características para la zona anomérica de al menos 4 grupos importantes de polisacáridos de pared, incluidos los arabinanos y galactanos mencionados, además de identificarse presencia de galactomananos con cadenas principales de β -D-Manp unida por 4 (101,3/4,81ppm $^{13}\text{C}/^1\text{H}$), y una α -D-Galp terminal (99,7/4,96ppm $^{13}\text{C}/^1\text{H}$) ramificada en posición 6 [10]. El otro grupo de señales anoméricas encontradas en los espectros corresponde a cadenas pectínicas, como HG y RGI con unidades α -D-Rhap unida por 2 y α -D-GalpA unido por 4, con algunas unidades esterificadas por grupos metoxilo.

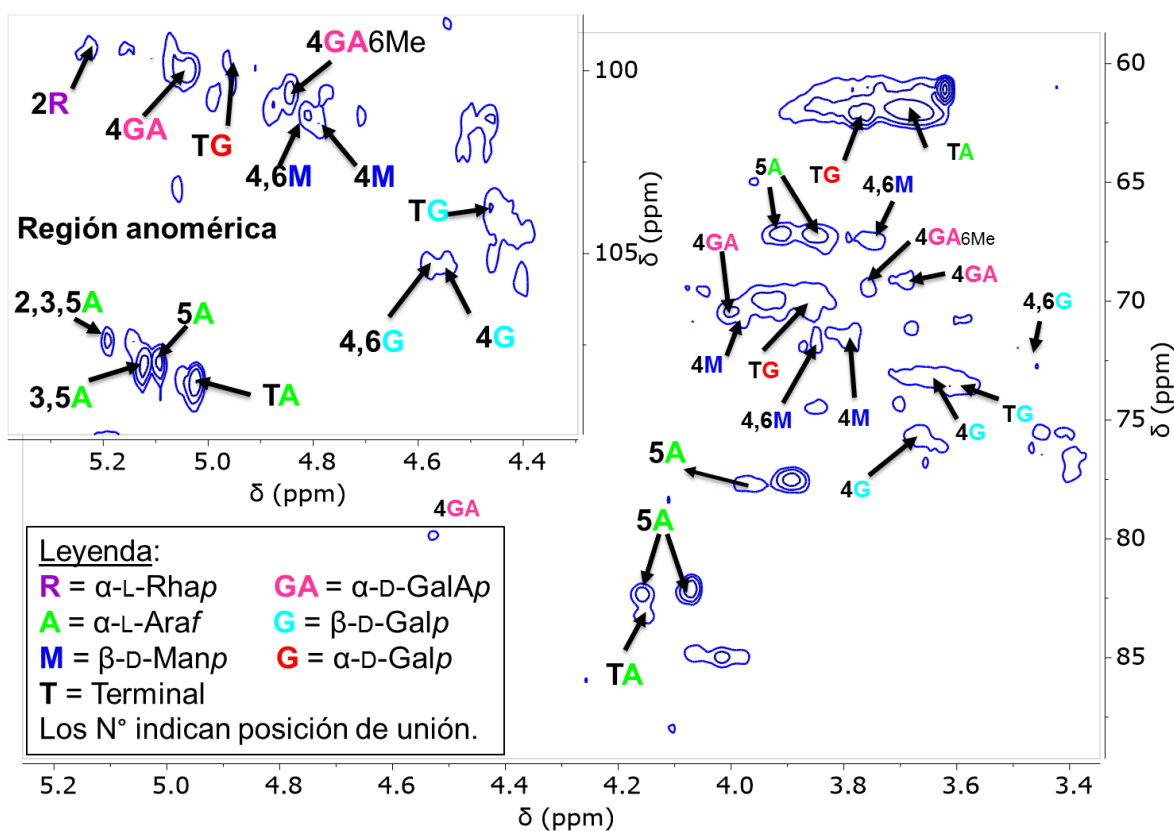


Figura 5.6: Espectro RMN 2D HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ del extracto de acuoso de TSA (1C-TSA), purificado por tratamiento con α -amilasa y proteinasa-k.

Para la muestra 4C-PCH, de igual manera, se encontraron las señales típicas para arabinanos ramificados y cadenas de galactanos (Figura 5.7). En la región anomérica, se observan los picos de las cadenas laterales de dominios de RGI [11]. Todas las muestras extraídas con KOH 1 M, fueron tratadas con α -amilasa para purificar los polisacáridos estructurales, sin embargo, aún se registró la presencia de una señal 100,6/5,33 ppm $^{13}\text{C}/^1\text{H}$, característica de un glucano de reserva. La intensidad de las señales para estos polisacáridos es mucho menor con posterioridad al tratamiento enzimático (ver discusión).

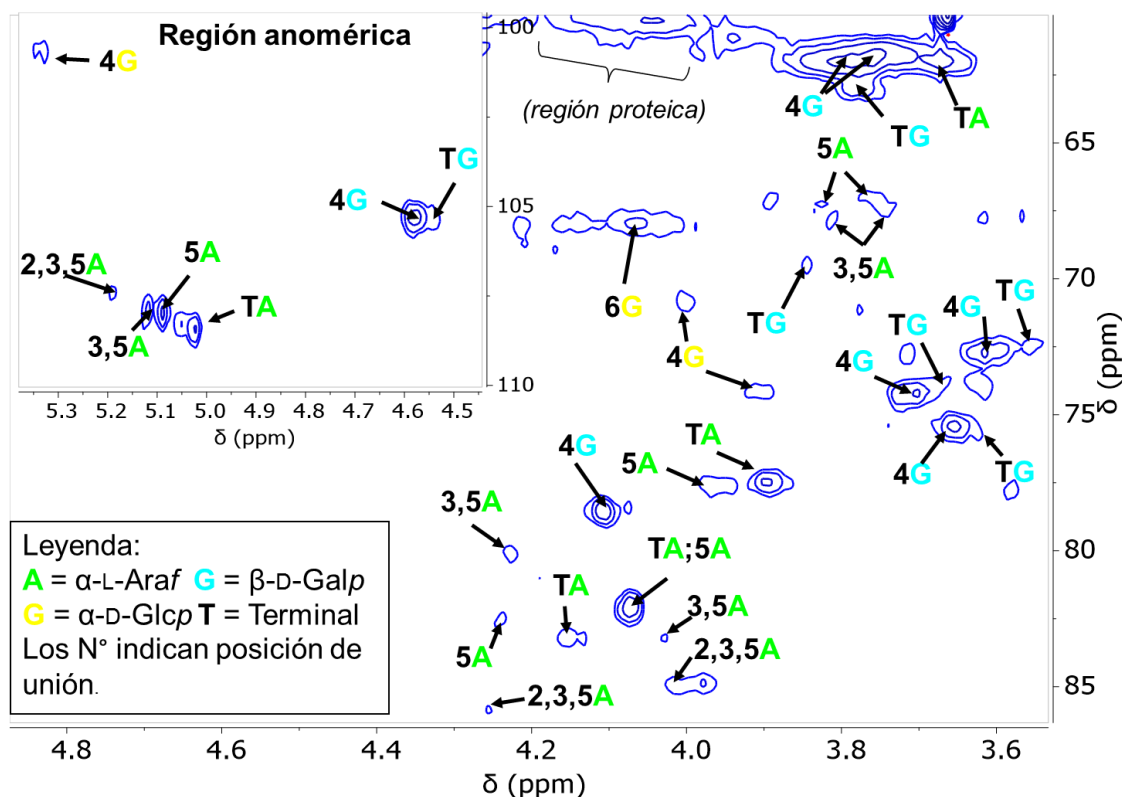


Figura 5.7: Espectro de RMN 2D HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ del extracto de KOH 1M de la muestra picada por chinche (4C-PCH).

El espectro del extracto de KOH 4 M de TSA (Figura 5.8) muestra, al igual que en el extracto acuoso, la presencia de cadenas de arabinanos y galactanos. Con los

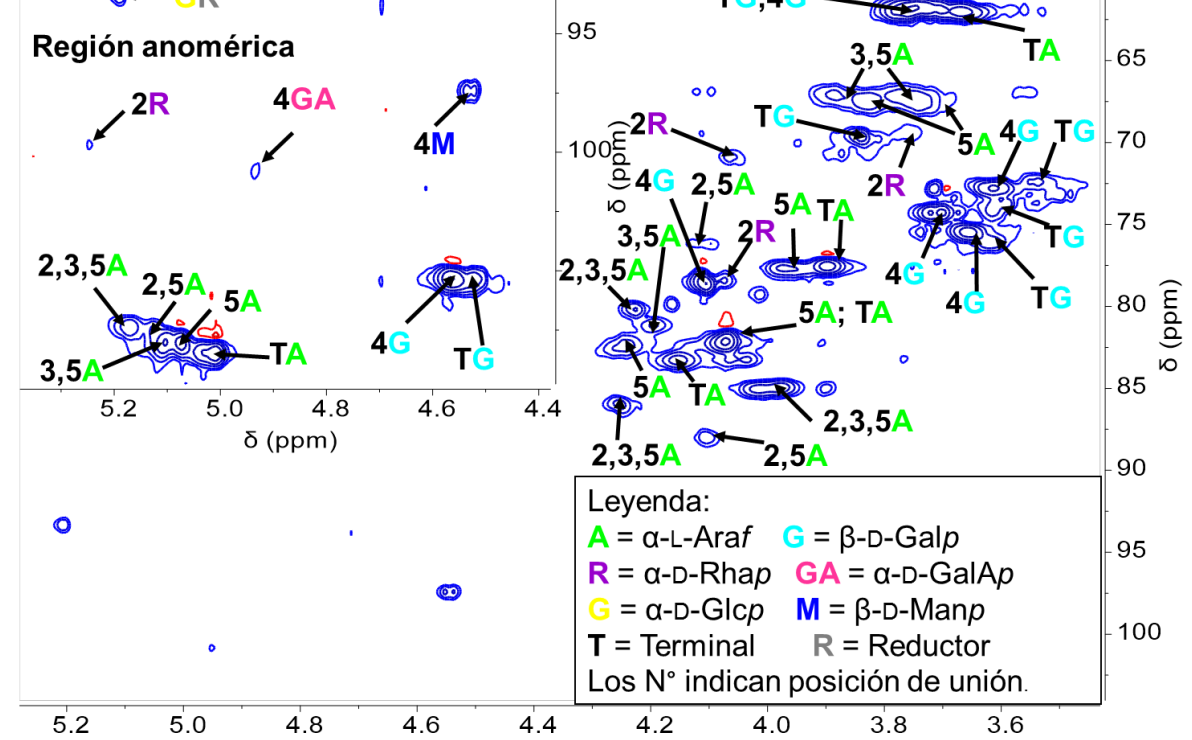


Figura 5.8: Espectro RMN 2D HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ del extracto de KOH 4M de TSA (5C-TSA).

La asignación completa de señales se puede ver en las Tablas 5.5, 5.6 y 5.7; corresponden a las señales encontradas de los diferentes polisacáridos presentes en cada extracto, asignadas bibliografía [8][10][12]–[16] y los análisis realizados. Estos resultados mostraron que los cotiledones tenían abundante presencia de AGs

a lo largo de todos los extractos de la extracción secuencial, los cuales forman parte de cadenas principales de RGI. Estas cadenas principales también pudieron ser apreciadas en los experimentos de RMN, además de las señales que pudieron ser asignadas a HG. Otro componente muy abundante en cotiledones que mostró señales en los espectros de RMN corresponde al almidón que pese a desarrollar tratamientos enzimáticos para descartar estas cadenas, que no aportan al estudio estructural de la pared de cotiledones (ver sección 5.5.1).

En el extracto acuoso se encontraron dominios de RGI, $\rightarrow 2$)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-GalAp-(1 $\rightarrow$, con sus respectivas cadenas laterales de galactanos y arabinanos descritas en literatura [17]. Además, se encontraron hemicelulosas: cadenas de galactomananos, β -D-Manp enlazados por 4 y ramificaciones de α -D-Galp en posición 6. En aquellos polisacáridos provenientes del extracto de KOH 4M de TSA se encontró el mismo dominio RGI, pero la cadena principal dio señales menores (ver sección 5.5.3).

