



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

“Caracterización de módulos de unión a carbohidratos (CBM) en frutilla. Efecto de su sobreexpresión sobre el fruto”

Tesista: Lic. Ignacio Nicolás Sin

Director: Dr. Pedro Marcos Civello

Codirector: Dr. Gustavo Adolfo Martínez

2017

Cursos de posgrado realizados

Durante el desarrollo de la tesis se han realizado 5 (cinco) cursos de posgrado, 4 de ellos específicos (9 créditos en total) y 1 general (3 créditos), cumpliendo con la cuota de 12 créditos establecida por el reglamento bajo el cual se rige la presente tesis doctoral:

- **Estrategias de Purificación de Proteínas Vegetales (*Formación específica*)**
CIPROVE, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
Del 31 de octubre al 7 de noviembre de 2016.
Carga horaria. 45 hs.
Con examen, aprobado
Créditos: 3
- **Bioestadística I y II (*Formación específica*)**
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Prosecretaría de posgrado Universidad Nacional de La Plata.
Del 27 al 30 de octubre y del 1 al 4 de diciembre 2015.
Carga horaria. 90 hs.
Con examen, aprobado (Nota: 10)
Créditos: 1
- **Modelamiento Molecular de Proteínas (*Formación específica*)**
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
Marzo 2013
Carga horaria. 15 hs.
Con examen, aprobado (sin calificación numérica)
Créditos 1
- **Expresión de Proteínas Recombinantes 2013 (*Formación específica*)**
Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH, CONICET).
Universidad Nacional de General San Martín
Febrero 2013
Carga horaria. 48 hs.
Con examen, aprobado (Nota: 10)
Créditos: 4
- **Introducción a la Filosofía de las Ciencias (*Formación general*)**
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
Primer Semestre 2012
Directora: Olimpia Lombardi
Carga horaria. 48 hs.
Con examen, aprobado (sin calificación numérica)
Créditos: 3

Publicaciones

Parte de los resultados obtenidos en la presente tesis han sido publicados en congresos y jornadas de índole tanto nacional como internacional y, en revistas científicas con referato internacional. También se ha colaborado con miembros del grupo de investigación realizando trabajos por fuera del plan de la presente tesis, pudiendo publicarse en revistas con referato internacional.

Trabajos publicados en revistas internacionales (inherentes al plan de tesis)

- **Ignacio N. Sin**, Mauro A. Perini, Gustavo A. Martínez y P. Marcos, Civello. “*Analysis of the carbohydrate-binding-module from *Fragaria x ananassa* α -L-arabinofuranosidase 1*”. *Plant Physiology and Biochemistry* 107 (2016) 96-103.

Abstract

α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) are enzymes involved in the catabolism of several cell-wall polysaccharides such as pectins and hemicelluloses, catalyzing the hydrolysis of terminal nonreducing α -L-arabinofuranosil residues. Bioinformatic analysis of the aminoacidic sequences of *Fragaria x ananassa* α -L-arabinofuranosidases predict a putative carbohydrate-binding-module of the family CBM_4_9, associated to a wide range of carbohydrate affinities. In this study, we report the characterization of the binding affinity profile to different cell wall polysaccharides of the putative CBM of α -L-arabinofuranosidase 1 from *Fragaria x ananassa* (CBM-FaARA1). The sequence encoding for the putative CBM was cloned and expressed in *Escherichia coli*, and the resultant recombinant protein was purified from inclusion bodies by a Nickel affinity chromatography under denaturing conditions. The refolded recombinant protein was then subjected to binding assays and affinity gel electrophoresis, which indicated its ability to bind cellulose and also high affinity for homogalacturonans.

- Mauro A. Perini, **Ignacio N. Sin**, Gustavo A. Martínez y P. Marcos, Civello. “*Measurement of expansin activity and plant cell wall creep by using a commercial texture analyzer*”. *Electronic journal of biotechnology* 26 (2017) 12-19.

Abstract

Expansins play an important role in cell wall metabolism and fruit softening. Determination of expansin activity is a challenging problem since it depends on measuring cell wall properties by using “*ad hoc*” extensometers, a fact that has strongly restricted its study. Then, the objective of the work was to adapt a methodology to measure cell wall creep and expansin activity using a commercial texture meter, equipped with miniature tensile grips and an easy-to-build “*ad hoc*” cuvette.

Hypocotyls acid growth and expansin activity were evaluated by measuring cell wall creep at pH 4.5. Acid growth was assessed by the extension of native-hypocotyls, while a reconstitution assay was done to measure expansin activity in plant extracts, using heat-inactivated cucumber or tomato hypocotyls as cell wall matrixes.

Expansin activity was detected in protein extracts from cucumber hypocotyls, tomato and strawberry fruits. Significantly different expansin activities were found in strawberry at different ripening stages.

Trabajos publicados en revistas internacionales (en colaboración)

- Mauro A. Perini, **Ignacio N. Sin**, Andrea Reyes Jara, Ma. Eugenia Gómez Lobato, P. Marcos, Civello y Gustavo A. Martínez. "Hot water treatments performed in the base of the stem reduce postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L. Var *italica*) heads stored at 20 °C". LWT - Food Science and Technology 77 (2017) 314-322.

Abstract

Heat treatment causes a moderate and reversible stress that interrupts the normal metabolism (senescence or fruit ripening) of the product. While there are many reports about heat treatments on broccoli heads, it has not been studied the effect of subjecting only the broccoli stems to thermal treatments. One of the main reasons to study this is that in the stem cutting area the hormone ethylene is actively produced. Different hot water treatments were performed at the first 5 cm of broccoli stems with different combinations of time-temperature. Treatment carried out at 50 °C for 3 min was chosen for further analysis of different quality and senescence parameters, taking into account that broccoli heads presented a delayed change in hue and L values when compared with controls during storage. While control heads looked yellow, heat-treated samples retained most of their green color. Further, control heads presented higher weight lost, lower total and soluble protein, lower total soluble sugar after 3 or 5 storage days, giving evidence that the heat treatment just on the stem contributes to the delay of broccoli senescence and an overall better quality of the product during storage.

- Mauro A. Perini, **Ignacio N. Sin**, Natalia M. Villarreal, María Marina, Ann L. Powell, Gustavo A. Martínez y P. Marcos, Civello. "Overexpression of the carbohydrate binding module from *Solanum lycopersicum* Expansin 1 (*Sl-EXP1*) modifies tomato fruit firmness and *Botrytis cinerea* susceptibility". Plant Physiology and Biochemistry. (manuscrito aceptado, actualmente en prensa, disponible on-line desde el 2/02/2017).

Abstract

Firmness, one of the major determinants of postharvest quality and shelf life of fruits, is determined mainly by the mechanical resistance imposed by the plant cell wall. Several strategies have been pursued to control the loss of fruit firmness during storage. Most of the approaches have been to suppress the expression of key enzymes involved in the cell wall metabolism.

Expansins are proteins involved in non-hydrolytic plant cell wall metabolism, especially for essential processes where relaxation of the cell wall is necessary, such as during fruit development and ripening. Expansin proteins have a characteristic putative catalytic domain and one carbohydrate-binding module (CBM).

In this report we analyze the possibility that overexpressing the carbohydrate binding module of a fruit-specific expansin is appropriate for developing a general strategy to control cell wall degradation. Transgenic tomato lines constitutively overexpressing the carbohydrate binding module of *Solanum lycopersicum* expansin 1 (CBM-SlExp1) in the cell wall were generated and the phenotypes of the plants and fruit analyzed. Overexpression of CBM-SlExp1 increased the mechanical resistance of leaves, resulted in firmer fruits with delayed softening, and reduced the susceptibility of fruit to infections by *Botrytis cinerea*.

Presentaciones en congresos

- **Ignacio N. Sin**, Mauro A. Perini, Gustavo A. Martínez, P. Marcos, Civello. “Sobreexpresión del módulo de unión a carbohidratos de la expansina 2 de *Fragaria x Ananassa Duch. en Fragaria vesca L. Media de la actividad expansina.*”. I Jornadas Jóvenes Investigadores del CISAV. 26 de Marzo de 2015 La Plata, Buenos Aires, Argentina. **Participación:** Ponencia oral a cargo del Lic. I.N. Sin y publicado en la revista Investigación joven (Vol. 2 Núm. 1) (revista electrónica) (ISBN 2314-3991).
- Mauro A. Perini, **Ignacio N. Sin**, Gustavo A. Martínez, P. Marcos, Civello. “Uso de un texturómetro comercial para: medidas de crecimiento ácido en diferentes condiciones y matrices, determinar actividad expansina sobre *Fragaria x ananassa.*”. XV Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 21-24 de Septiembre de 2014 Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. **Participación:** Poster y trabajo publicado en Actas del Congreso. (ISBN: 978-987-544-592-5 (E-book); 978-987-544-591-8 (Papel)). Pág. 76.
- Mauro A. Perini, **Ignacio N. Sin**, Gustavo A. Martínez, P. Marcos, Civello. “Determinación de la actividad expansina durante la maduración en cultivares de frutilla (*Fragaria x ananassa*)”. VII Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Postcosecha 2014. 28 al 30 de Mayo de 2014. La Plata, Buenos Aires, Argentina. **Participación:** Poster y trabajo publicado en Actas del Congreso. (ISBN: 978-950-34-1094-3)
- Mauro A. Perini, **Ignacio N. Sin**, Gustavo A. Martínez, P. Marcos, Civello. “Adaptacion de un texturometro comercial para realizar medidas de crecimiento ácido y actividad de expansina”. XV Jornadas Anuales SAB 2013. Sociedad Argentina de Biología. 4 y 5 de Diciembre de 2013 Chascomús, Buenos Aires, Argentina. **Participación:** Poster y publicado en BIOCELL 38 (Suppl. 2), 2014 ISSN 0327-9545 (versión impresa) ISSN 1667-5746 (versión online).

