

## EFFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL CBM DEL GEN DE EXPANSINA 1 (LEEXP1) DE TOMATE SOBRE LA CALIDAD Y EL ABLANDAMIENTO DEL FRUTO

Mauro A. Perini<sup>1,2</sup>, Ignacio N. Sin<sup>1,2</sup>, Gustavo A. Martínez<sup>2,3</sup>, P. Marcos Civello<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> INFIVE (CONICET-UNLP), Diagonal 113 N° 495, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Exactas UNLP, Calle 115 y 47, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup> IIB-INTECH (CONICET-UNSAM), Av. Intendente Marino Km 8,200 CC 164 (7130) Chascomús, Prov. de Buenos Aires, Argentina.

maperini@agro.unlp.edu.ar

**PALABRAS CLAVE:** Tomate, Ablandamiento, Poscosecha.

Uno de los principales factores determinantes de la calidad y vida poscosecha de un fruto es su firmeza. La misma está condicionada por varios factores, siendo uno de los principales la rigidez mecánica determinada por la pared celular [1].

Durante la maduración, intervienen numerosas enzimas y proteínas que degradan y remodelan la pared celular, y un aspecto común de la estructura de la mayoría de estas proteínas es su organización modular. Incluyen, típicamente, un dominio catalítico característico de cada enzima y, uno o más dominios de unión a carbohidratos (CBM), unidos por una cadena poco estructurada. Un CBM se define como una secuencia contigua de aminoácidos dentro de una enzima activa sobre carbohidratos, que posee un plegamiento característico y la capacidad de unirse al sustrato [2], aunque carece de actividad enzimática.

En plantas, se ha informado la presencia de CBMs putativos en endoglucanasas [3,4] y también en expansinas [5]. Estas últimas, son proteínas carentes de actividad hidrolítica conocida, pero pueden provocar la extensión de paredes celulares aisladas, probablemente por su hipotética capacidad para romper interacciones no covalentes entre hemicelulosas y celulosa [6]. Asimismo, se ha postulado que su actividad provoca una relajación en la estructura de la pared, facilitando el acceso de otras enzimas a sus sustratos [7]. En tomate, la sobreexpresión de *LeExp1* provocó un mayor ablandamiento del fruto, mientras que la supresión del gen retrasó el ablandamiento [8].

De esta manera, surgió la idea de elaborar una estrategia que permita controlar la degradación de la pared celular y el ablandamiento de frutos, mediante la sobreexpresión de CBMs en la pared celular, empleando tomate como sistema modelo.

Se llevó a cabo el clonado de CBM-*LeExp1* en tomate (*Solanum lycopersicum* var. Ailsa Craig). Para ello, se hizo uso del sistema Gateway®, usándose como vector de entrada al pDONR221 (Invitrogen). El vector de destino seleccionado fue el pK7WG2D.1. El mismo es un vector binario y se utiliza para generar una sobreexpresión de la proteína de interés con un marcador visible de selección (GFP). Por transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* y posterior cultivo *in vitro* se generaron líneas transformantes (generación F0).

Para la caracterización preliminar de los frutos (plantas F1), se cosecharon tomates de líneas transgénicas y controles en el estadio verde maduro y se realizó un ensayo poscosecha con los mismos. Se evaluó la coloración externa de los frutos con un colorímetro (Minolta CR300), y la firmeza empleando un texturómetro (TextureAnalyzer, TA.XTPlus)

equipado con una sonda plana de 25 mm de diámetro. En este último ensayo, se registró la máxima fuerza desarrollada al comprimir el fruto hasta provocar una deformación de 0,5mm [8].

Como conclusión preliminar, se puede mencionar que los resultados con los frutos han arrojado datos que muestran un aumento de la firmeza de los frutos sobreexpresantes respecto a los controles.

### REFERENCIAS

- [1] F.R. Harker, R.J. Redgwell, I.C. Hallett, S.H. Murray. "Texture of fresh fruit". *Horticultural Reviews* 20, **1997**, 121-224.
- [2] P.M. Coutinho, B. Henrissat. "Recent advances in carbohydrate bioengineering" en *The Royal Society of Chemistry*. Gilbert HG et al., (ed.), Cambridge, United Kingdom. **1999**. 3-12.
- [3] C. Catala, A.B. Bennett. "Cloning and sequence analysis of *Tomcel8*: a new plant endo-beta-1,4-D-glucanase gene, encoding a protein with a putative carbohydrate binding domain". *Plant Physiol.* 118, **1998**, 1535.
- [4] L. Trainotti, S. Spolaore, A. Pavanello, B. Baldan, G. Casadoro. "A novel E-type endo-b-1,4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits". *Plant Mol. Biol.* 40, **1999**, 323-332.
- [5] N.H. Yennawar, L.C. Li, D.M. Dudsinski, A. Tabuchi, D.J. Cosgrove. "Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m1*), a beta-expansin and group-1 pollen allergen from maize." *PNAS* 103. **2006**, 14664-14671.
- [6] S. McQueen-Mason, D. Cosgrove. "Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding" *Plant Physiol* 107. **1995**. 87-100.
- [7] J.K.C. Rose, H.H. Lee, A.B. Bennett. "Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated". *Proc Natl Acad Sci* 94. **1997**. 5955-5960.
- [8] D.A. Brummell, M.H. Harpster, P.M. Civello, A.B. Bennett, P. Dunsmuir. "Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening". *The Plant Cell* 11. **1999**. 2203-2216.