Se observó también para 4C-PCH señales atribuidas a cadenas de arabinanos con cadenas principales de $\rightarrow 5$)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ entre otras ramificaciones y galactanos con cadenas $\rightarrow 4$)- α -D-GalAp-(1 $\rightarrow$. Se observan señales pequeñas identificadas para α -D-Glcp proveniente de residuos de almidón.

Tabla 5.5: Asignación de señales (ppm) de espectros de RMN para 1C-TSA.

Unidad estructural	Desplazamiento químico en ppm ^{1,2}					
	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5,5'	C-6/H-6,6'
Cadenas principales de pectinas (RGI)						
→4)-α-D-GalpA-(1→	100,0/5,02	69,2/3,67 ^a	69,6/4,03	79,9/4,51	72,6/4,70	176,6
→4)-α-D-GalpA-6Me-(1→	100,6/4,83	69,5/3,74 ^a				
→2)-α-D-Rhap-(1→	99,4/5,21	78,4/4,10				
Arabinano						
α-L-Araf-(1→	108,5/5,02	82,0/4,06	77,7/3,89	83,3/4,15	62,0/3,65	
→5)-α-L-Araf-(1→	108,1/5,09	82,1/4,06	77,7/3,96	826/4,25	67,4/3,82-3,73	
→2,3,5)-α-L-Araf-(1→	107,4/5,17	86,04,23	85,0/4,00	80,2/4,21	-	
→3,5)-α-L-Araf-(1→	108,1/5,11	80,2/4,21	83,2/4,05	81,2/4,18	67,1/3,87-3,75	
Galactano						
β-D-Galp-(1→	104,0/4,43	72,2/3,53	74,0/3,63	69,9/3,92	76,4/3,70	62,2/3,78 ^b
→4)-β-D-Galp-(1→	105,4/4,57 ^c	72,7/3,61	74,3/3,71	78,6/4,10	75,5/3,65	61,5/3,78 ^b
→4,6)-β-D-Galp-(1→	105,4/4,53 ^c	71,5/3,77	82,8/3,79	69,3/4,18	75,8/3,94	70,5/3,98
Galactomanano						
→4)-β-D-Manp-(1→	101,2/4,79	70,4/3,99	72,4/3,75	-	-	61,9/3,87
→4,6)-β-D-Manp-(1→	101,4/4,77	-	72,2/3,84	-	-	67,4/3,76
α-D-Galp-(1→	99,7/4,95	-	70,2/3,86	-	-	61,9/3,69

¹Usando como estándar interno acetona, con la señal de metilo correspondiente a 31,2/2,15 ppm. ²Letras indican señales que podrían estar intercambiadas.

Tabla 5.6: Asignación de señales (ppm) de espectros de RMN para 4C-ICH.

Unidad estructural	Desplazamiento químico en ppm ^{1, 2}					
	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5,5'	C-6/H-6,6'
α -L-Araf-(1→	108,5/5,02	82,0/4,07	77,4/3,89	83,2/4,15	62,0/3,67	
→5)- α -L-Araf-(1→	108,0/5,09	82,0/4,07	77,6/3,96	82,5/4,24	67,6/3,81-3,74	
→3,5)- α -L-Araf-(1→	107,9 /5.12	80,0/4,23	83,2/4,03	81,0/4,19	67,1/3,83-3,77	
→2,3,5)- α -L-Araf-(1→	107,4/5,19	85,9/4,25	85,0/4,01	80,2/4.22	-	
β -D-Galp-(1→	105,3/4,54	72,5/3,56	74,1/3,67 ^a	69,5/3,84	75,9/3,62	62,8/3,77
→4)- β -D-Galp-(1→	105,3/4,58	72,7/3,61	74,2/3,70 ^a	78,6/4,10	75,5/3,65	61,9/3,79-3,76

¹Usando como estándar interno acetona, con una señal correspondiente a 31,2/2,16 ppm.

²Letras indican señales que podrían estar intercambiadas.

Tabla 5.7: Asignación de señales (ppm) de espectros de RMN para 5C-TSA.

Unidad estructural	Desplazamiento químico en ppm ¹					
	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5,5'	C-6/H-6,6'
→2)- α -D-Rhap-(1→	99,6/5,25	78,4/4,08	70,9/4,05	-	69,3/3,74	17,7/1,23
→4)- α -D-GalpA-(1→	100,8/4,94	-	-	-	72,8/4,57	175,9
α -L-Araf-(1→	108,3/5,01	82,1/4,06	77,5/3,88	83,3/4,14	62,0/3,65	
→5)- α -L-Araf-(1→	108,1/5,07	82,1/4,06	77,7/3,96	82,6/4,25	67,4/3,82-3,73 ^a	
→3,5)- α -L-Araf-(1→	108,0/5,11	80,2/4,21	83,2/4,05	81,2/4,18	67,1/3,87-3,75 ^a	
→2,3,5)- α -L-Araf-(1→	107,4/5,17	86,0/4,23	85,0/4,00	80,2/4,21	-	
→4)- β -D-Galp-(1→	105,4/4,57	72,8/3,60 ^b	74,3/3,69	78,6/4,09	75,5/3,65	61,6/3,77-3,70
β -D-Galp-(1→	105,4/4,52	72,4/3,53 ^b	74,3/3,70	69,6/3,82	76,1/3,61	61,9/3,74

¹Usando como estándar interno acetona, con una señal correspondiente a 31,2/2,15 ppm.

²Letras indican señales que podrían estar intercambiadas. Las asignaciones se realizaron considerando las siguientes referencias [8][12]-[14].

Asimismo, se intentó estudiar las características estructurales de estos extractos mediante análisis por metilación. Para los extractos acuosos 1C-CTR, 1C-PCH y 1C-TSA, se obtuvo una cantidad importante de diferentes derivados parcialmente metilados, como consecuencia de la dispersión estructural de estas muestras. Para estos extractos 1C no se logró un proceso de metilación contundente, los resultados arrojaron sólo las unidades terminales de Ara y Gal presentes en cantidades considerables; pero las otras estructuras detectadas corresponden a unidades centrales no fueron encontradas en porcentajes significativos. Como se indica en el Capítulo 2, se realizaron varias secuencias de metilación (2-4), no logrando permetilación de las cadenas. En las primeras etapas se observó submetilación, mientras que finalmente hubo degradación de las muestras [18].

Por otra parte, se desarrolló el análisis por metilación para las muestras 5C-CTR, 5C-PCH y 5C-TSA; según el procedimiento descrito. Los resultados que se muestran en la Tabla 5.8 corresponden a arabinanos y galactanos provenientes de dominios de pectinas de tipo RGI y algunas cadenas de xiloglucanos (XyG). Las proporciones encontradas que varían según cada tratamiento y el control indicaron la presencia de cadenas de AGs provenientes de dominios de RGI. Estos resultados fueron mucho mejores que los logrados para los extractos acuosos, aunque podría haber aun un bajo grado de submetilación.

Tabla 5.8: Análisis de derivados metilados de extractos alcalinos mayoritarios, 5C-CTR, 5C-BD, 5C-TSA.

Monosacárido metilado ¹	Unidad de enlace ²	Porcentaje molar		
		5C-CTR	5C-PCH	5C-TSA
3,4-Me Rha	→2)-α-L-Rhap-(1→	0,3	0,3	0,4
3-Me Rha	→2,4)-α-L-Rhap-(1→	1,9	2,4	4,4
Rha		0,7	1,0	2,5
2,3,4-Me Fuc	α-L-Fucp-(1→	1,1	0,6	0,6
2-Me Fuc		-	0,5	0,7
2,3,5-Me Ara	α-L-Araf-(1→	11,9	3,9	2,8
2,3-Me Ara	→5)-α-L-Araf-(1→	14,9	17,6	17,2
2,5-Me Ara	→3)-α-L-Araf-(1→	0,5	0,5	1,0
2-Me Ara	→3,5)-α-L-Araf-(1→	5,6	6,3	9,2
3-Me Ara	→2,5)-α-L-Araf-(1→	-	-	5,7
Ara		4,5	4,4	7,4
2,3,4-Me Xyl	β-D-Xylp-(1→	4,3	4,7	7,9
Xyl		1,5	1,8	0,4
2,3,4,6-Me Gal	α-D-Galp-(1→	4,1	4,3	4,5
2,3,6-Me Gal	→4)-β-D-Galp-(1→	28,3	32,2	10,8
2,3-Me Gal	→4,6)-β-D-Galp-(1→	3,9	3,3	2,3
2,6-Me Gal	→3,4)-β-D-Galp-(1→	1,6	1,3	1,2
3,6-Me Gal	→2,4)-β-D-Galp-(1→	1,5	1,3	1,2
Gal		3,0	1,1	3,4
2,3,6-Me Glc	→4)-β-D-Glcp-(1→	5,6	7,6	7,2
2,3-Me Glc	→4,6)-β-D-Glcp-(1→	3,9	4,3	7,0
3-Me Glc	→2,4,6)-β-D-Glcp-(1→	1,1	-	-
Glc		-	1,3	2,0

¹La anomericidad y la configuración de las unidades no se deducen del análisis por metilación.

5.5 Discusión de resultados

5.5.1 Almidón, tratamientos enzimáticos y determinaciones de compuestos que no son hidratos de carbono.

Los experimentos desarrollados a campo deben llevarse a cabo en los meses precisos de siembra que demande el cultivo. El estadio R5, en el que se desarrolló este estudio tiene como característica la acumulación de la mayor cantidad de almidón en la semilla para su posterior utilización en los procesos metabólicos reproductivos [19]. Existen antecedentes en los que se registraron las variaciones del contenido de almidón de semillas de soja de diferentes variedades (Figura 5.9). En todas ellas, el contenido de almidón comienza a bajar en la octava semana post-floración, llegando a niveles mínimos cuando la semilla finaliza el ciclo (R8).

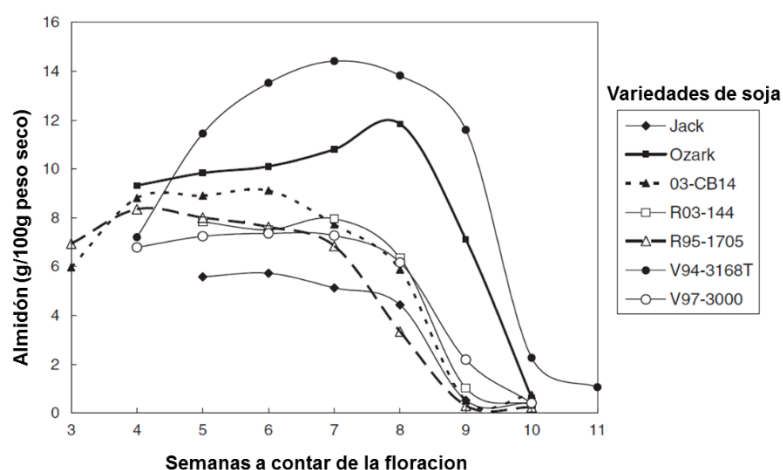


Figura 5.9: Cambio en el contenido de almidón en la soja durante el desarrollo y maduración de diferentes variedades de semillas. Adaptado de X. Saldivar *et al* [20].

Los cotiledones tratados durante R5 y cosechados en R6 efectivamente contenían cantidades importantes de almidón, por lo que se realizaron tratamientos

enzimáticos con α -amilasa para evitar la interferencia de este polisacárido de reserva con aquellos estructurales provenientes de la pared celular. En la Tabla 5.9 se observa la comparación de los valores para los α -glucanos originales y una vez purificados. El contenido de éstos se redujo 56 - 75%, con posterioridad al tratamiento enzimático en el caso del extracto acuoso y 30 - 45% para el extracto de CDTA. No se llevó a cabo el tratamiento con α -amilasa en el extracto con carbonato de sodio 0,05 M, debido a su baja proporción respecto a otros componentes. En el caso del extracto 1M KOH se redujo 46 - 82% el contenido de glucosa (% molar), luego del tratamiento con α -amilasa. Este tratamiento es conveniente para poder diferenciar entre los β -glucanos, provenientes de hemicelulosas y α -glucanos de reserva (almidón). Las enormes cantidades de almidón justifican que estos α -glucanos sean tan difíciles de eliminar y sigan siendo un producto mayoritario aun en 4C.