El presente trabajo de Tesis Doctoral para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, se desarrolló en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE-CONICET-UNLP), bajo la dirección del Dr. Pedro Marcos Civello y la Co-dirección del Dr. Gustavo Adolfo Martínez.

La Plata, abril de 2017

Agradecimientos

A mi familia (papá, mamá, nano, abuelos, tíos), su amor y sacrificio hizo posible que llegase hasta aquí

A mi amor, Pau, no sé qué sería de mí sin vos

A mi amigo del alma, Mauro, por su apoyo incondicional

A Ale, Car, Maxi, Santi, Nadia y Nico y sus peques Luki y Juani, quienes me aceptaron como un miembro más de la familia

A los chicos, Rafa, Pau, Tita, Agus, Euge y Ger

A mis directores, Marcos y Gustavo, por su excelente predisposición y voluntad

A la UB4' (Peque, Hernán, Marina, Andre, Core, Vicky), juntos lo hacemos posible

Al INFIVE y a su gente, por abrirme las puertas

A todos ellos, GRACIAS, de corazón

Índice

Índice.....	vii-xi
Abreviaturas.....	xii
Neologismos del Inglés.....	xiii
Capítulo 1 - Introducción general.....	1-18
1.1. Frutilla.....	2
1.2. Frutilla y maduración.....	3
1.3. Pared celular primaria.....	6
1.4. Enzimas del metabolismo de la pared celular.....	8-14
1.4.1. Poligalacturonasas (PGs).....	9
1.4.2. Pectin-metil.esterasas (PMEs).....	9
1.4.3. Pectatoliasas (PLs).....	10
1.4.4. Endo- β -1,4-glucanasas.....	10
1.4.5. Xiloglucano edotransglicosidasas.....	10
1.4.6. Xilanasas.....	10
1.4.7. β -Xilosidasas.....	10
1.4.8. Endo- β -mananasas.....	11
1.4.9. β -Galactosidasas.....	11
1.4.10. Expansinas.....	11
1.4.11. α -L-arabinofuranosidasas.....	13
1-4-12. Otras enzimas.....	14
1.5. Módulos de unión a carbohidratos (CBM).....	14
1.6. Aplicaciones de los CBM.....	15
1.7. Modelos de estudio para <i>Fragaria</i>	16
1.8. Objetivos de la tesis.....	18
Capítulo 2 - Adaptación de un equipo comercial a la medida de expansina.....	19-42
Resumen.....	20
Objetivos.....	21
2.1. Materiales y Métodos.....	22-29
2.1.1. Material Vegetal.....	21
2.1.1.1. Obtención de hipocótilos de pepino.....	22
2.1.1.2. Frutos de <i>Fragaria x ananassa</i>	23

2.1.2. Extractos proteicos.....	23-24
2.1.2.1. Extracto de hipocótilos de pepino.....	23
2.1.2.2. Extracto de frutilla.....	24
2.1.3. Crecimiento ácido y actividad expansina.....	24-28
2.1.3.1. Acondicionamiento de los hipocótilos.....	24
2.1.3.2. Fenómeno del crecimiento ácido.....	25
2.1.3.3. Actividad expansina.....	28
2.1.4. Cuantificación de proteínas.....	28
2.1.5. Análisis de datos.....	29
2.2. Resultados.....	30-35
2.2.1. Crecimiento ácido.....	30
2.2.2. Actividad expansina.....	31
2.2.3. Variación de la actividad expansina durante la maduración.....	32
2.2.4. Dosis respuesta.....	33
2.2.5. Actividad expansina; definición de una actividad enzimática.....	33
2.3. Discusión.....	36-41
Capítulo 3 - Sobreexpresión de CBM-FaEXP2 en <i>F. vesca</i> cv. H4.....	42-102
Resumen.....	43
Objetivos.....	44
3.1. Materiales y métodos.....	45-57
3.1.1. Material vegetal.....	45-48
3.1.1.1. Clonado y construcción del plásmido PK7WG2D.1[CBM-FaEXP2].....	45
3.1.1.2. Transformación de <i>F. vesca</i> H4.....	46
3.1.1.3. Clasificación de los frutos de acuerdo al estadio de madurez.....	47
3.1.2. Extracción de ARN.....	48-51
3.1.2.1. Método del borato caliente.....	48
3.1.1.2. Método del CTAB modificado.....	50
3.1.3. Análisis del ARN total.....	51
3.1.4. Purificación del ARN total.....	51
3.1.5. RT-PCR.....	52
3.1.6. Caracterización de los frutos.....	53-57
3.1.6.1. Peso de los frutos.....	53
3.1.6.2. Firmeza de los frutos.....	53

3.1.6.3. Contenido de azúcares solubles en alcohol.....	53
3.1.6.4. Aislamiento de polisacáridos de la pared celular.....	54
3.1.6.5. Medida de actividad expansina total.....	54
3.1.6.6. Medida de actividad poligalacturonada.....	55
3.1.6.7. Análisis de expresión de genes por RT-qPCR.....	56
3.1.6.8. Análisis secuencial de las proteínas ortólogas en <i>F. vesca</i>	57
3.2. Resultados.....	58-93
3.2.1. Análisis de las líneas transgénicas y verificación de la expresión del gen CBM-FaExp2.....	58
3.2.2. Extracción de ARN total.....	61
3.2.3. Caracterización de los frutos.....	63-93
3.2.3.1. Peso.....	63
3.2.3.2. Firmeza.....	64
3.2.3.3. Aislamiento de polisacáridos de la pared celular.....	66
3.2.3.4. Azúcares solubles en alcohol.....	68
3.2.3.5. Genes ortólogos en <i>F. vesca</i> y puesta a punto de cebadores para RT-qPCR.....	71
3.2.3.6. Identificación de dominios en los genes ortólogos predichos en <i>F. vesca</i>	73
3.2.3.7. Análisis de Expansinas por alineamiento múltiple.....	73
3.2.3.8. Expresión relativa.....	76-87
3.2.3.8.1. <i>FvExp6a</i>	76
3.2.3.8.2. <i>FvExp6b</i>	78
3.2.3.8.3. <i>FvExp10</i>	79
3.2.3.8.4. <i>FvExp1</i>	81
3.2.3.8.5. <i>FvExp1-like</i>	82
3.2.3.8.6. <i>FvPPE8B-like</i>	84
3.2.3.8.7. <i>FvPG1</i>	86
3.2.3.9. Actividad Poligalacturonasa.....	88
3.2.3.10. Actividad Expansina.....	90
3.3. Discusión.....	95-102

Capítulo 4 - Caracterización del CBM-FaARA1	103-138
Resumen	104
Objetivos	105
4.1. Materiales y métodos	106-118
4.1.1. Análisis in silico de los CBM de α -L-arabinofuranosidasas de <i>Fragaria x ananassa</i>	106
4.1.2. Clonado y expresión heteróloga de proteínas recombinantes	106
4.1.3. Purificación de proteínas en condiciones desnaturalizantes	108
4.1.4. SDS-PAGE y Western blot	109
4.1.5. Western blot	109
4.1.6. Caracterización de las propiedades de unión "in vitro"	111-114
4.1.6.1. Ensayos de unión a carbohidratos	111
4.1.6.2. Electroforesis en geles de retardo	113
4.1.7. Estabilización de la proteína recombinante	114-115
4.1.7.1. Hidrólisis química de PGA	114
4.1.7.2. Determinación de extremos reductores	114
4.1.7.3. Replegado por dilución directa en presencia y ausencia de estabilizantes	115
4.1.8. Efecto del CBM-FaARA1 sobre la actividad "in vitro" de enzimas del metabolismo de pectinas	115-118
4.1.8.1. Medida de actividad pectinasa	115
4.1.8.2. Extracción y medida de PG de tomate	116
4.1.8.3. Extracción y medida de PME de tomate	117
4.1.9. Cuantificación de proteínas	118
4.1.10. Análisis de datos	118
4.2. Resultados	119-133
4.2.1. Análisis in silico de las proteínas FaARA	119
4.2.2. Clonado, expresión y purificación del CBM-FaAARA1 recombinante	122
4.2.3. Caracterización de las propiedades de unión del CBM-FaARA1 recombinante	126-128
4.2.3.1. Ensayos de unión a carbohidratos	126
4.2.3.2. Electroforesis en geles de retardo	127

4.2.4. Estabilización de la proteína recombinante.....	129
4.2.5. Efecto del CBM-FaARA1 sobre la actividad “in vitro”	131
4.3. Discusión.....	134-138
5. Conclusiones y perspectivas.....	139-141
5.1. Conclusiones.....	140
5.2. Perspectivas.....	141
6. Referencias.....	142-152

Abreviaturas

α -L-AFasas: α -arabinofuranosidasas

β -Gal: β -galactosidasa

β -Xil: β -xilosidasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BSA: albúmina sérica bovina

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DEPC: dietil pirocarbonato

DO: densidad óptica

EDTA: ácido etilendiamintetracético

EGasa: endoglucanasa

HEPES: ácido N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-etanosulfónico

IPTG: isopropil-tio- β -D-galactósido

MOPS: ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)

PG: poligalacturonasa

PL: pectato liasa

PME: pectin metilesterasa

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PVP: polivinilpirrolidona

PVPP: polivinilpolipirrolidona

RT-PCR: transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (reverse transcription and polymerase chain reaction)

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Xln: xilanasas

Neologismos y palabras tomadas del inglés

Buffer: solución amortiguadora de pH, constituida por un par ácido-base conjugados.

GOI: gen de interés (*gen of interest*)

Kit: conjunto de piezas o instrumentos que sirven para realizar alguna función o desarrollar alguna actividad.

Northern blot: técnica para detectar ARNm específicos en una mezcla.

Western blot: técnica para detectar proteínas específicas en una mezcla utilizando anticuerpos específicos.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

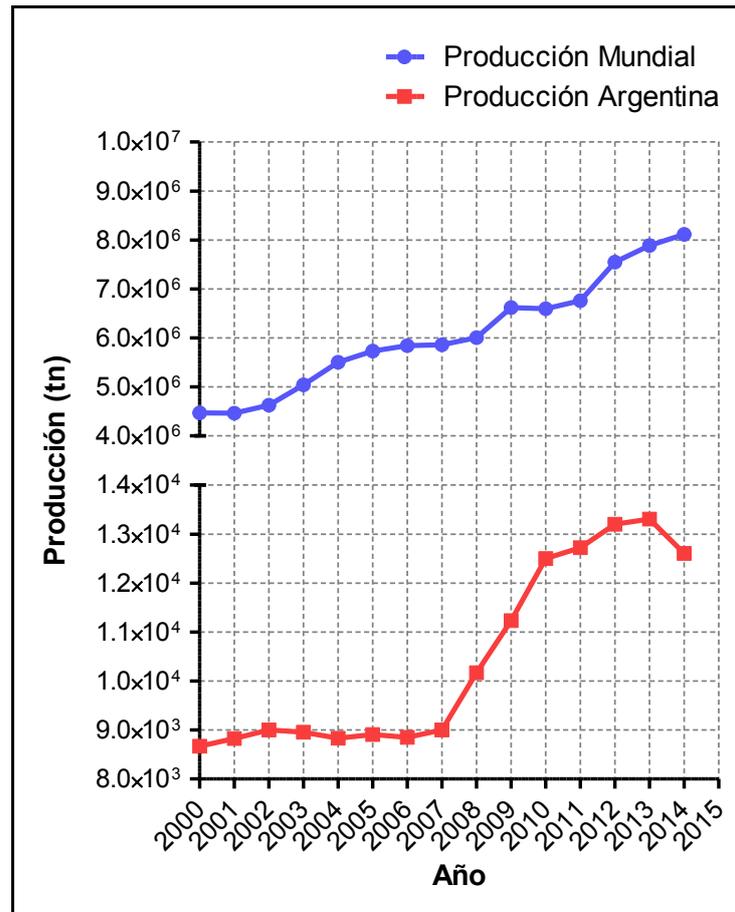
1. Introducción general

1.1. Frutilla

La frutilla pertenece a un grupo denominado “frutos blandos” o berries, junto con frambuesas, grosellas, moras y arándanos, entre otros. (Green, 1971). Este grupo está integrado por frutos de distintas especies que comparten características comunes, tales como pequeño tamaño, textura delicada, coloración intensa y una vida útil postcosecha acotada. Muchas de las características de estos frutos una vez maduros, son altamente atractivas para los humanos y, como consecuencia, frutos frescos y procesados forman una parte integral de la dieta humana, proveyendo azúcares, fibra, vitaminas, minerales y antioxidantes (Barry y col., 2005). Sin embargo, tanto su palatabilidad como su calidad nutricional dependen en gran medida de su consumo en un estadio de madurez óptimo.

Los frutos blandos de mayor importancia económica a nivel mundial son las frutillas, junto con las frambuesas, los arándanos y grosellas, siendo la producción de las primeras ampliamente superior a la del resto de los berries tomados en conjunto. La producción de frutillas ha ido creciendo constantemente a nivel mundial, alcanzándose 8.114.373 tn en el año 2014 (años 2000-2014; Fig. 1.1), siendo Estados Unidos de América el principal productor con 1.371.573 tn producidas en 2014 (FAOSTAT 2017, <http://www.fao.org/faostat/es/#home>). En Argentina, la principal fruta fina producida es la frutilla. Su producción se mantuvo prácticamente constante entre los años 2000 y 2007, rondando las 9.000 tn anuales, para luego comenzar a crecer en forma continua hasta el año 2013, alcanzándose unas 13.300 tn anuales, con una leve caída en la producción entre los años 2013 y 2014 (FAOSTAT 2017, <http://www.fao.org/faostat/es/#home>; Fig. 1.1). A nivel local, en el cinturón frutihortícola de la ciudad de La Plata, la frutilla es uno de los productos más relevantes entre los distintos cultivos desarrollados.

Fig. 1.1. Evolución de la producción de Frutillas a nivel mundial (●) y en la Argentina (■) entre los años 2000 y 2014 (FAOSTAT 2017, <http://www.fao.org/faostat/es/#home>)



1.2. Frutilla y maduración

A diferencia de un fruto verdadero, desarrollado a partir de la transformación del tejido ovárico de una flor, la frutilla es considerada un “falso fruto” o “fruto múltiple” (botánicamente conocido como “eterio”), por provenir del desarrollo del receptáculo y no de las paredes del ovario. En este caso los frutos verdaderos resultan ser los aquenios (llamados vulgarmente semillas). Éstos son frutos secos indehiscentes y uniseminados, que se encuentran insertados en la superficie del receptáculo o en pequeñas depresiones más o menos profundas denominadas criptas, y conectados al mismo a través de conexiones vasculares. Normalmente un fruto mediano suele contener entre 150 y 200 aquenios, mientras que un fruto de gran tamaño puede llegar a contener hasta 400. Después de la fecundación, los óvulos al convertirse en aquenios estimulan el engrosamiento del receptáculo, que una vez maduro constituirá la parte comestible de la frutilla.

El conjunto de propiedades y características de los frutos canosos que los convierten en productos atractivos para su consumo por parte del hombre, es adquirido durante el proceso de maduración. El mismo se inicia una vez completado el desarrollo del fruto y se define como el conjunto de cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren desde la finalización de la etapa de desarrollo hasta el inicio de la senescencia. En frutos como el tomate, la delimitación entre las etapas del desarrollo y la maduración está determinada por el cese del crecimiento en tamaño del fruto (estadio verde maduro). En el caso particular de frutilla, existe una superposición entre el desarrollo y la maduración, el crecimiento del fruto continúa aun cuando comienzan a observarse los cambios propios del proceso de maduración. Debido a este solapamiento entre el desarrollo y la maduración en frutilla, es habitual la inclusión de estadios finales del desarrollo en el estudio global de la maduración.

Los cambios sucedidos durante este proceso son característicos de cada fruto, pero en general, los programas de maduración que se observan en la mayoría incluyen: (1) modificación del color a través de la alteración del contenido de clorofila, carotenoides y/o acumulación de antocianinas; (2) modificación de la textura vía la alteración de la turgencia de la célula y la estructura de la pared celular y/o su metabolismo; (3) importación/acumulación y modificación de azúcares, ácidos, y compuestos volátiles que afectan la calidad nutricional, sabor y aroma; (4) aumento en la susceptibilidad a patógenos y herbívoros (Giovannoni, 2004).

Para el caso particular de la frutilla se observan los siguientes cambios a lo largo de su desarrollo y maduración:

- La etapa de desarrollo se caracteriza por un crecimiento y alargamiento del fruto. Al inicio, luego de la fecundación y hasta una semana pasada de la caída de los pétalos, el incremento en el tamaño del fruto se debe principalmente a un aumento dramático en el número de células. A continuación, y hasta el final del proceso de maduración, la cantidad de células se mantiene relativamente constante, mientras aumenta el tamaño de las células (Knee y col., 1977),

alcanzándose el tamaño final y maduración completa del fruto aproximadamente a los 30 días luego de la caída de los pétalos. Durante todo este período se observa un cambio significativo en la textura del fruto producto de un ablandamiento continuo y pronunciado a lo largo de la maduración.

- En cuanto a los pigmentos, en frutilla se observa un aumento en los niveles de antocianinas, acompañado de un descenso de clorofilas y de carotenoides (Woodward, 1972; Given y col., 1988). Las antocianinas son compuestos flavonoides responsables del color característico de los frutos blandos, manzanas, cerezas y ciruelas, pudiendo conferir colores que van del rojo al azul, en función del pH del medio y por la presencia de metales con los que tienen la capacidad de formar complejos. En frutilla se han detectado al menos 25 antocianinas distintas (da Silva y col., 2007), aunque la más abundante es pelargonidin-3-glucósido (Van Buren, 1970).

- Azúcares y ácidos orgánicos tienden a aumentar con la maduración del fruto (Woodward, 1972). Los azúcares mayoritarios encontrados en distintas variedades de frutillas maduras son glucosa (1,4 a 3,1%), fructosa (1,7 a 3,5%) y sacarosa (0,2 a 2,5%). En cuanto a los ácidos orgánicos, los más abundantes en este fruto son: cítrico (420 a 1.240 mg %), málico (90 a 680 mg %) y ascórbico (26 a 120 mg %). Siendo el contenido de este último ácido, de conocida importancia nutricional.

- Los frutos de frutilla se caracterizan por producir un gran número de compuestos volátiles durante su maduración. Cada variedad de frutilla posee una combinación única de este tipo de compuestos que le confiere un aroma característico (Dirinck y col., 1981). Se han descrito al menos 360 moléculas que contribuyen al aroma del fruto (Menager y col., 2004), destacándose ésteres, alcoholes y carbonilos (Dirinck y col., 1981), siendo los primeros los predominantes en frutilla (Menager y col., 2004). Si bien cada cultivar presenta un patrón distinto de compuestos volátiles, se considera al furaneol (2,5-dimetil-4-

hidroxi-3(2H)-furanona) y el mesifurano (2,5-dimetil-4-metoxi-3(2H)-furanona) como los principales contribuyentes al aroma de frutilla, dada su alta concentración y a los bajos umbrales de percepción (Menager y col., 2004).