Tabla 5.9: Resultados de la purificación por tratamiento de α -amilasa para los extractos con mayor contenido de almidón.

Extractos	Control (CTR)		Picado (PCH)		Ácido Salicílico (TSA)	
	% molar Glc		% molar Glc		% molar Glc	
	Original	Tratado	Original	Tratado	Original	Tratado
Acuoso	8,6	3,6	7,7	2,3	11,7	2,5
CDTA	24,4	4,3	10,4	6,7	14,9	10,7
KOH 1 M	40,3	18,8	48,9	26,6	48,7	7,6

Las semillas de soja se utilizan en la industria alimentaria por su alto contenido de proteínas y aceite, con un porcentaje de proteína de aproximadamente 35% [21]. Muchas de estas proteínas fueron apareciendo como contaminantes durante la extracción secuencial de los polisacáridos de pared celular. Los extractos acuosos

estaban compuestos ~80% de proteínas solubles. Se realizó el tratamiento enzimático con proteinasa-K, lo que arrojó como resultado una disminución de 55 - 60% en el contenido de proteínas, concluyendo la digestión enzimática con el aumento del contenido de polisacáridos de pared en las muestras tratadas.

Paralelamente a la extracción secuencial y a las digestiones enzimáticas necesarias, se midió el contenido de fenoles totales, incluyendo aquellos hidrolizables por saponificación, sobre los RIA de control y ambos tratamientos. Los compuestos fenólicos actúan como parte de los mecanismos de defensa de las plantas contra las plagas de insectos y otras. Particularmente, en soja se ha informado que en general son respuestas más bien débiles y con poca eficacia. Sin embargo, en plantas de *G. max*, se registró que la respuesta combina una cantidad de compuestos fenólicos que podría disminuir el desempeño de herbívoros [22]. Según la bibliografía, la mayoría de los compuestos fenólicos de soja se encuentran en hojas. En este trabajo, sobre cotiledones no se observaron grandes diferencias entre los tratamientos y control ($\pm 10\%$). Se ha informado anteriormente que el ataque de la chinche sobre las vainas, produce la acumulación de compuestos fenólicos unidos por enlaces éster a glicósidos [23][24], mientras que los compuestos fenólicos producidos por la planta de soja como respuesta al ataque de chinche (y otros herbívoros), corresponden a compuestos fenólicos libres, los cuales pueden haber sido extraídos en el proceso de obtención de RIA, por lo que la diferencia entre los tratamientos y el control no tendría implicancia en el proceso de inducción con chinche verde.

Por otro lado, se midió el contenido total de lignina a través del método Klason para material insoluble. Existen interacciones entre las paredes de dicotiledóneas y compuestos fenólicos. Los ferulatos participan plenamente en el proceso de lignificación, quedando ensamblados a unidades estructurales de lignina. De esta forma, la lignina hidrófoba se deposita en las paredes secundarias. Esto da como resultado su transformación, aumentando la resistencia de las paredes y reduciendo su flexibilidad. Estas estructuras permiten nuevas funciones, como conductos de agua y soporte mecánico o estructural de la planta [25][26]. Los cotiledones

contienen paredes celulares primarias muy dinámicas con una variedad de polisacáridos. Los monómeros de lignina (monolignoles), dependiendo de la naturaleza de la pared celular, pueden interaccionar con proteínas y glicoproteínas y/o con xilanos través de ferulatos [27]. Sin embargo, esto último se da principalmente en gramíneas. Los valores de lignina obtenidos por el método Klason indican un aumento en OC-PCH (Tabla 5.3) respecto a OC-CTR y OC-TSA. Al tratarse de un porcentaje respecto al peso total calculado sobre RIA se puede inferir que OC-PCH tiene proporcionalmente menor contenido de celulosa y de polisacáridos de pared, como indica la Figura 5.4, lo que implicaría un aumento proporcional del contenido de lignina debido a la disminución de los polisacáridos.

Otro análisis realizado sobre los extractos de cotiledón es la determinación del contenido hidroxiprolina (Hyp) de las proteínas presentes. La hidroxiprolina es un aminoácido mayoritario en las glicoproteínas de plantas. Existen dos grupos principales de proteínas ricas en hidroxiprolina: extensinas y arabinogalactano-proteínas (AGPs). Las extensinas que forman parte del grupo llamado proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP, por sus siglas en inglés), corresponden a cadenas repetitivas de Ser-(Hyp)₄ y presentan estructuras fibrilares, insolubles, mientras que los AGPs suelen conformarse de cadenas repetitivas de Ala-(Hyp)₄, y pueden encontrarse unidas a la cara externa de la membrana plasmática o solubles en las paredes primarias [28], además, ambas estructuras proteicas contienen prolina, glicina, cisteína, como otros aminoácidos mayoritarios.

El contenido de estas proteínas en los tejidos vegetales podría variar, si dicho tejido se encuentra bajo ataque de agentes patógenos, incluso hay estudios inmunoquímicos que indicarían que las extensinas se acumulan en las paredes celulares alrededor de las áreas en las que la planta restringe el crecimiento microbiano, es decir la zona de inducción patogénica/herbívora. En el caso de tratamientos sobre semillas de soja, se observó que al inducir los tejidos, se genera una insolubilización de las HRGPs de pared celular, al bajar la actividad enzimática que degrada la pared y disminuir el conteo de protoplastos liberados [29]. La determinación de hidroxiprolina [30] fue realizada en los extractos acuosos de

cotiledón y los residuos finales de la extracción secuencial, muestras 1C y 6C (también de tegumento, Capítulo 3). Los resultados se presentan en la Tabla 5.4, donde se observa un aumento de más del doble del contenido molar de hidroxiprolina en las muestras 1C-PCH y 1C-TSA con respecto al control (1C-CTR). Igualmente, para las muestras de los residuos finales, 6C-PCH y 6C-TSA se ve un aumento menos marcado, de alrededor de 20% superior, con respecto a 6C-CTR. Estos resultados sugieren que las extensinas presentes en los cotiledones de semillas de soja son afectadas por la inducción de defensa vegetal modulada por la picadura de la chinche y el tratamiento con SA y aumentan su acumulación en los tejidos analizados. Entonces, la inducción produciría mayor variación AGPs con estructuras solubles en agua y en menor medida en las extensinas insolubles, que permanecen en los residuos finales (6C).

5.5.2 Caracterización química general

Los cotiledones de soja tuvieron más bajos rendimientos en polisacáridos de pared celular respecto a lo que se obtuvo en la extracción secuencial de tegumentos. Más de 50% del total de RIA en los tegumentos en comparación con aproximadamente el 9% en los cotiledones. Los tegumentos son considerados tejido fibroso, ya que posee alta cantidad de polisacáridos muy poco solubles, además de un contenido muy superior (en masa) del residuo final obtenido por la extracción secuencial, si se compara con cotiledones, en los que se sabe que el componente principal son las proteínas [31][32].

En las Tablas 5.1 y 5.2 se observa la caracterización química de todos los extractos provenientes de cotiledón, en las que se evidencia que los arabinogalactanos (AGs) se encuentran presentes a lo largo de todo el fraccionamiento realizado. Las primeras investigaciones desarrolladas sobre

cotiledones de semillas de soja fueron realizadas por Aspinall y colaboradores [33]–[35], en las que determinaron el predominio de arabinogalactanos con cadenas principales $\rightarrow 4$)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ y $\rightarrow 5$)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$, además de un polisacárido ácido correspondiente a mezcla de homogalacturonano (HG) y ramnogalacturonano I (RGI).



Figura 5.10: Estructura de arabinogalactano presente en cotiledón de soja propuesta [33].

Los cotiledones de especies dicotiledoneas por lo general tienen un predominio de tejidos de tipo parenquimatoso, es decir, tejidos fundamentalmente blandos, poco especializados y fisiológicamente no diferenciados. Es el caso de las leguminosas, en las cuales las estructuras de reserva, como arabinogalactanos y xiloglucanos, son posteriormente utilizadas para desarrollar vascularización y, así, transportar los productos a las partes de la planta en crecimiento [36]. Los cotiledones contienen cantidades importantes de estos polisacáridos de pared celular, que actúan como reserva y son extraídos en todas las fracciones del proceso de extracción secuencial. En el perfil de monosacáridos constituyentes de los extractos principales (Figura 5.5), se observa cómo los arabinogalactanos, mezcla de polisacáridos ácidos (pécticos), y hemicelulosas aparecen en todas las fracciones, sin lograr una separación efectiva de los diferentes grupos de polisacáridos de pared, como se indica en el esquema de extracción general de la Figura 5.2. Esto indica que, para este tipo de tejidos vegetales no fue eficiente la extracción secuencial propuesta. A medida que aumenta la concentración alcalina de los extractos, se observa que continúan solubilizándose cantidades de pectinas (AGs) adicionales, junto con las hemicelulosas. Si bien las fracciones KOH 1M y 4M

son las que contienen la mayor cantidad de xilosa y glucosa no son los azúcares predominantes en estas fracciones, aunque evidencian la presencia de xiloglucanos y glucuronoxilanos en estos extractos, junto con los arabinogalactanos que siguen siendo los polisacáridos predominantes [37].

La unidad constitutiva más abundante es la galactosa seguida de los ácidos urónicos, arabinosa y glucosa, lo que concuerda, tanto con lo publicado por Aspinall et al. [33]–[35] como por Huisman et al. [38]. En la Figura 5.11 se observa el contenido en monosacáridos constituyentes total de cada tratamiento y del control.

Total monosacáridos de pared en RIA

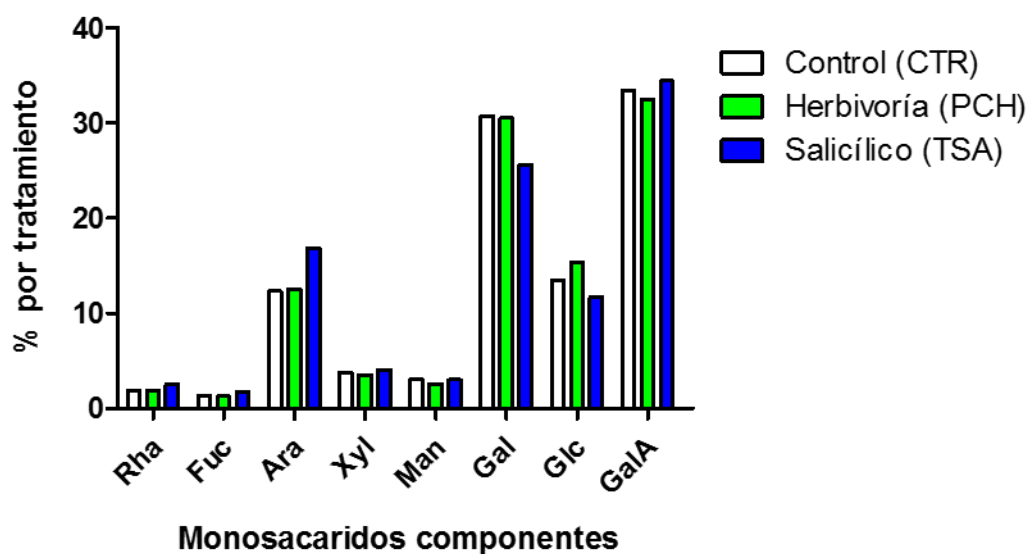


Figura 5.11: Contenido total de monosacáridos constituyentes de los tratamientos y control de cotiledones de la variedad Williams.

Se observa un claro aumento del contenido de Ara en las paredes celulares de cotiledones de TSA con respecto a CTR y PCH, además de una variación en el contenido de Gal, generando un cambio en el contenido de monosacáridos

constituyentes, específicamente, en los AGs de aquellas muestras inducidas con ácido salicílico. Los arabinanos, galactanos y arabinogalactanos son los polisacáridos neutros más abundantes en las paredes celulares de los cotiledones de soja, y en los tratamientos realizados la relación Gal:Ara 2,5:1,0 para CTR; 2,4:1,0 para PCH y 1,5:1,0 para TSA. El ácido salicílico es una hormona vegetal con participación directa en la síntesis de algunos polisacáridos y/o componentes de la pared celular vegetal [37][38].