Estos cambios en color, sabor, textura y aroma hacen de la maduración del fruto un proceso altamente complejo, que debe estar finamente regulado. Mientras aún no se conocen por completo los mecanismos que dictaminan cómo se inician estos cambios en el fruto, como se controlan y como se coordinan, es claro que las fitohormonas son relevantes en el proceso, tanto de frutos climatéricos, de los cuales su acción es más conocida, como de los frutos no-climatéricos (Tucker, 1993; Giovannoni, 2004).

La clasificación de los frutos en climatérico y no-climatérico se basa en diferencias fisiológicas en los patrones de maduración de los frutos. Los primeros, como el tomate, mango, manzana y palta, presentan un pico en la producción de etileno y en la actividad respiratoria bien caracterizados, que señalan los inicios de la maduración (Seymour y col., 1993; Tucker, 1993; Adams-Phillips y col., 2004; Zaharah y col., 2012). Por definición los frutos no-climatéricos como los cítricos, uvas y frutilla, no presentan el pico de producción de etileno o en la respiración durante la maduración (Seymour y col., 1993).

La frutilla ha sido considerada clásicamente como un exponente de fruto no climatérico, dado que la respiración decrece paulatinamente a lo largo de la maduración, sin presentar un pico en la actividad respiratoria (Leshem, 1986; Abeles y Takeda, 1990). Sin embargo, trabajos más recientes ponen en duda la pertenencia de la frutilla a esta categoría (Trainotti y col., 2005; Iannetta y col., 2006; Villarreal y col., 2016).

1.3. Pared celular vegetal primaria

La pared celular primaria está compuesta mayormente por tres tipos de polisacáridos: celulosa, hemicelulosas, y pectinas. La proporción de cada uno de ellos, depende de la especie y del tejido analizado, aunque la composición general de los

mismos en plantas dicotiledóneas es aproximadamente de un 30% de celulosa, 30% de hemicelulosas, 35% de pectinas y 5% de proteínas estructurales (Knee y Bartley, 1981; Fry, 1988).

La celulosa está formada por cadenas lineales de (1→4)-β-D-glucopiranosas asociadas entre sí a través de uniones no-covalentes, dando lugar a la formación de microfibrillas de aproximadamente 3 nm de diámetro. Las microfibrillas están organizadas en dominios altamente cristalinos unidos a regiones amorfas menos organizadas. La celulosa posee una alta resistencia a los esfuerzos de tensión, es insoluble, químicamente estable y relativamente resistente al ataque enzimático (Cosgrove, 2005; Fig. 1.2).

Las hemicelulosas se unen a la superficie de la celulosa a través de puentes de hidrógeno para formar una matriz entrecruzada. En la pared celular primaria de las dicotiledóneas, la hemicelulosa más abundante es el xiloglucano, constituido por un polímero lineal de (1→4)-β-D-glucopiranosas con cadenas laterales cortas que incluyen xilosa y, en algunos casos, otros azúcares como galactosa y fucosa (Fry, 1989). Dependiendo de la etapa de desarrollo y de la especie, la fracción de hemicelulosas de la pared también contiene otros polisacáridos importantes tales como los xilanos y glucomananos.

Las pectinas forman un gel en el cual la red celulosa-hemicelulosa se encuentra embebida. Estos polisacáridos constituyen un grupo heterogéneo que contiene característicamente azúcares ácidos tales como los ácidos galacturónico y glucurónico. Algunas pectinas tienen una estructura primaria relativamente simple tal como el homogalacturonano formado por un polímero lineal de ácido (1→4)-α-galacturónico, mientras que otras como el ramnogalacturonano I (RG I), son más complejas estando formadas por un disacárido de ramnosa y ácido galacturónico que se repite, y cadenas laterales largas de arabinanos, galactanos, arabinogalactanos y homogalacturonano (Darvill y col., 1978).

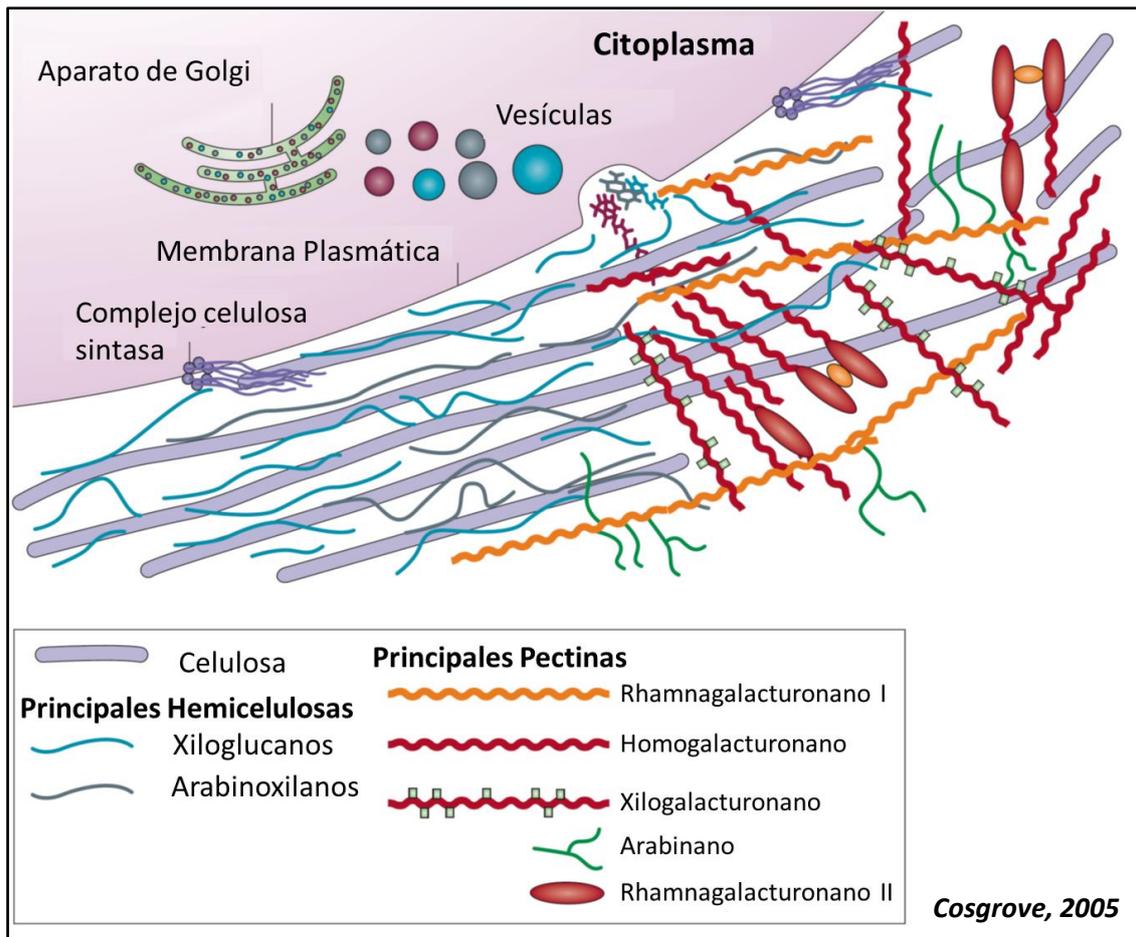


Fig. 1.2. Estructura de la pared celular vegetal primaria. Microfibrillas de celulosa (varillas violetas) sintetizadas por un complejo hexamérico en la membrana plasmática, mientras que hemicelulosas y pectinas, que conforman la matriz de polisacáridos son sintetizados en el aparato de Golgi y son depositadas en la superficie de la pared celular por medio de vesículas. La parte izquierda de la pared celular se muestra sin pectinas para una mejor apreciación de la matriz de hemicelulosa. Las pectinas resaltan en la parte derecha del esquema de la pared celular primaria. En la mayoría de las especies la hemicelulosa principal es el xiloglucano (azul), mientras que hemicelulosas como arabinoxilanos (gris) y mannanos (ausentes en el esquema) se encuentran en cantidades menores. Dentro de las principales pectinas se encuentran rhamnagalacturonano I y homogalacturonano, con cantidades menores de xilogalacturonano, arabinano, arabinogalactano I (ausente en el esquema) y rhamnagalacturonano II. Se cree que las distintas formas de pectinas se encuentran unidas entre sí covalentemente. Las pectinas neutras (verde) también se pueden unir a la superficie de celulosa. Figura tomada y adaptada de Cosgrove (2005).

1.4. Enzimas del metabolismo de la pared celular

Los cambios en la textura de los frutos en proceso de maduración influyen directamente en la preferencia de los consumidores, su almacenamiento, vida

poscosecha, y respuesta ante el ataque de patógenos (Li y col., 2010). El ablandamiento excesivo es el principal factor que limita la vida poscosecha y el tiempo de almacenamiento de los frutos (Brummell y Harpster, 2001).

El desensamble de la pared celular del fruto es uno de los principales procesos responsables del ablandamiento y de los cambios en textura durante la maduración. Dicho fenómeno se ha asociado a cambios bioquímicos en las fracciones de la pared celular que resultan de la degradación de polímeros tales como celulosa, hemicelulosas y pectinas (Brummell, 2006; Payasi y col., 2009). Este desensamble involucra la acción de distintas enzimas hidrolíticas, tales como poligalacturonasas, pectin-metil-esterasas, pectatoliasas, rhamnogalacuronasas, endoglucanasas, beta-galactosidasas, etc. Sumadas a estas enzimas, las expansinas también juegan un rol de importancia en el metabolismo de la pared celular del fruto y en su ablandamiento durante la maduración (Cosgrove, 2000; Payasi y col., 2009; Rose y col., 1997).