Hasta el momento, no existen antecedentes que indiquen una relación molecular directa entre la acción de SA por aplicación exógena y la variación en los contenidos de Ara, Gal, AGs y/o AGPs. Sin embargo, al observar la relación de Gal:Ara que arroja las paredes celulares de cotiledones de TSA y considerando los cambios efectivos que el SA produce sobre la pared y las proteínas asociadas a AGs, se puede inferir que la modulación de defensas mediadas por SA tiene efectos en la composición en monosacáridos constituyentes, específicamente en los contenidos de Ara y Gal con respecto al control. Este resultado podría ser un precedente de cómo variaría la estructura y proporción de AGs de la pared celular de cotiledones cuando se induce con SA durante el desarrollo de las semillas en R5.

El cuarto monosacárido en abundancia en las paredes celulares de los cotiledones es la β -D-glucosa, que deriva de celulosa y xiloglucanos (XGs) [36]. Los XGs, a diferencias de los AGs se encuentran formando interacciones por enlaces hidrógeno con la celulosa en el entramado de la pared, por lo que son extraídos en condiciones de mayor alcalinidad. En la Figura 5.3 se observa cómo se distribuye el contenido de β -D-glucosa por extracto, mostrando que en KOH 1M, 4M y residuo final aparecen los β -glucanos. Sin embargo, aparecen también en los extractos que de menor alcalinidad, pero, en este caso, se trata de glucosa proveniente de almidón. Estos α -glucanos se observan claramente en los espectros de RMN de ^1C , ^2C y ^3C de ambos tratamientos y del control. Es por eso por lo que se descartó su contenido en estos primeros tres extractos de la extracción secuencial. En la Figura

5.12 se presentan las señales de la zona anomérica características para α -D-glucanos [41].

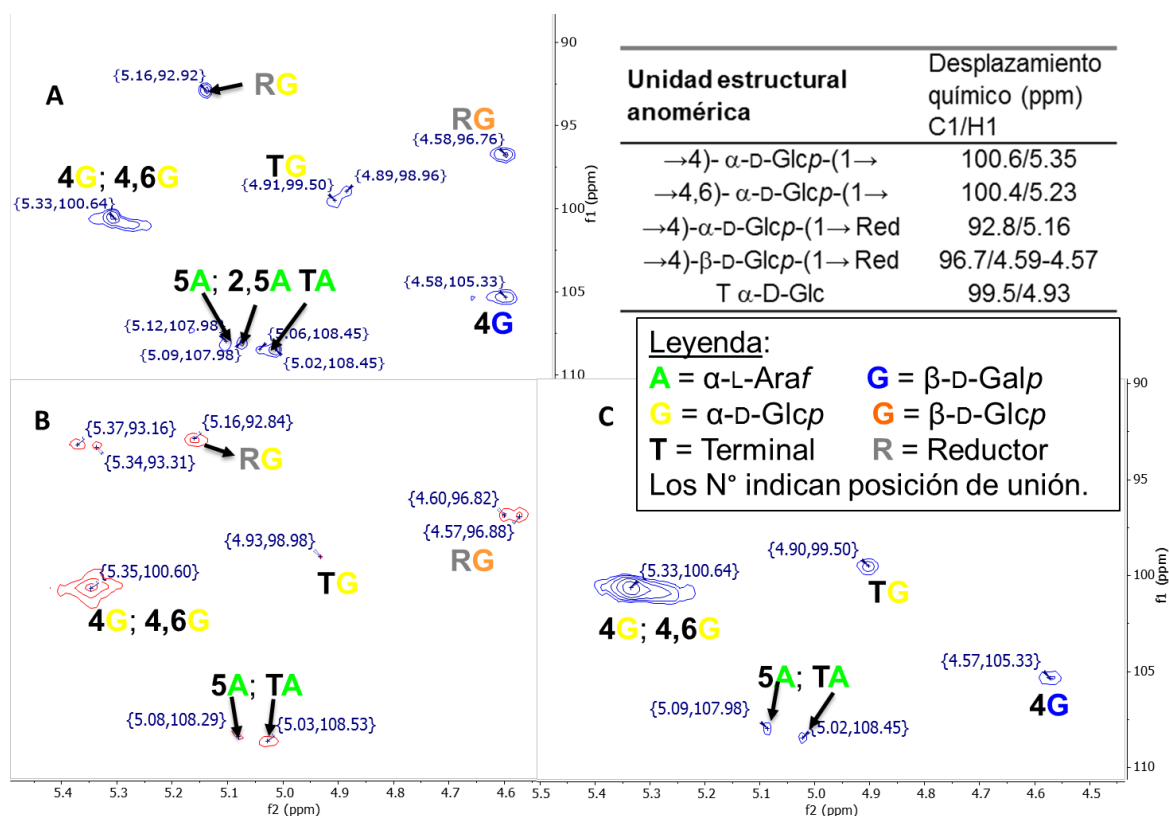


Figura 5.12 Asignaciones de señales (ppm) correspondientes a α -glucanos presentes en la zona anomérica de espectros de RMN del extracto acuoso y de Na_2CO_3 0,05 M de cotiledones tratados antes de la purificación con α -amilasa (**A**: 2C-CTR, **B**: 1C-PCH y **C**: 3C-TSA).

Con el fin de completar la elucidación estructural de los polisacáridos en cada una de las muestras, para los extractos acuosos se realizó análisis por metilación. Los resultados indicaron la presencia mayoritaria de arabinogalactanos, los que suelen ser estructuras muy ramificadas, que presentan varios tipos de enlaces glicosídicos. El proceso de metilación, descrito en el capítulo de materiales y métodos [42][43] fue llevado a cabo sobre los extractos acuosos 1C-CTR, 1C-PCH

y 1C-TSA. Tanto para el control como para los tratamientos se puede observar cómo las unidades de galactosa en el extremo terminal no reductor (2,3,4,6-Me Gal) superan el 50% para 1C-CTR y 1C-PCH y superan el 20% para 1C-TSA, lo que indicaría que el galactano fue degradado a pequeñas cadenas de pocas unidades. El caso de los arabinanos es similar, no se logra dilucidar una estructura posible según las proporciones de los derivados metilados, ya sea por submetilación de las unidades o por degradación de las cadenas poliméricas. Por otra parte, los espectros de RMN de 1C-TSA indicaron la presencia de varias estructuras, además de AGs, como HG, RGI y GMs, todos ellos fácilmente escindibles debido a interacciones débiles, o con un alto grado de ramificación, en el caso de los GMs. [44].

La caracterización general de los extractos obtenidos con CDTA entregó como resultado arabinogalactanos y HG como principales polisacáridos presentes. El ácido galacturónico, tanto en los extractos 1C como 2C, puede estar en su forma ácida o formando un éster metílico (GalAME). El grado de esterificación de las pectinas está relacionado con la elongación, crecimiento y maduración de los tejidos y se determinó para las muestras de ambos extractos [45] (Tabla 5.10).

Tabla 5.10: Contenido de ácido galacturónico (GalA) como éster metílico y libre presente en muestras 1C (acuoso) y 2C (CDTA).

Extracto	Extracto Acuoso (mg/100 g RIA)			Extracto con CDTA (mg/100 g RIA)			Acuoso+CDTA (mg/100 g RIA)		
	Total	GalAME	GalA	Total	GalAME	GalA	Total	GalAME	GalA
CTR	178	131	47	756	125	631	934	256	678
PCH	196	130	66	614	156	458	810	286	524
TSA	460	145	315	243	174	69	703	319	384

Un alto grado de esterificación (Gme) produce pectinas más flexibles y disposición con menos interacciones entre cadenas, lo que hace que el ensamblaje

celular sea más lábil. Esta característica se suele presentar cuando la planta está en proceso de crecimiento y elongación [11]. A nivel molecular el Gme es regulado por la actividad de las polimetilestearasas (PME) sobre las cadenas de pectina. Cuando se genera pectina de bajo Gme, se puede producir el entrecruzamiento con Ca^{2+} para aumentar la rigidez del gel, generando un mayor endurecimiento de la pared celular. Sin embargo, cuando el Gme es bajo, y las pectinas se encuentran en su forma ácida, éstas son susceptibles a las poligalacturonasas que pueden escindir con mayor facilidad la matriz pectínica, intensifican la flexibilidad de las cadenas, produciendo mayor ablandamiento de la pared celular por disminución de su longitud [46] [47].

Se observa una disminución en la cantidad total de ácidos urónicos en las paredes celulares de TSA en el extracto acuoso, con respecto a CTR y PCH. Además, hay un aumento importante de GalAMe para muestras de PCH con respecto a CTR, y esta tendencia es aún más significativa cuando se comparan las paredes celulares de cotiledones de TSA con CTR. Por el contrario, se observa una tendencia inversa en cuanto a la cantidad de ácidos urónicos sin esterificar. En este caso, se puede especular que el aumento en el contenido de ácidos urónicos esterificados con grupos metoxilo podría contribuir a la tendencia de liberación de HG de las paredes celulares como consecuencia a la menor presencia de interacciones iónicas entre las cadenas de HG, que daría como resultado menor empaquetamiento y/o paredes celulares más blandas.

Los extractos obtenidos con Na_2CO_3 0,05 M (3C) son los de menor rendimiento y según lo registrado en los espectros de RMN, gran parte del material corresponde a α -glucanos de reserva. Es decir que este extracto no es importante a nivel del análisis de las paredes celulares.

Cuando se aumenta la alcalinidad en la extracción secuencial, se espera obtener en mayor proporción las hemicelulosas. Sin embargo, en los extractos de KOH 1 M y 4 M (4C y 5C, respectivamente), sigue siendo mayoritario el contenido de AGs. En la Figura 5.7 y 5.8 se observan las señales del espectro de RMN HSQC correspondientes a los arabinanos y galactanos para 4C-ICH y 5C-TSA. Además,

para 4C aún se logran observar señales asignadas a restos de α -glucanos. Los extractos de KOH 1 M, además de arabinanos y galactanos, contienen xiloglucanos (XG) formados según la bibliografía, por una relación molar Glc:Xyl de $\sim 4:3$, el resto de Glc en la muestra correspondería a α -D-glucanos [36]. Los XG no se logran ver en los espectros de RMN debido a su poca solubilidad, al tratarse de hemicelulosas que son menos solubles que otros componentes de estos extractos. En ambos tratamientos y en el control se pudo detectar un β -D-manano posiblemente poco sustituido debido a que no logró ser solubilizado y detectado en el espectro de RMN [7]. La solubilidad de los galactomananos depende directamente de su grado de ramificación con unidades de α -D-Galp sustituida en posición 6, es por eso que se observa su presencia en los extractos obtenidos con agua y también con KOH 1 M, incluso en el residuo final (Figura 5.5) [48].

El extracto con mayor rendimiento de toda la extracción secuencial corresponde en todos los casos (CTR, PCH y TSA) al obtenido en un medio fuertemente alcalino (KOH 4 M), 5C, con un rendimiento de 5,7-6,9 % respecto al RIA. Al igual que los extractos 4C, los 5C contienen como polisacáridos mayoritarios arabinanos y galactanos, seguidos de cantidades importantes de ácido galacturónico que puede estar formando parte de varios tipos diferentes de pectinas, principalmente HG, bloques de RGI e incluso pequeñas cantidades de xilogalacturonanos (XGA), que suelen estar poco ramificados y ser mayormente insolubles [37]. Los polisacáridos restantes y la mayoría de la xilosa presente están formando parte de los XGs [49]. En la Figura 5.7 se observa el espectro de 5C-TSA que, al igual que 4C-PCH registra las señales correspondientes a los AGs, pero además se observan las señales de Rha y GalA que forman parte de los polisacáridos mencionados.