1.4.1. Poligalacturonasas (PGs)

Catalizan la hidrólisis de uniones galacturónido y pueden ser del tipo endo ó exo. Los principales sustratos de las PG son los homogalacturonanos, los cuales son secretados a la pared celular con un alto porcentaje de metil-esterificación en el C-6 por lo que deben ser de-esterificados antes de convertirse en sustrato para las PGs (Carpita y Gibeaut, 1993; Jarvis, 1984).

1.4.2. Pectin-metil-esterasas (PMEs)

Actúan inmediatamente antes de las PGs de-esterificando los poliurónidos al remover los grupos metilo de la posición C-6 de los residuos de ácido galacturónico presentes en pectinas de alto peso molecular. La de-metilación cambia el pH y la carga en la pared celular, permite el agregado de poliurónidos a través de puentes de calcio y torna susceptibles a los poliurónidos frente a la acción de las poligalacturonasas (Carpita y Gibeaut, 1993; Pressey y Avants, 1982).

1.4.3. Pectatoliasas (PLs)

Catalizan la ruptura de pectinas de-esterificadas a través de un mecanismo de β -eliminación. Las mismas requieren la presencia de Ca^{2+} para ejercer su acción y producen oligosacáridos con residuos de ácido galacturónico no saturado en el extremo no-reductor de los mismos (Carpita y Gibeaut, 1993).

1.4.4. Endo- β -1,4-glucanasas

Catalizan la hidrólisis de enlaces internos de cadenas de glucanos unidos por enlaces β -1,4 adyacentes a residuos de D-glucosa no-sustituídos. Se cree que los sustratos naturales de estas enzimas en la pared celular son el xiloglucanos y las regiones no cristalinas de las microfibrillas de celulosa (Brummell y Harpster, 2001).

1.4.5. Xiloglucano endotransglicosidasas

Hidrolizan las uniones internas de las cadenas de (1 \rightarrow 4)- β -D-glucano del xiloglucano y transfieren el nuevo extremo reductor formado a la posición C-4 de la unidad de glucosa en el extremo no-reductor de otro polímero u oligosacárido de xiloglucano, con retención de la configuración anomérica del enlace glucosídico (Fry y col., 1992).

1.4.6. Xilanasas (XIns)

Hidrolizan los enlaces β -1,4- glicosídicos entre residuos de D-xilosa adyacentes en la cadena principal de los xilanos para producir xilooligosacáridos. La mayoría de las XIns hidrolizan la cadena principal en regiones donde el sustrato no está sustituido (Ronen y col., 1991).

1.4.7. β -Xilosidasas (β -Xil)

Liberan residuos de xilosa a partir del extremo no reductor de los xilooligosacáridos producidos por XIns (Ronen y col., 1991).

1.4.8. *Endo- β -mananasas*

Hidrolizan los enlaces β -1,4 entre residuos de manosa presentes en la cadena principal de mananos y heteromananos no-sustituídos (Mo y Bewley, 2003).

1.4.9. *β -Galactosidasas (β -Gal)*

Catalizan la remoción de residuos de β -D-galactosa a partir del extremo no-reductor de β -D-galactósidos. Los posibles sustratos in vivo de estas enzimas son los (1 \rightarrow 4)- β -galactanos, presentes en las fracciones pécticas, y residuos β -D-galactosilo presentes en las cadenas laterales del xiloglucano (Balasubramaniam y col., 2005).

1.4.10. *Expansinas (Exps)*

Las expansinas son proteínas sin actividad hidrolítica conocida, descubiertas por primera vez en estudios de estiramiento de la pared celular vegetal, en los cuales se las identificó como las responsables del fenómeno de crecimiento ácido (McQueen-Mason y col., 1992). Luego, se probó que esta diversa familia de proteínas participa en distintos procesos que involucran el remodelado de la pared celular, tal como el estiramiento de la pared, crecimiento del tubo polínico y raíces, abscisión de órganos y en el ablandamiento de frutos (Cosgrove y col., 2002).

Se cree que estas proteínas actúan interrumpiendo los enlaces no covalentes entre la celulosa y los polisacáridos de la matriz (Cosgrove, 2000; McQueen-Mason y Cosgrove, 1995). El dominio C-terminal actuaría anclando la expansina a la superficie de la celulosa, mientras el dominio N-terminal interactuaría con las hemicelulosas en la superficie de las microfibrillas o en la matriz (Cosgrove, 2000; Fig. 1.3). En este modelo se ha propuesto que las expansinas, al ser capaces de debilitar los enlaces puente de hidrógeno que mantienen unidas las hemicelulosas a las fibrillas de celulosa, permitirían no solo la relajación de la pared celular, sino que facilitaría el acceso de diversas enzimas, tales como endoglucanasas (Levy y col., 2002; Nicol y col., 1998) y transglicosilasas (Redgwell y Fry, 1993; Schröder y col., 2004), colaborando de este modo a la hidrólisis de los componentes de la pared.

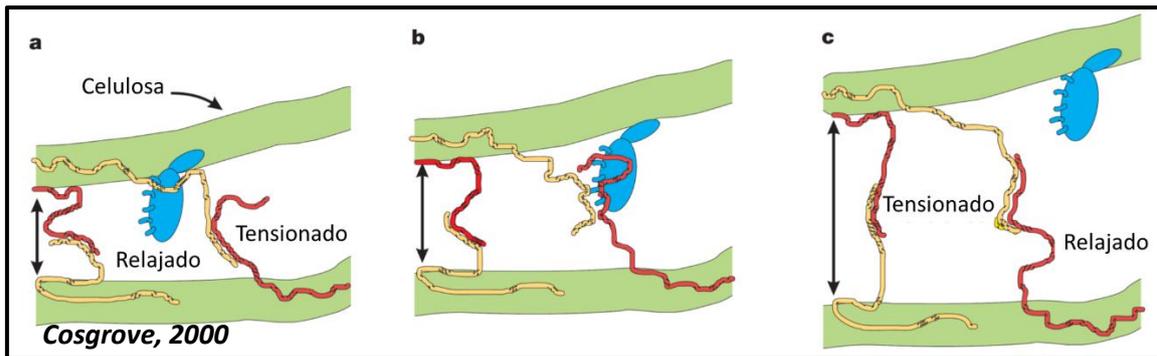


Fig. 1.3. Modelo de la acción de relajación de la pared celular por parte de las expansinas. Micro-fibrillas de celulosa conectadas unas a otras por glicanos (hebras amarillas y rojas) que se pueden adherirse entre sí y a la superficie de las micro-fibrillas de celulosa. Se cree que las expansinas (azul) son capaces de disociar la unión de los glicanos a la superficie de la micro-fibrilla (a), entre sí (b). Bajo el estrés mecánico de la presión de turgencia, la acción de las expansinas se traduce en el desplazamiento de los polímeros de la pared celular (c) y un deslizamiento en los puntos de adhesión de los polímeros (comparar, b y c). Figura tomada y adaptada de Cosgrove (2000).

El rol de las expansinas en el ablandamiento de frutos se demostró primero en tomate (Brummell y col., 1999; Rose y col., 2000), y luego fueron reportado genes de expansina para otros frutos tales como frutilla (Civello, 1999; Harrison y col., 2001), banana (Trivedi y Nath, 2004), manzana (Goulao y col., 2007), durazno (Obenland y col., 2003) y melón (Nishiyama y col., 2007), entre otros.

La mayoría de los estudios realizados sobre estas enzimas se llevaron a cabo a nivel de la expresión de ARNm (Northern blot, RT-qPCR, microarrays) o expresión de proteínas por medio de inmuno-detección por western blot. En cambio, su actividad biológica ha sido menos estudiada debido, principalmente, a problemas metodológicos.

La actividad biológica de las expansinas se ha evaluado como su capacidad de relajar la pared celular midiendo la tasa de estiramiento de hipocótilos, generalmente de pepino o tomate, en condiciones ácidas, bajo el estrés producido por una fuerza constante (McQueen-Mason y col., 1992; McQueen-Mason y Cosgrove, 1995). Dicha medida se realiza en extensómetros "ad hoc" de difícil construcción, y existen escasos antecedentes sobre el uso de equipos comerciales de mayor difusión, para realizar la medida (Goulao y col., 2007). Estos hechos han restringido el estudio de estas enzimas a unos pocos grupos de trabajo en el mundo.

1.4.11. α -L-arabinofuranosidasas (α -L-AFasas)

Las α -L-arabinofuranosidasas (α -L-AFasas, EC 3.2.1.55) son enzimas involucradas en el catabolismo de la pared celular vegetal, catalizando la hidrólisis de extremos no reductores de residuos α -L-arabinofuranosilo presentes en pectinas y hemicelulosas (Chavez Montes y col., 2008; Minic y Jouanin, 2006). En *Arabidopsis thaliana* se ha descrito que estas enzimas se expresan en zonas de proliferación celular, el sistema vascular, tejido floral en desarrollo y en zonas de abscisión floral (Fulton y Cobbett, 2003). En semillas inmaduras de rábano también se las ha involucrado en la hidrólisis de carbohidratos en proteínas glicosiladas con arabinogalactanos (Kotake y col., 2006). En frutos carnosos, uno de los principales fenómenos observados durante los procesos de maduración y ablandamiento es el cambio en la composición de pectinas en la pared celular (Tateishi, 2008), por lo que se cree que las α -L-AFasas son relevantes en estos procesos.

Se han identificado tres α -L-AFasas (FaARA1, FaARA2, FaARA3) en *Fragaria x ananassa* (Rosli y col., 2009). La expresión de estos genes se da predominantemente en fruto, observándose un incremento en la actividad α -L-arabinofuranosidasa a medida que progresa la maduración. Asimismo, la actividad de estas enzimas es mayor en cultivares de frutilla que presentan una menor firmeza (Rosli y col., 2009). Esta observación no sólo sugiere una relación directa entre estas enzimas y la modificación de la pared celular del fruto, sino también que la degradación de pectinas y pérdida de azúcares neutros probablemente contribuyen al ablandamiento del fruto. En frutillas, a diferencia de lo que ocurre en tomate, se ha demostrado que el ablandamiento durante la maduración del fruto está asociado estrechamente a la degradación de las pectinas (Jiménez-Bermúdez y col., 2002; Molina-Hidalgo y col., 2013; Rosli y col., 2004; Villarreal y col., 2008). Asimismo, se ha reportado una pérdida significativa en el contenido de azúcares neutros a medida que progresa la maduración en frutilla (Heng Koh y Melton, 2002; Redgwell y col., 1997).

1.4.12. Otras enzimas

Existe una gran cantidad de enzimas que han sido menos estudiadas y caracterizadas que las ya mencionadas, y que intervendrían, junto con las anteriores, en la modificación de la pared celular durante la maduración de frutos. Las ramnogalacturonano I hidrolasas y liasas (RGasas), tendrían la capacidad de hidrolizar enlaces internos de la cadena principal de los RG I. Si bien se han identificado varias RGasas fúngicas, se ha prestado escasa atención a su intervención en la maduración (Vicente y col., 2007). Componen además este grupo de enzimas escasamente estudiadas las acetiltransferasas, α -glucosidasas, α -galactosidasas, β -manosidasas, β -1,4-endomananasas, etc.

1.5. Módulos de unión a carbohidratos (CBM)

Por lo general, las glicosil-hidrolasas (GH) involucradas en el metabolismo de la pared celular presentan una arquitectura molecular compleja, compuesta por módulos discretos, uno catalítico (responsable de la actividad de la enzima) y uno o varios módulos de unión a carbohidratos (CBM, siglas en inglés de Carbohydrate Binding Modules) unidos por una cadena aminoacídica desestructurada. Podemos definir a un CBM como una secuencia de aminoácidos contigua (entre 30 y 200 residuos de longitud) dentro de una proteína activa sobre carbohidratos, con un plegado independiente y capacidad de unir carbohidratos (Carvalho y col., 2015; Shoseyov y col., 2006). Con frecuencia suelen presentarse en el extremo C- o N-terminal, aunque ocasionalmente pueden encontrarse en el centro de la proteína. Se postula que su presencia incrementa la concentración efectiva del módulo catalítico en la superficie del sustrato, por lo tanto, incrementando la actividad total de la enzima. En algunos casos son capaces de generar la relajación del sustrato facilitando el acceso al sustrato tanto del módulo catalítico de la propia enzima como de otras enzimas (Boraston y col., 2004; Shoseyov y col., 2006).

Actualmente hay 1444 secuencias listadas en la base de datos de enzimas activas sobre carbohidratos (Carbohydrate Active Enzymes database, <http://www.cazy.org>, Lombard y col., 2014) que corresponden a la familia de glicosil-hidrolasas GH51 (74 de plantas), de las cuales sólo 76 han sido reportadas como caracterizadas. De esos 76 reportes sólo 5 proteínas provienen de plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare* y *Oryza sativa* Japonica Group), pero ninguna de ellas ha sido caracterizada desde el punto de vista de las propiedades de unión a carbohidratos. Hay algunos reportes de la caracterización de las propiedades de unión a carbohidratos de α -L-AFasas de origen en hongos y bacterias correspondientes a las familias GH43 y GH54, pero ninguna de origen vegetal o perteneciente a la familia GH51.

1.6. Aplicaciones de los CBM

La gran diversidad de CBM con distintas especificidades de unión, su capacidad de funcionar de forma autónoma e independiente del contexto en el que se encuentran, y la existencia de numerosas matrices de carbohidratos robustas desde el punto de vista fisicoquímico, y de bajo costo, hace de los CBM excelentes candidatos para su uso en el desarrollo de diferentes aplicaciones (Shoseyov y col., 2006). El mayor uso conocido de estos módulos se da en bioprocesos, en los que se los utiliza como ligandos bioespecíficos en la purificación de proteínas por afinidad a carbohidratos. Muchas proteínas se han expresado fusionadas a CBM y purificado en su forma biológicamente activa siguiendo esta estrategia (Kavoosi y col., 2004; Boraston y col., 2003; Rodriguez y col., 2004; Shpigel y col., 2000). Bajo el mismo principio se ha implementado su uso en la inmovilización de enzimas activas, e incluso células enteras, sobre matrices de carbohidratos (Hwang y col., 2004; Kavoosi y col., 2004; Levy y col., 2003; McDonald y col., 2003; Nam y col., 2002; Lehtiö y col., 2001; Pfeifer y col., 2001; Rotticci-Mulder y col., 2001; Jiang y Radford, 2000). En la ingeniería de proteínas, se han utilizado CBM en la mejora de la actividad hidrolítica, o inclusive en la modificación de la especificidad de sustrato de enzimas, reemplazando un CBM existente por otro, o agregando uno a

una enzima que no lo tiene, obteniéndose muy buenos resultados (Latorre-García y col., 2005; Ito y col., 2004; Palonen y col., 2004; Limón y col., 2001).

Recientemente ha surgido como estrategia el uso de CBM como herramientas para la modificación del metabolismo de la pared celular vegetal (Nardi y col., 2015). La idea central de la sobreexpresión de un CBM en la pared celular vegetal es generar una competencia entre el CBM y el resto de las enzimas de pared por el sustrato de modo tal de conseguir una reducción global en el catabolismo de la pared.

1.7. Modelo de estudio para *Fragaria*

Desde el punto de vista genómico, *Fragaria x ananassa* es uno de los cultivos más complejos, portando ocho juegos de cromosomas ($2n = 8x = 56$) derivados de cuatro ancestros diploides (Folta y Davis, 2006). Paradójicamente, el pequeño tamaño de genoma básico del género de las frutillas ($x = 7$, aproximadamente 240 Mpb; Shulaev y col., 2011), ofrece ventajas sustanciales para el desarrollo de estudios genómicos.

Fragaria vesca ssp vesca, cultivada por siglos en jardines europeos, es la variedad diploide más cercana a la variedad cultivada por excelencia, *Fragaria x ananassa* (Ontivero y col., 2000; Potter y col., 2000). Su amplio rango de crecimiento en condiciones templadas, compatibilidad con la endogamia y larga historia de cultivo, combinado con una selección de rasgos recesivos favorables, tales como floración de día neutro, ausencia de estolones y producción de formas amarillas de frutos, ofrecen una extensa diversidad genotípica. En términos más generales, *F. vesca* ofrece muchas ventajas como sistema genómico de referencia para la familia de las rosáceas (Rosaceae), además de su genoma de tamaño pequeño, presenta tiempos cortos de generación para una planta perenne (cerca de los 4 meses), facilidad en la propagación vegetativa, y una planta herbácea de tamaño pequeño, comparado con las especies arbóreas tales como el durazno y la manzana. Además, el fruto es un excelente modelo para el estudio del desarrollo y maduración de frutos del tipo no-climatérico, con

la particularidad de presentar un metabolismo secundario único, que incluye la síntesis de diversos compuestos asociados al aroma y al sabor del fruto (Manning, 1993).

Se han desarrollado sistemas robustos de transformación mediada por infección con *Agrobacterium tumefaciens* y de regeneración por cultivo *in vitro* de tejidos para *F. vesca* (Slovin y col., 2009; Oosumi y col., 2006; Alsheikh y col., 2002), facilitando la producción de herramientas para estudios de genética directa y reversa, así como también estudios estructurales y funcionales (Alsheikh y col., 2002; Oosumi y col., 2006; Oosumi y col., 2010; Ruiz-Rojas y col., 2010). Todas estas propiedades y herramientas hacen de *F. vesca* un modelo atractivo para el desarrollo de genómica funcional, no sólo para el género *Fragaria*, sino también para todas las plantas pertenecientes a la familia de las rosáceas. Esta familia se encuentra en tercer lugar entre las familias cultivables de mayor relevancia económica a nivel mundial. Sin embargo, el estudio y mejoramiento genético de la mayoría de los cultivos de las rosáceas se ha visto dificultado por varios factores, entre los que se destacan el gran tamaño de sus genomas, su intolerancia a la endogamia y sus largos ciclos de vida.

Dadas sus propiedades y a la disponibilidad de herramientas de trabajo existentes, un consorcio internacional eligió a *F. vesca* para secuenciar su genoma y destinarlo como referencia genómica para el género (Shulaev y col., 2008; Shulaev y col., 2011). Se eligió para el secuenciado a una cuarta generación de una línea endogámica de *F. vesca ssp vesca cv Hawaii 4* (Repositorio Nacional de Germoplasma Clonal, número de acceso # PI551572) conocida como "H4x4", principalmente por su susceptibilidad a la transformación de alto rendimiento (Oosumi y col., 2006). *F. vesca ssp vesca cv Hawaii 4* es una variedad de día neutro, produce un abundante número de semillas luego de una auto-fecundación y completa su ciclo de vida entre 4 y 6 meses independientemente de la estación. Presenta frutos blancos/amarillentos y produce plantas nuevas (clones idénticos al parental) a partir de tallos modificados denominados estolones.