5.5.3 Caracterización estructural fina

Para profundizar la caracterización general y obtener información estructural precisa sobre los polisacáridos presentes se realizó el análisis por metilación. Estos estudios confirmaron que Ara y Gal presentes en todos los extractos forman cadenas de arabinogalactanos. Estas cadenas están formadas por unidades de α -L-arabinofuranosa enlazada por 5 y terminal principalmente, y cantidades menores, de arabinosa enlazada por 3, 3,5 y 2,3,5 y cadenas de (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactopiranososa como estructuras principales. Las señales correspondientes se indicaron en las Figuras 5.6, 5.7 y 5.8.

El análisis por metilación de 5C-CTR, 5C-PCH y 5C-TSA, entregó información importante sobre las cantidades relativas de estructuras de arabinanos y galactanos de esta etapa. Las proporciones encontradas para las unidades que conforman arabinanos y galactanos que pudieron confirmarse, se muestra en la Tabla 5.11, construida a partir de los resultados obtenidos en la Tabla 5.8.

Tabla 5.11: Estructuras de los arabinanos a partir del análisis por metilación en muestras 5C.

Unidad ¹	Arabinanos	5C-CTR	5C-PCH	5C-TSA
α -L-Araf-(1 $\rightarrow$	<i>terminal</i>	2,1	0,6	0,2
$\rightarrow$ 5)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$	<i>de cadena</i>	2,8	2,9	1,2
$\rightarrow$ 3,5)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$	<i>ramificaciones</i>	1	1	1

¹Solo se deduce del análisis por metilación el patrón de sustitución y si la unidad es furanósica o piranósica.

Para 5C-TSA, la proporción varía notablemente, pudiendo inferir que las cadenas de arabinanos son más ramificadas con respecto al CTR y PCH, a pesar de que, al igual que para las muestras 1C, podrían existir submetilación. En la Figura

5.13 se propone una estructura posible para las cadenas de arabinano de cotiledones obtenidas en por extracción con KOH 4M.

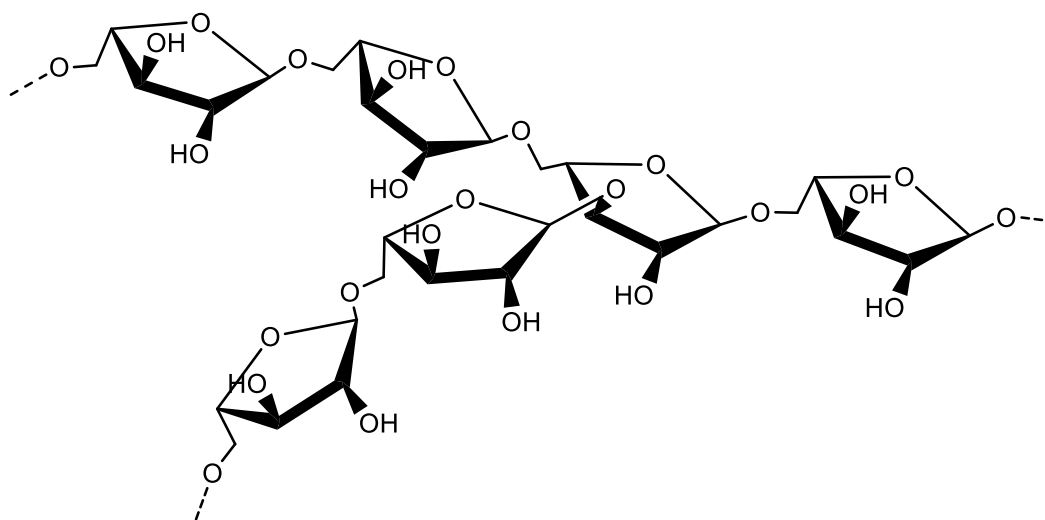


Figura 5.13: Estructura más común para 5C-CTR y 5C-PCH presente en las cadenas de arabinanos de cotiledones extraídas con KOH 4M.

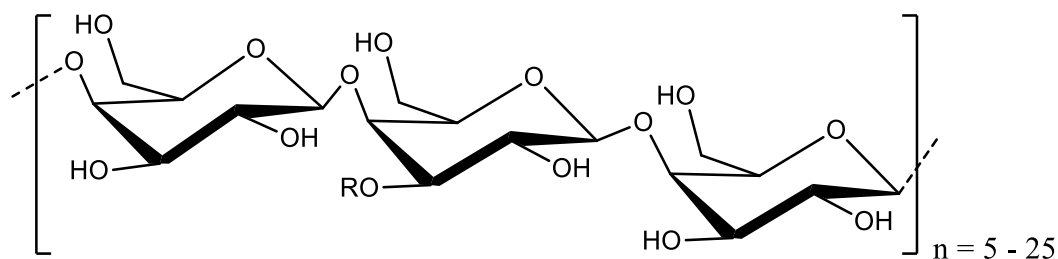
De la misma forma, se analizaron los resultados para los galactanos obtenidos (Tabla 5.12). Los galactanos suelen ser cadenas lineales de $\rightarrow 4$)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$, que pueden estar sustituidos en posición 3 por $\rightarrow 5$)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$, dando lugar a los arabinogalactanos de tipo I, que se encuentran formando parte de las cadenas laterales de los bloques RGI, extraídos en esta fracción [50].

Tabla 5.12: Estructuras de los galactanos a partir del análisis por metilación en muestras 5C.

Unidad ¹	Galactanos	5C-CTR	5C-PCH	5C-TSA
β -D-Galp-(1→	<i>terminal</i>	3	3	2
→4)- β -D-Galp-(1→	<i>de cadena</i>	18	25	5
→3,4)- β -D-Galp-(1→	<i>ramificaciones</i>	1	1	1

¹Solo se deduce del análisis por metilación el patrón de sustitución y si la unidad es furanósica o piranósica.

Se observa un aumento en la longitud de la cadena promedio de en 5C-PCH con respecto a 5C-CTR. El cambio es abrupto para 5C-TSA, indicando que las cadenas promedio de galactanos serían más cortas y/o podrían estar mayormente sustituidas por cadenas de arabinanos. La estructura propuesta se presenta en la Figura 5.14.

**Figura 5.14:** Estructura más común para galactanos de cotiledones extraídas con KOH 4M. Puede estar sustituido con una unidad de α -L-Araf-(1→ en R.

Además, se realizó la estimación de la cantidad de cadenas laterales de los AGs presentes en las pectinas de los extractos 5T. En la Tabla 5.13 se muestra los porcentajes de las pectinas en cada muestra. La estimación fue realizada partiendo de RGI, que se estimó como Rha + GalA (proporción 1:1) + arabinosa y galactosa.

El contenido HG se calculó como la cantidad total de UA menos la cantidad de GalA en RGI. En la estimación de la cantidad de galactanos se descontó galactosa que formaría parte de XGs y GMs (GMs > 1% y XGs > 2% de Gal respecto al total), según las proporciones referidas en literatura [51][52].

Estos resultados muestran la variación de las cadenas laterales de los RGI para los extractos obtenidos por el tratamiento con ácido salicílico (SA), donde se observa la disminución de la proporción de galactano contrapuesto al aumento de la cantidad de las cadenas de arabinano, especialmente para la muestra tratada con SA. Se ha reportado la acción directa de SA exógeno sobre semillas de soja como mecanismo de defensa contra enfermedades [53], además se conoce el efecto de SA en el fortalecimiento de las paredes celulares frente a estrés biótico, como ataque de agentes patógenos [54]. Los efectos de SA exógeno sobre pared celular han sido poco estudiados desde un punto de vista molecular, por lo que los resultados obtenidos en la variación de las cadenas laterales de RGI en las muestras de TSA podrían ser un precedente en el efecto de la hormona vegetal sobre polisacáridos estructurales de paredes celulares vegetales. Estos resultados también coinciden con las variaciones registradas en el total de monosacáridos componentes de los cotiledones, mostrado en la Figura 5.11. Los niveles de Gal disminuyen, mientras Ara aumenta en TSA. Además, hay que tener en cuenta que los extractos 5T, corresponden a la fracción con mayor rendimiento tanto para TSA como para CTR y PCH.

Tabla 5.13: Contenido de pectinas en los extractos 5T

Muestra	% Molar			
	HG	RGI (principal)	Arabinano (laterales)	Galactano (laterales)
5C-CTR	34	5	16	32
5C-PCH	44	3	14	26
5C-TSA	46	5	21	14

Por otro lado, en el residuo final los AGs, aunque no son mayoritarios, todavía se encuentran en segundo lugar en abundancia. En este residuo predomina la celulosa, insoluble aun en medio fuertemente alcalino. Se observan (Figura 5.5), cantidades menores de xilosa y manosa, que corresponderían a XGs y mananos, estos últimos posiblemente muy poco ramificados con unidades de α -D-galactosa. La celulosa es el polisacárido más regular de las paredes celulares y, debido a su insolubilidad, sería necesario recurrir a otras técnicas para analizar su estructura y grado de cristalinidad, como ser difracción de rayos x y espectroscopía de RMN en fase sólida.

5.6 Conclusiones

En la presente investigación se demostró que los principales cambios en las paredes celulares de cotiledones como consecuencia del ataque de *Nezara viridula* corresponden al contenido de ácidos urónicos, específicamente, ácido α -D-galacturónico, mientras que también se detectaron algunos cambios en las estructuras de los arabinogalactanos.

Sin embargo, la extracción secuencial realizada sobre los cotiledones fue poco efectiva para separar los diferentes polisacáridos que formaban partes de estas paredes. El alto contenido de arabinogalactanos y almidón hicieron difícil la visualización de otras estructuras de la pared celular, ya que, tanto AGs, como almidón se distribuyeron por todos los extractos obtenidos.

En conclusión, a pesar de las dificultades experimentales, se demostró claramente que había cambios mensurables en la composición de los polisacáridos de paredes celulares de cotiledones y su grado de interacción, lo que está directamente relacionado con la degradación de las paredes celulares inducido por

el ataque de *Nezara viridula* y al tratamiento externo con SA en estadio del ciclo reproductivo R5.

Las muestras tratadas con SA exógeno mostraron una diferencia clara en el contenido de Ara y Gal, los cuales en cotiledones corresponden a monosacáridos constitutivos de las cadenas laterales de los dominios RGI. Esta diferencia observada podría ser un precedente en los efectos producidos por ácido salicílico sobre la estructura de paredes celulares.

5.7 Referencias

- [1] N. S. Shekhawat and G. Sablok, "GROWTH AND DEVELOPMENT," in *Growth and Development*, 3rd editio., Lincoln Taiz and Eduardo Zeiger Sinauer, Ed. Rajasthan: Department of Botany, Jai Narain Vyas University, 2002, pp. 1–83.
- [2] S. Shanmugasundaram, *Soybeans. Chemistry, Production, Processing and Utilization Edited by L. A. Johnson, P. J. White and R. Galloway. Urbana, Illinois, USA: AOCS Press (2008), pp. 850, US\$225.00. ISBN 9781893997646. Available from CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL, Edition, 2., vol. 47, no. 1. Boca Raton, FL, USA.: CRC Press/Taylor and Francis, 2011.*
- [3] C. Silva-Sanzana, J. M. Estevez, and F. Blanco-Herrera, "Influence of cell wall polymers and their modifying enzymes during plant–aphid interactions," *J. Exp. Bot.*, vol. 71, no. 13, pp. 3854–3864, 2020.
- [4] R. Giacometti, V. Jacobi, F. Kronberg, C. Panagos, A. S. Edison, and J. A. Zavala, "Digestive activity and organic compounds of *Nezara viridula* watery saliva induce defensive soybean seed responses," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12, 2020.
- [5] Romina Giacometti and Jorge A. Zavala, "Soybeans cultivation, nutritional properties and effects on health," in *Nova Science Publishers, Inc.*, vol. 22, no. 1, B. Fletcher, Ed. Buenos Aires, 2017, pp. 35–62.
- [6] J. U. Fangel, C. Y. Jones, P. Ulvskov, J. Harholt, and W. G. T. Willats, "Analytical implications of different methods for preparing plant cell wall material," *Carbohydr. Polym.*, vol. 261, no. October 2020, p. 117866, 2021.
- [7] H. V. Scheller and P. Ulvskov, "Hemicelluloses," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 61, pp. 263–289, 2010.
- [8] Z. Hromádková and Z. Košť, "Non-cellulosic polysaccharides from the leaves of small balsam (*Impatiens parviflora* DC .)," vol. 389, pp. 147–153, 2014.
- [9] V. Kumar, A. K. Sinha, H. P. S. Makkar, G. de Boeck, and K. Becker, "Dietary Roles of Non-Starch Polysachharides in Human Nutrition: A Review," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 52, no. 10, pp. 899–935, 2012.
- [10] A. L. Davis, R. A. Hoffmann, A. L. Russell, and M. Debet, "1H- and 13C-NMR characterization of the digalactosylmannopentaose liberated from legume seed galactomannan by β -mannanase action," *Carbohydr. Res.*, vol. 271, no. 1, pp. 43–54, 1995.
- [11] N. C. Carpita, J. Ralph, and M. C. McCann, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Second Edi. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex:

John Wiley & Sons, Ltd Registered, 2015.