1.8. Objetivos de la tesis

El objetivo general del presente trabajo de Tesis fue desarrollar una estrategia que permita controlar el metabolismo de la pared celular vegetal en forma global haciendo uso de módulos de unión a carbohidratos (CBM), de modo tal de mantener la integridad de la pared, con un concomitante retraso en el ablandamiento del fruto.

Objetivos específicos:

- Adaptar un protocolo para la medición de actividad expansina en frutillas, de modo tal de ganar una herramienta que permita caracterizar el proceso de maduración de estos frutos desde el punto de vista de esta actividad.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión del CBM-FaEXP2 en la pared vegetal en frutos de *F. vesca* cv Hwaii 4.
- Caracterizar *in-vitro* las propiedades de unión del CBM-FaARA1, perteneciente a una α -L-arabinofuranosidasa vegetal de la familia GH51, contribuyendo al conocimiento de esta familia de proteínas en un aspecto no antes caracterizado.

CAPÍTULO 2

ADAPTACIÓN DE UN EQUIPO COMERCIAL A LA MEDIDA DE ACTIVIDAD EXPANSINA

2. Adaptación de un equipo comercial a la medida de actividad expansina

Resumen

Las expansinas pertenecen a una amplia familia de proteínas de origen diverso, pudiendo encontrárselas en plantas, varias especies de hongos y bacterias. Son relevantes para el metabolismo de la pared celular y cumplen un rol de importancia en el proceso de maduración y ablandamiento de frutos carnosos. Si bien es posible identificar un dominio catalítico similar al de las glicosil hidrolasas en la secuencia de estas proteínas, a la fecha no se les ha comprobado actividad hidrolítica alguna. Sin embargo, se ha demostrado que son las responsables del fenómeno conocido como “crecimiento ácido”, en el que, a pH ácido, inducen la relajación de paredes celulares aisladas aumentando su tasa de estiramiento ante un esfuerzo constante. La evaluación de su actividad biológica es dificultosa, dado que se realiza mediante un bioensayo en el cual se miden parámetros mecánicos de la pared celular vegetal. Los pocos intentos destinados a la caracterización de la actividad de estas proteínas se han llevado a cabo usando extensómetros no comerciales, diseñados y contruidos especialmente para tal fin, lo cual ha restringido significativamente su estudio a unos pocos laboratorios en el mundo.

En este capítulo se describe la adaptación de un texturómetro comercial a la medida de la actividad expansina usando un método basado en el fenómeno del crecimiento ácido, con el objetivo de desarrollar un protocolo que permita evaluar en forma cuantitativa la actividad de estas proteínas durante el proceso de maduración de frutos de *Fragaria*.

Objetivos

La meta propuesta para la presente sección de la tesis fue adaptar y validar un protocolo para evidenciar el fenómeno de crecimiento ácido y medir actividad expansina usando un texturómetro comercial, equipo común en los laboratorios dedicados a la ciencia de los alimentos o tecnología poscosecha.

En caso de ser exitosa, esta estrategia facilitaría la medida de la actividad de expansina en más laboratorios; asimismo, sería empleada en la medición de actividad expansina en los distintos eventos de transformación de *Fragaria vesca* cv H4 descritos en el siguiente capítulo.

2.1. Materiales y Métodos

2.1.1. Material Vegetal

2.1.1.1 Obtención de hipocótilos de pepino

Se utilizó el extremo apical de hipocótilos de pepino (*Cucumis sativus* cv. Poinsett) como matriz de pared celular en la medición del fenómeno de crecimiento ácido y las medidas de actividad expansiva. Semillas de pepino (*Cucumis sativus* cv. Poinsett) se sanearon con una solución de lavandina comercial al 4% (p/v). Se sumergieron las semillas en la solución de lavandina por 5 minutos con agitación, se las lavó cinco veces con agua destilada y finalmente se las sembró en una mezcla de tierra:perlita en una relación 3:1, o apoyó directamente sobre papel húmedo. La germinación se llevó a cabo en oscuridad a 28 °C por 4 días. Pasados los 4 días se seleccionaron hipocótilos de entre 8 cm y 10 cm de longitud (Fig. 2.1.1) y se les seccionó los 3 cm apicales, descartándose luego tanto los cotiledones como la región basal. Las secciones se congelaron en nitrógeno líquido y se las conservó a -80 °C hasta el momento de su uso (no más de una semana).



Fig. 2.1.1. Hipocótilos etiolados de pepino (*Cucumis sativus* cv. Poinsett).

2.1.1.2. Frutos de *Fragaria x ananassa*

Se obtuvieron frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch. cv Camarosa) de productores locales (La Plata, Pcia. Buenos Aires, Argentina). Los frutos se cosecharon en distintos estadios de maduración: blanco (B), 50% rojo (50% R) y 100% rojo (100% R) (Fig. 2.1.2). Se los seccionó, congeló en nitrógeno líquido y conservó a -20 °C hasta el momento de su uso.

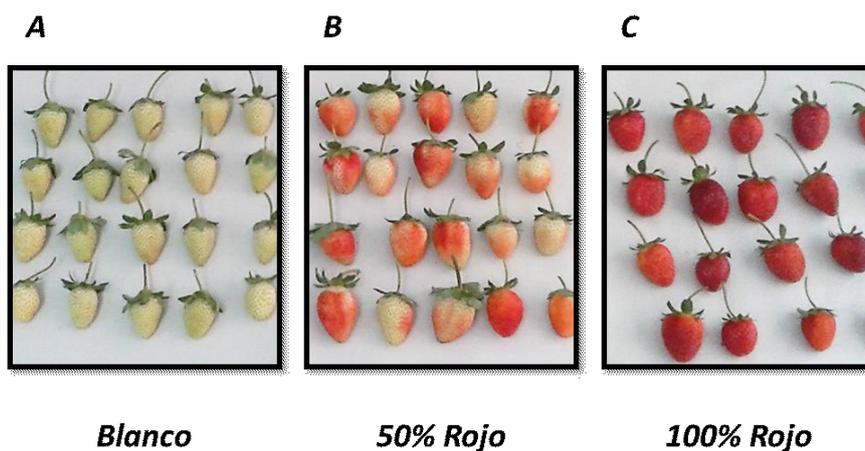


Fig. 2.1.2. Fotografía de las muestras de frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch., cv Camarosa) utilizados en el ensayo. A) Frutos blancos; B) Frutos 50% rojos; C) Frutos 100% rojos.

2.1.2. Extractos proteicos

2.1.2.1. Extracto de hipocótilos de pepino

El protocolo se adaptó del descrito por McQueen-Mason et al. (1992). Se molieron 5 g de secciones apicales de hipocótilos de pepino en nitrógeno líquido. El polvo se resuspendió en 50 mL de buffer A [HAc/NaAc 50 mM, pH 4,5; EDTA (ácido etilendiamintetracético) 2 mM, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM]. La suspensión se homogeneizó, se centrifugó a 10.000 x *g* durante 30 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El residuo insoluble se lavó con 1 volumen de buffer A, se repitió el paso de centrifugación y se volvió a descartar el sobrenadante. El residuo insoluble se resuspendió en 10 mL de buffer B (HEPES 50 mM, pH 6,8; NaCl 1 M, EDTA 2 mM, metabisulfito de sodio 3 mM) y se extrajo durante 1,5 h a 4 °C con agitación suave. Luego del periodo de incubación en frío, la suspensión se centrifugó a 10.000 x

g durante 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante (extracto proteico). Las proteínas extraídas a partir del material vegetal se concentraron mediante un paso de precipitación con acetona. Se agregaron al extracto tres volúmenes de acetona a -20 °C, se homogeneizó e incubó a -20 °C durante 15 min. La suspensión resultante se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. El residuo insoluble (proteínas precipitadas) se lavó con acetona fría y se repitió el paso de centrifugación anterior. Finalmente, la fracción proteica precipitada se resuspendió en buffer C (HAc/NaAc 50 mM, pH 4,5) y se conservó a 4 °C hasta su uso (no más de una semana).

2.1.2.2. Extractos de frutilla

El protocolo de extracción se adaptó del descrito en Harrison y col., (2001). Se prepararon extractos proteicos independientes de frutos de *Fragaria x ananassa* en los siguientes estadios de madurez fisiológica: blanco (B), 50% rojo (50% R) y 100% rojo (100% R). Se molieron 5 g de frutos en cada estadio de madurez en nitrógeno líquido y se resuspendieron en 25 mL de buffer D (MOPS [ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico] 25 mM, pH 7,0, CTAB [bromuro de hexadeciltrimetilamonio] 0,5% p/v, glicerol 30% p/v) a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante, filtró con papel de filtro y precipitó con 3 volúmenes de acetona a -20 °C durante 15 min. La mezcla se centrifugó a 5.000 x g a 4 °C durante 10 min. Se lavó el residuo insoluble con acetona fría y se repitió el paso de centrifugación. Las proteínas precipitadas se secaron al vacío y finalmente se las redisolvió en 3 mL de buffer C (HAc/NaAc 50 mM pH 4,5). Los extractos proteicos se conservaron a 4 °C hasta el momento de uso (no más de una semana).

2.1.3. Crecimiento ácido y actividad expansina

2.1.3.1. Acondicionamiento de hipocótilos

Hipocótilos nativos: este material se utilizó como matriz de pared celular en los ensayos de medición y caracterización del fenómeno de crecimiento ácido. Los extremos apicales de los hipocótilos de pepino aún congelados se sometieron a un

proceso de abrasión con arena de cuarzo, se los lavó con agua destilada y se los comprimió entre dos porta objetos para microscopía con un peso constante de 500 g durante 5 min. Al material preparado de este modo se lo rotuló como “*hipocótilos nativos*” y se lo conservó a 4 °C hasta su uso (dentro del mismo día de preparados; Fig. 2.1.3).