- [12] P. B. S. Albuquerque *et al.*, “Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 104, no. 1, pp. 127–134, 2014.
- [13] D. a Navarro, D. a Navarro, A. S. Cerezo, A. S. Cerezo, C. a Stortz, and C. a Stortz, “NMR spectroscopy and chemical studies of an arabinan-rich system from the endosperm of the seed of,” *Carbohydr. Res.*, vol. 337, pp. 255–263, 2002.
- [14] P. V Mikshina, O. P. Gurjanov, F. K. Mukhitova, A. A. Petrova, A. S. Shashkov, and T. A. Gorshkova, “Structural details of pectic galactan from the secondary cell walls of flax (*Linum usitatissimum* L .) phloem fibres,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 1, pp. 853–861, 2012.
- [15] E. G. Shakhmatov, E. V. Udoratina, K. V. Atukmaev, and E. N. Makarova, “Extraction and structural characteristics of pectic polysaccharides from *Abies sibirica* L,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 123, pp. 228–236, 2015.
- [16] E. N. Makarova, E. G. Shakhmatov, and V. A. Belyy, “Structural characteristics of oxalate-soluble polysaccharides of Sosnowsky’s hogweed (*Heracleum sosnowskyi* Manden),” *Carbohydr. Polym.*, vol. 153, pp. 66–77, 2016.
- [17] V. Srivastava, L. S. McKee, and V. Bulone, “Plant Cell Walls,” *eLS*, no. July, pp. 1–17, 2017.
- [18] M. I. Bilan, E. V. Vinogradova, A. S. Shashkov, and A. I. Usov, “Structure of a highly pyruvylated galactan sulfate from the Pacific green alga *Codium yezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta),” *Carbohydr. Res.*, vol. 342, no. 3–4, pp. 586–596, 2007.
- [19] A. Redondo-Cuenca, M. J. Villanueva-Suárez, and I. Mateos-Aparicio, “Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods,” *Food Chem.*, vol. 108, no. 3, pp. 1099–1105, 2008.
- [20] X. Saldivar, Y. Wang, P. Chen, and A. Hou, “Changes in chemical composition during soybean seed development,” *Food Chem.*, vol. 124, no. 4, pp. 1369–1375, 2011.
- [21] A. M. Abdelghany *et al.*, “Profiling of seed fatty acid composition in 1025 Chinese soybean accessions from diverse ecoregions,” *Crop J.*, vol. 8, no. 4, pp. 635–644, 2020.
- [22] B. Romero, F. M. Dillon, and J. A. Zavala, “Different soybean cultivars respond differentially to damage in a herbivore-specific manner and decrease herbivore performance,” *Arthropod. Plant. Interact.*, vol. 14, no. 1, pp. 89–99, 2020.
- [23] J. A. Zavala, C. A. Mazza, F. M. Dillon, H. D. Chludil, and C. L. Ballaré,

- "Soybean resistance to stink bugs (*Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii*) increases with exposure to solar UV-B radiation and correlates with isoflavonoid content in pods under field conditions," *Plant Cell Environ.*, vol. 38, no. 5, pp. 920–928, 2015.
- [24] A. Peaucelle, S. Braybrook, and H. Höfte, "Cell wall mechanics and growth control in plants: The role of pectins revisited," *Front. Plant Sci.*, vol. 3, no. JUN, pp. 1–6, 2012.
- [25] J. Ralph, R. D. Hatfield, J. H. Grabber, H. J. G. Jung, S. Quideau, and R. F. Helm, "Cell Wall Cross-Linking in Grasses by Ferulates and Diferulates," *ACS Symp. Ser.*, vol. 697, no. July 1998, pp. 209–236, 1998.
- [26] E. R. Lampugnani, G. A. Khan, M. Somssich, and S. Persson, "Building a plant cell wall at a glance," *J. Cell Sci.*, vol. 131, no. 2, 2018.
- [27] L. B. Davin and N. G. Lewis, "Lignin primary structures and dirigent sites," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 16, no. 4, pp. 407–415, 2005.
- [28] J. Sommer-Knudsen, A. Bacic, and A. E. Clarke, "Hydroxyproline-rich plant glycoproteins," *Phytochemistry*, vol. 47, no. 4, pp. 483–497, 1998.
- [29] G. I. Cassab, "Plant cell wall proteins," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 49, pp. 281–309, 1998.
- [30] H. Stegemann and K. Stalder, "Determination of Hydroxyproline," *Clin. Chim. Acta*, vol. 18, pp. 267–273, 1967.
- [31] M. Wiederstein, S. Baumgartner, and K. Lauter, "Soybean (*Glycine max*) allergens—A Review on an Outstanding Plant Food with Allergenic Potential," *ACS Food Sci. Technol.*, vol. 3, no. 3, pp. 363–378, 2023.
- [32] M. Thrane, P. V. Paulsen, M. W. Orcutt, and T. M. Krieger, "Soy Protein," in *Sustainable Protein Sources*, S. R. Nadathur, L. Scanlin, and J. P. D. Wanasundara, Eds. Elsevier, 2017, pp. 23–45.
- [33] G. O. Aspinall, R. Begbie, A. Hamilton, and J. N. C. Whyte, "Polysaccharides of Soy-beans. Part III Extraction and Fractionation of Polysaccharides from Cotyledon Meal," *J. Chem. Soc. C Org.*, no. 0, pp. 1065–1070, 1967.
- [34] G. O. Aspinall, I. W. Cottrell, S. V. Egan, I. M. Morrison, and J. N. C. Whyte, "Polysaccharides of Soy-beans. Part IV. Partial Hydrolysis of the Acidic Polysaccharide Complex from Cotyledon Meal," *J. Chem. Soc. C Org.*, no. 0, pp. 1071–1080, 1967.
- [35] G. O. Aspinall and I. W. Cottrell, "Polysaccharides of Soybeans. VI. Neutral Polysaccharides from Cotyledon Meal," *Can. J. Chem.*, vol. 49, no. 7, pp. 1019–1022, 1971.
- [36] M. S. Buckeridge, "Seed cell wall storage polysaccharides: Models to

- understand cell wall biosynthesis and degradation,” *Plant Physiol.*, vol. 154, no. 3, pp. 1017–1023, 2010.
- [37] H. M. M.H., “Elucidation of the chemical fine structure of polysaccharides from soybean and maize kernal cell walls.”
- [38] M. M. H. Huisman, H. A. Schols, and A. G. J. Voragen, “Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterisation,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 37, no. 1, pp. 87–95, 1998.
- [39] M. C. Schuman and I. T. Baldwin, “The Layers of Plant Responses to Insect Herbivores,” *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 61, pp. 373–394, 2016.
- [40] R. Giacometti *et al.*, “Early perception of stink bug damage in developing seeds of field-grown soybean induces chemical defences and reduces bug attack,” *Pest Manag. Sci.*, vol. 72, no. 8, pp. 1585–1594, 2016.
- [41] B. O. Petersen, M. Saddik, B. Lindberg, O. Hindsgaul, and S. Meier, “NMR characterization of chemically synthesized branched α -dextrin model compounds,” *Carbohydr. Res.*, vol. 403, pp. 149–156, 2015.
- [42] I. Ciucanu and F. Kerek, “A Simple and Rapid Method for the Permethylation of Carbohydrates,” *Carbohydr. Res.*, vol. 131, pp. 209–217, 1984.
- [43] L. Petruš, D. G. Gray, and J. N. BeMiller, “Homogeneous alkylation of cellulose in lithium chloride/dimethyl sulfoxide solvent with dimsyl sodium activation. A proposal for the mechanism of cellulose dissolution in LiCl/Me₂SO,” *Carbohydr. Res.*, vol. 268, no. 2, pp. 319–323, 1995.
- [44] M. S. Buckeridge, S. M. C. Dietrich, and D. U. de Lima, “Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds,” *Dev. Crop Sci.*, vol. 26, no. C, pp. 283–316, 2000.
- [45] P. J. Wood and I. R. Siddiqui, “Determination of Methanol and Its Application to Measurement of Pectin Ester Content and Pectin Methyl Esterase Activity,” *Anal. Biochem.*, vol. 39, pp. 418–428, 1971.
- [46] R. R. Vincent and M. A. K. Williams, “Microrheological investigations give insights into the microstructure and functionality of pectin gels,” *Carbohydr. Res.*, vol. 344, no. 14, pp. 1863–1871, 2009.
- [47] J. L. Koch, M. Horbowicz, R. L. Obendorf, J. L. Koch, M. Horbowicz, and R. L. Obendorf, “Methanol , pectin and pectinesterase changes during soybean seed maturation Methanol , pectin and pectinesterase changes during soybean seed maturation,” no. February 2007, 2013.
- [48] S. Singh, G. Singh, and S. K. Arya, “Mannans: An overview of properties and application in food products,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 119, pp. 79–95, 2018.
- [49] A. Ebringerová and H. Thomas, “Hemicellulose,” no. August, pp. 1–67, 2005.

- [50] B. L. Ridley, M. A. O'Neill, and D. Mohnen, "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling," *Phytochemistry*, vol. 57, pp. 929–967, 2001.
- [51] M. M. H. Huisman, K. G. C. Weel, H. A. Schols, and A. G. J. Voragen, "Xyloglucan from soybean (*Glycine max*) meal is composed of XXXG-type building units," *Carbohydr. Polym.*, vol. 42, no. 2, pp. 185–191, 2000.
- [52] G. O. Aspinall and J. N. C. Whyte, "Polysaccharides of soy-beans. Part I. Galactomannans from the hulls," *J. Chem. Soc.*, no. 5058, pp. 5051–5057, 1964.
- [53] D. A. Dempsey, J. Shah, and D. F. Klessig, "Salicylic Acid and Disease Resistance in Plants," *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.*, vol. 18, no. 4, pp. 547–575, 1999.
- [54] O. Thulke and U. Conrath, "Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley," *Plant J.*, vol. 14, no. 1, pp. 35–42, 1998.

CAPÍTULO 6

Conclusiones generales y perspectivas.

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue estudiar las paredes celulares de las semillas de la planta de soja desde un punto de vista de la química de hidratos de carbono que involucra los polisacáridos que poseen función estructural, es decir, que forman los diferentes tejidos de las semillas en el estadio más susceptible a los herbívoros, como la chinche verde, *Nezara viridula*. El estudio está enmarcado en un sistema de interacción planta-insecto, que además de caracterizar estructuralmente los polisacáridos de pared, busca comparar y cuantificar diferencias estructurales y constitutivas de dichos polisacáridos estructurales de semillas obtenidas en diferentes condiciones, con el objetivo de poder aportar a la química ecológica, que busca describir relaciones que aporten al entendimiento de las respuestas vegetales a la herbivoría.

Caracterización estructural de los polisacáridos componentes de tegumentos

Para esta investigación se procedió a trabajar en un ecosistema natural (a campo) cosechando el material vegetal en el estadio reproductivo conocido como R6 (semillas completamente llenas) [1], que corresponde a un estadio previo a la maduración completa de la semilla. Para desarrollar una correcta caracterización de los hidratos de carbono de un material vegetal se procedió con un análisis clásico para material vegetal, que involucra las herramientas y determinaciones necesarias para llevar adelante la caracterización.

En la Figura 6.1 se presenta un diagrama resumen del proceso de análisis de las semillas de soja (adaptado de Huisman [2]).

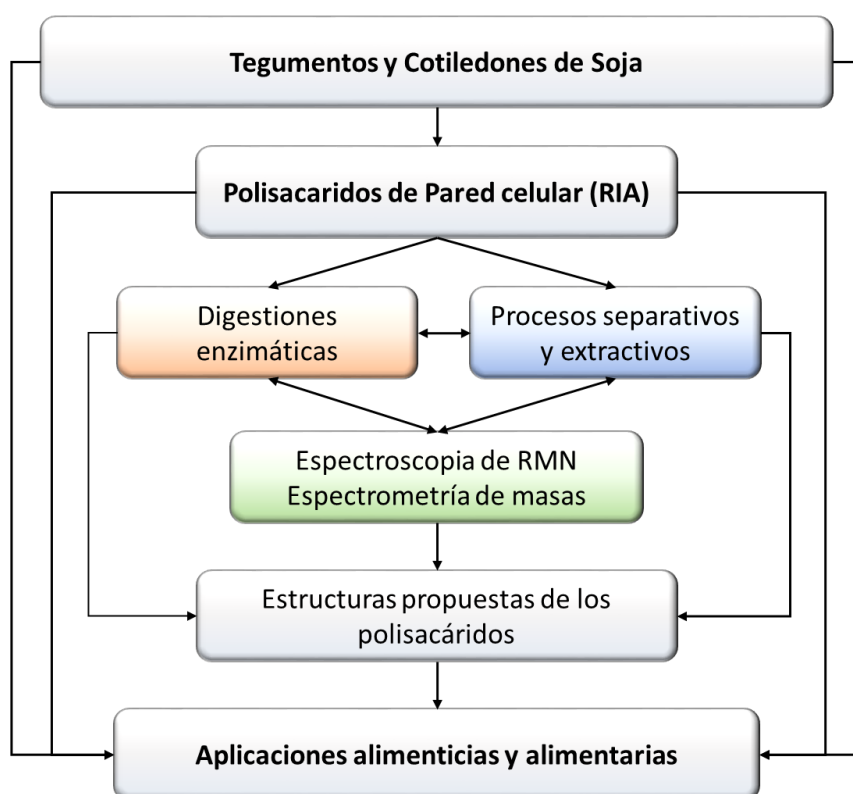


Figura 6.1: Diagrama de procedimientos y flujo de procedimientos para el estudio detallado de semillas de soja.

La extracción secuencial aplicada a los tegumentos de la variedad Williams, se llevó a cabo de manera efectiva, esto quiere decir que, fueron separados de la matriz de la pared celular, en los pasos extractivos, diferentes conjuntos de polisacáridos. De este modo, se logró caracterizar todos estos grupos de polisacáridos, descritos teóricamente en el capítulo introductorio. En la Figura 6.2 se muestra los polisacáridos más abundantes de cada paso extractivo realizado (1T a 6T).

En los extractos acuosos se obtuvieron principalmente pectinas, HG y RGI, destaca la presencia de GM (hemicelulosa), muy solubles y, por lo tanto, con un alto grado de sustitución con una relación molar, Gal:Man de **1:1,8** [3]. Los extractos de CDTA también se encontraron formados por pectinas, pero casi en su totalidad por HG y apenas una pequeña cantidad de RGI. De manera similar, los extractos 3T y 4T estaban constituidos principalmente por pectinas, a medida que avanza la extracción secuencial disminuye la proporción de HG y aumenta la de RGI. Además, comenzaron a aparecer pequeñas cantidades de hemicelulosas, como GM y XG que van aumentando en proporción a medida que continúa la extracción secuencial. Destacan

los cambios en la cantidad de cadenas laterales de los RGI, los arabinanos unidos por la posición 5 van aumentando y en los extractos 4T llegan a constituir cerca de 30% del total de polisacáridos en TSA.

5T contiene mayoritariamente hemicelulosas, GM, GX y XG, aunque también se detectaron HG y RGI, en menor razón. La diferencia en solubilidad de estas cadenas radicaría en su grado de ramificación y sustitución [4], en el caso de los GM, a diferencia de los extraídos con agua, o con carbonato, aquellos obtenidos con KOH 4 M, se encuentran menos sustituidos, con relación molar Gal:Man, **1:3,0**.

Finalmente, en el residuo final, prevalece la celulosa que corresponde a más del 70% del total del residuo, junto con cantidades menores de HG, GM y GX, muy insolubles y poco sustituidos.

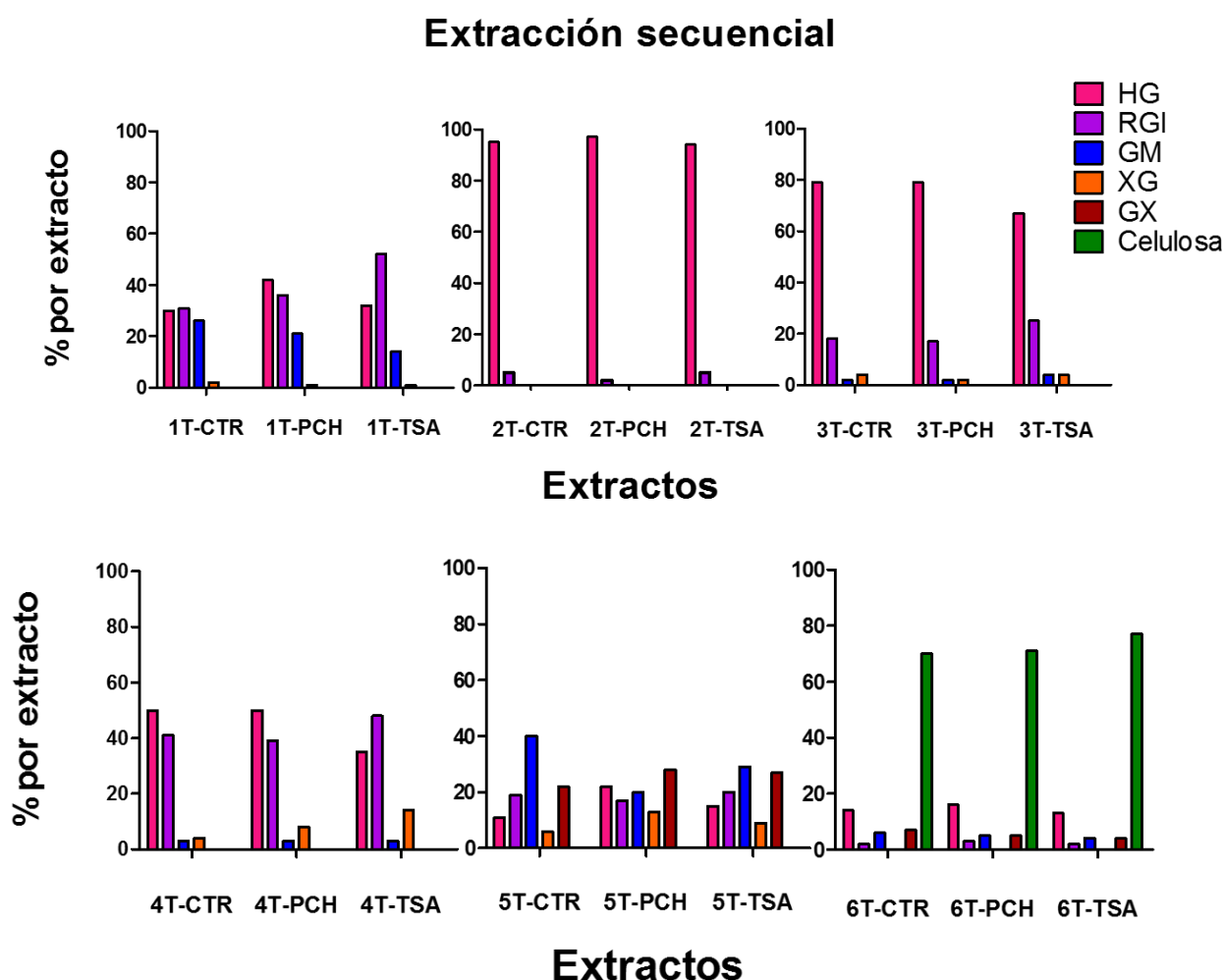


Figura 6.2: Estimación de la composición de los diferentes extractos y del residuo final del procedimiento de extracción para tegumentos de soja.

La diferencia en las proporciones atribuidas a cada tratamiento (picado, salicílico o control) realizado sobre el tegumento se puede calcular observando el porcentaje total en peso respecto a RIA. En la Figura 6.3 se muestran la composición total de cada tratamiento realizado respecto a los polisacáridos encontrados.

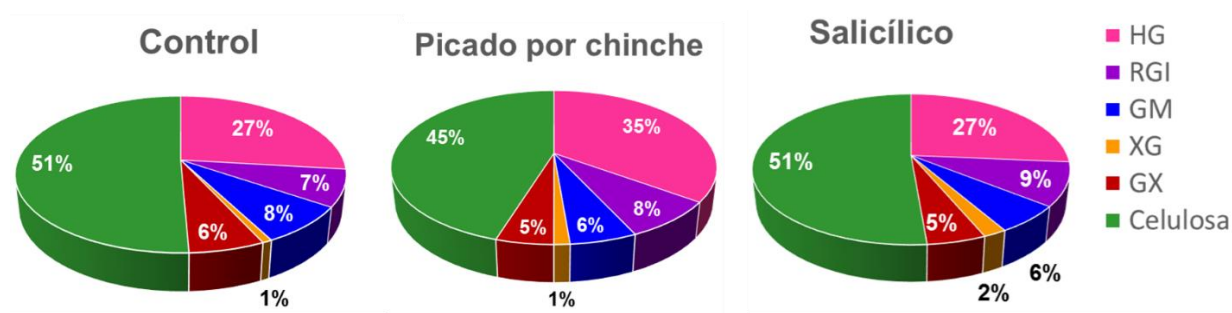


Figura 6.3: Estimación del total de polisacáridos obtenido de cada tratamiento para tegumentos de soja.

Como resultado, destacan diferencias en la contribución de celulosa, homogalacturonanos y galactomananos. En resumen, se detectaron diferencias importantes entre tratamientos que sugieren diferencias en la reestructuración de la pared celular de los tegumentos como consecuencia del daño causado por la chinche. Además, el tratamiento con SA produce en la mayoría de los casos, cambios similares, pudiendo ser ésta una prueba del rol de la hormona en los cambios en la estructura de la pared celular. Estudios previos mostraron que la picadura de la chinche induce la acumulación de altos niveles de SA en las semillas dañadas [5].

La importante disminución en el contenido de celulosa, a expensas de los HG, sugiere que la picadura de la chinche verde podría producir un ablandamiento en las paredes celulares de los tegumentos, como producto de la acción enzimática de la saliva de la chinche [6], [7].

Resultados de los ensayos sobre tegumento con saliva de chinche

Los resultados de las digestiones enzimáticas mostraron que se logró degradar parcialmente los polisacáridos de pared celular, tanto en R-CTR como en R-PCH por acción de la saliva, lo que evidencia su actividad sobre los polisacáridos de tegumentos. Considerando los cambios obtenidos en el análisis de saliva sobre RIA de tegumentos se supone actividad β -glucanasas y β -mananasas

Los resultados de los tratamientos con saliva sobre RIA de CTR, PCH y TSA se muestran en la Figura 6.4, en la que se observa cómo cambia la composición de los polisacáridos totales debido a la acción de la saliva con actividad en las enzimas mencionadas, al mostrar disminución en el contenido de celulosa y galactomanos [8].

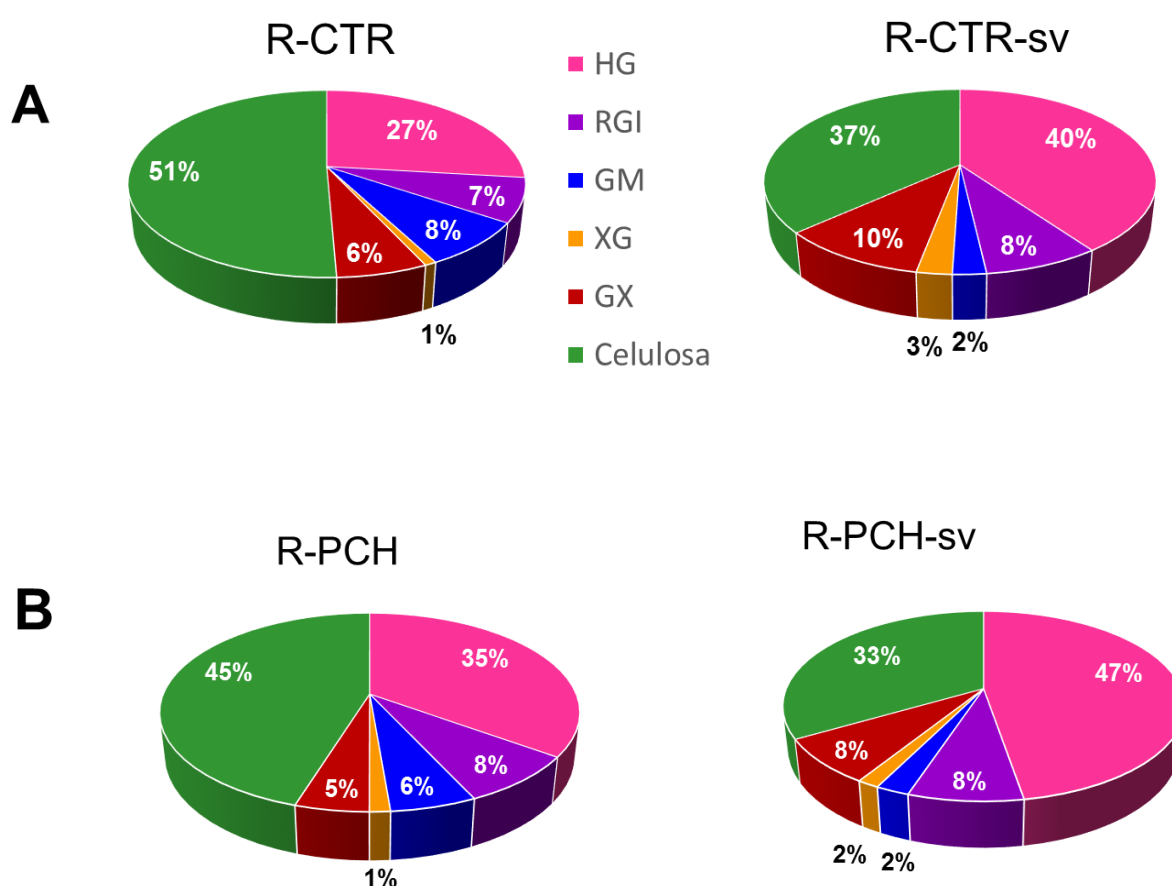


Figura 6.4: Resultados de la digestión enzimática en la composición para tegumentos de soja.

Este análisis con saliva demuestra que, debido al ataque de chinches, se producen cambios en las paredes celulares de los tegumentos durante el estadio R5,

además refuerza lo reportado como resultado de la picadura de la chinche a campo sobre las semillas. Estos resultados son muy novedosos y contribuyen a la caracterización y composición de la saliva de la chinche verde. Giacometti et. al sólo habían obtenido resultados moleculares anteriormente para *Nezara viridula* que indicaban un aumento de la expresión de los genes de expansina, xiloglucano endo-transferasa, poligalacturonasa y pectato-liasas [6]. El mérito de los resultados de esta tesis es que son directos sobre el material de pared celular. Las dificultades experimentales fueron muchas, sin embargo, estos resultados son muy claros y cuantitativamente relevantes.

Caracterización estructural de los polisacáridos componentes de cotiledones

Los polisacáridos mayoritarios de los cotiledones estudiados en R6, son arabinogalactanos y almidón, ambos corresponden a polisacáridos de reserva vegetal característicos para semillas de leguminosas [9], si bien, a diferencia del almidón, los arabinogalactanos son parte de las paredes celulares [10]. Todos los extractos de pared celular de cotiledones contienen importantes cantidades de pectinas, principalmente RGI, con predominio de arabinogalactanos, compuestos de cadenas de (1→4)-β-D-galactanos y (1→5)-α-L-arabinanos altamente ramificados en las posiciones 2, 3 y 2,3.

Las diferencias más significativas entre tratamientos se observaron en el contenido de celulosa menor en PCH y TSA, respecto a control y en el contenido y distribución de Ara y Gal en el tratamiento con ácido salicílico (SA) exógeno mostraron una diferencia clara en el contenido de Ara y Gal, respecto a control (Figura 6.5). Ara y Gal corresponden en cotiledones a monosacáridos constitutivos de las cadenas laterales de los dominios RGI. Esta diferencia observada podría ser un precedente en los efectos producidos por ácido salicílico sobre la estructura de paredes celulares. Al igual que en tegumentos, estos efectos podrían ser consecuencia del mecanismo de defensa de la planta como resultado de la inducción con hormona S.

Total monosacáridos de pared en RIA

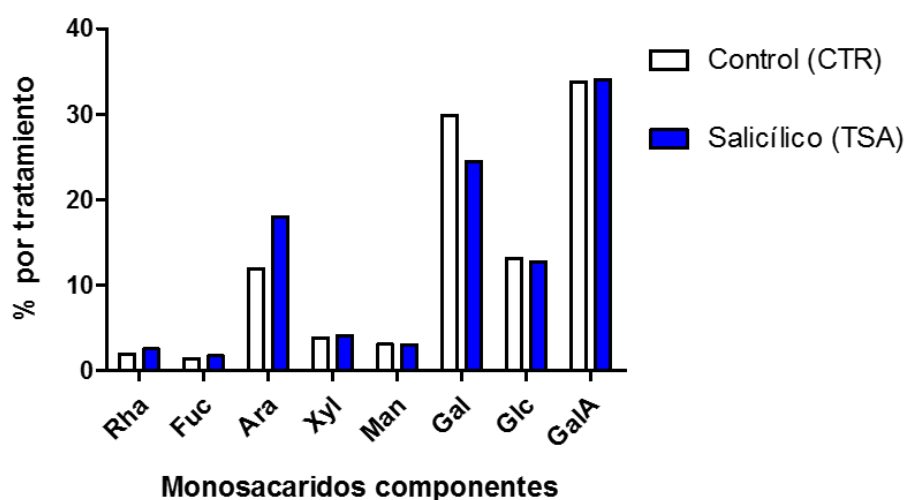


Figura 5.11: Contenido total de monosacáridos constituyentes de TSA y CTR de cotiledones de la variedad Williams.

Consideraciones finales

La **extracción secuencial** fue efectiva para fraccionar la pared celular de **tegumentos**, a diferencia de las paredes de **cotiledones**, en las que se obtuvieron extractos y fracciones heterogéneas a lo largo de toda la extracción, haciéndola menos eficiente. Este efecto se debe a la naturaleza de los cotiledones de leguminosas, en los cuales los polisacáridos son destinados a actuar como reserva energética para la germinación [11]

Los extractos enriquecidos en pectinas (acuosos y los obtenidos con soluciones de CDTA y con tanto de cotiledón como de tegumento, presentaron cambios en la proporción y distribución e interacciones diferentes entre pectinas para los tratamientos con **SA** con respecto a PCH y CTR.

Existe una diferencia notable en los contenidos totales de **celulosa** de **tegumentos** (y también cotiledones) de las semillas picadas por las chinches con

respecto a CTR y TSA, lo cual concuerda con lo reportado en literatura sobre la respuesta vegetal a la estrés biótico [12], [13], incluyendo patógenos y herbívoros . Como consecuencia del ataque de chinches, se producen cambios significativos en las paredes celulares, que pueden medirse utilizando herramientas de química de polisacáridos y no solo por diferencias en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de pared celular.

Finalmente, los ensayos realizados con saliva de chinche, confirman lo expresado en la hipótesis respecto a los cambios en pared, por lo que este estudio prueba que, como consecuencia del ataque de chinches, se producen **cambios** significativos en las **paredes celulares**, que pueden medirse con determinaciones de química de polisacáridos.

Además, la diferente degradación sufrida por los residuos sugiere diferencias en la reorganización dinámica de la pared celular de tegumentos, como consecuencia del daño ocasionado por las chinches.

Si bien, este estudio descriptivo entrega suficientes datos para contestar las preguntas iniciales de la hipótesis planteada en esta tesis, surgen a su vez, nuevas dudas y la necesidad de comprender de manera más completa los detalles de la interacción entre el cultivo de soja y la chinche verde.

La siguiente pregunta a resolver es si acaso estos cambios en la estructura de la pared celular de los cotiledones forman parte de los mecanismos de defensa de la semilla o de los mecanismos implicados en el ataque de los insectos. Parte de una perspectiva de este estudio químico-ambiental es profundizar continuamente en las implicancias de determinaciones descriptas.

Referencias

- [1] R. Giacometti *et al.*, “Early perception of stink bug damage in developing seeds of field-grown soybean induces chemical defences and reduces bug attack,” *Pest Manag. Sci.*, vol. 72, no. 8, pp. 1585–1594, 2016.
- [2] M. M. H. Huisman, “Elucidation of the chemical fine structure of polysaccharides from soybean and maize kernel cell walls,” Wageningen University, 2000.
- [3] S. Singh, G. Singh, and S. K. Arya, “Mannans: An overview of properties and application in food products,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 119, pp. 79–95, 2018.
- [4] M. Q. Guo, X. Hu, C. Wang, and L. Ai, “Polysaccharides: Structure and Solubility,” *Solubility of Polysaccharides*, 2017.
- [5] R. Giacometti *et al.*, “Early perception of stink bug damage in developing seeds of field-grown soybean induces chemical defences and reduces bug attack,” *Pest Manag. Sci.*, vol. 72, no. 8, pp. 1585–1594, 2016.
- [6] R. Giacometti, N. Ilina, P. A. Eduardo, and J. A. Zavala, “Stink bug *Nezara viridula* sustains late MAPKs phosphorylation status and induces expression of genes related with cell wall rearrangement in developing soybean seeds,” *Arthropod. Plant. Interact.*, vol. 12, no. 4, pp. 531–541, 2018.
- [7] R. Giacometti, V. Jacobi, F. Kronberg, C. Panagos, A. S. Edison, and J. A. Zavala, “Digestive activity and organic compounds of *Nezara viridula* watery saliva induce defensive soybean seed responses,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12, 2020.
- [8] A. Al Loman and L. K. Ju, “Enzyme-based processing of soybean carbohydrate: Recent developments and future prospects,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 106, no. June, pp. 35–47, 2017.
- [9] M. S. Buckeridge, “Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation,” *Plant Physiol.*, vol. 154, no. 3, pp. 1017–1023, 2010.

- [10] C. T. M. Fransen, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenthart, H. A. Schols, and A. G. J. Voragen, "The CDTA-Soluble Pectic Substances from Soybean Meal are Composed of Rhamnogalacturonan and Xylogalacturonan but not," vol. 58, pp. 279–294, 2001.
- [11] A. Ikram *et al.*, "Nutritional and end-use perspectives of sprouted grains: A comprehensive review," *Food Sci. Nutr.*, vol. 9, no. 8, pp. 4617–4628, 2021.
- [12] R. Sasidharan, L. A. C. J. Voesenek, and R. Pierik, "Cell wall modifying proteins mediate plant acclimatization to biotic and abiotic stresses," *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.*, vol. 30, no. 6, pp. 548–562, 2011.
- [13] C. Silva-Sanzana, J. M. Estevez, and F. Blanco-Herrera, "Influence of cell wall polymers and their modifying enzymes during plant–aphid interactions," *J. Exp. Bot.*, vol. 71, no. 13, pp. 3854–3864, 2020.