Hipocótilos inactivados: este material se utilizó como control negativo del fenómeno de crecimiento ácido y como matriz de pared celular en las mediciones de actividad expansina. Hipocótilos nativos se sometieron a un proceso de inactivación térmica en un baño de agua a 95 °C por 20 s. Se los rotuló como “*hipocótilos inactivados*” y se los conservó a 4 °C hasta el momento de su uso (dentro del mismo día de preparados; Fig. 1.2.3).

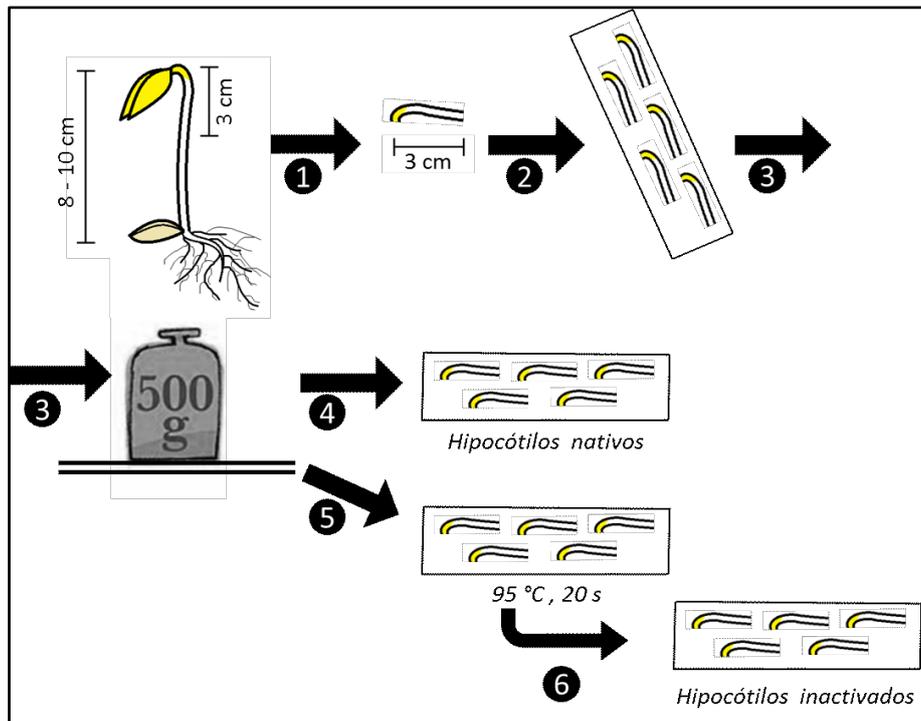


Fig. 2.1.3. Acondicionamiento de los hipocótilos. 1) Sección del extremo apical (3 cm) y abrasión de la epidermis con arena de cuarzo. 2) colocación de los hipocótilos entre dos porta objetos. 3) Compresión con 500 g por 5 min. 4) Obtención de hipocótilos nativos, a ser usados en los ensayos de crecimiento ácido. 5) Inactivación de hipocótilos nativos por tratamiento térmico a 95 °C durante 5 min. 6) Obtención de hipocótilos inactivados, a ser utilizados como controles negativos y como matriz en los ensayos de actividad expansina.

2.1.3.2. Fenómeno de crecimiento ácido

El fenómeno de crecimiento ácido se evaluó determinando el cambio en la tasa de estiramiento de hipocótilos nativos con el cambio de pH del medio, de pH 6,8 a pH 4,5. El ensayo se llevó a cabo aplicando una tensión constante de 20 g durante 4000 s, registrándose el estiramiento de la matriz de pared celular en μm . Durante los primeros 900 s la cubeta se llenó con buffer HEPES [ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-etanosulfónico] 50 mM, pH 6,8; a partir de los 900 s el medio se cambió a buffer HAc/NaAc 50 mM pH 4,5. El crecimiento ácido se calculó luego como la tasa de estiramiento en el paso correspondiente a pH 4,5 y se lo comparó contra un control en el que se usó un hipocótilo inactivado térmicamente. Se hicieron 10 réplicas para cada condición.

Se analizó también el efecto de dos agentes químicos conocidos por inhibir el fenómeno del crecimiento ácido, el NaCl y la urea. El ensayo fue idéntico al descrito anteriormente, con la salvedad del agregado al buffer pH 4,5 de urea 8 M o NaCl en alguna de las siguientes concentraciones 0,1 M, 1 M o 3 M. Todas las medidas se realizaron por quintuplicado.

Todas las mediciones se llevaron a cabo utilizando un texturómetro comercial (TA.TXplus Stable Micro Systems Texture Technologies®, Scarsdale, NY) equipado con pinzas miniatura (A/MTG), una celda de carga PL/CEL/30, para una máxima carga de 30 kg, y una cubeta diseñada especialmente para el ensayo (Fig.2.1.4). La cubeta de 12 mm de largo y 4 mm de diámetro externo se construyó a partir de una jeringa plástica de 1 mL de volumen. Se practicó un pequeño orificio en su lateral inferior, en el que se conectó por medio de una cánula (30 cm de largo, 1 mm de diámetro interno) una válvula de tres vías (T) a la que se conectaron dos jeringas de 1 mL; este dispositivo permitió el intercambio del buffer contenido en la cubeta, sin tocar la muestra de hipocótilo ni detener el ensayo (Fig. 2.1.5). Ambos extremos de la cubeta estaban abiertos a la atmósfera de modo tal de permitir el paso de la matriz de pared celular. El hipocótilo se hizo pasar por la cubeta y sus extremos se ajustaron con las pinzas provistas por el

equipo. Previo al ajuste del hipocótilo, el fondo de la cubeta se selló con una pequeña cantidad de arcilla (plastilina) de modo tal de formar un cierre hermético que impida la pérdida del buffer contenido en su interior. Los datos se adquirieron usando el programa Exponent Lite Analysis Software®, provisto por el equipo, a razón de 1 dato por s.

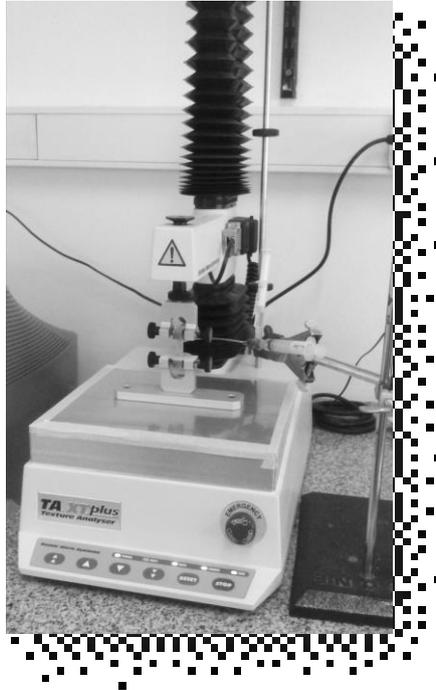


Fig. 2.1.4. Texturómetro comercial TA.XTplus Stable Micro Systems Texture Technologies®, Scarsdale, NY, con el dispositivo empleado en los ensayos de medición del fenómeno de crecimiento ácido y actividad expansina.

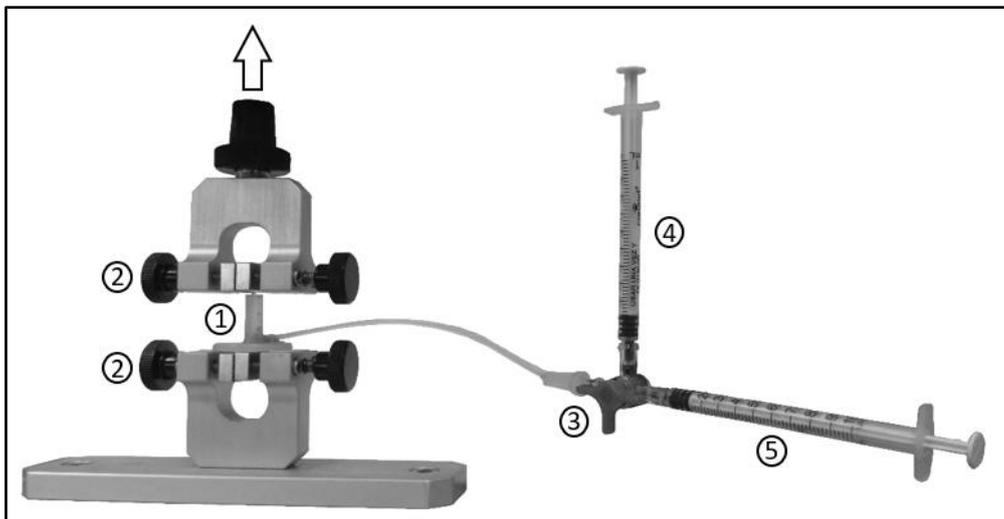


Figura 2.1.5. Fotografía del dispositivo empleado en los ensayos de medición del fenómeno de crecimiento ácido y actividad expansina. (1) cubeta “ad hoc”; (2) pinzas miniatura (A/MTG); (3) válvula T; (4) jeringa 1; (5) jeringa 2. La flecha (↑) indica el sentido del estiramiento

2.1.3.3. Actividad expansina

El ensayo se llevó a cabo de modo similar al protocolo descrito para la medición del fenómeno de crecimiento ácido. En este caso se utilizaron hipocótilos inactivados térmicamente como matriz de pared celular. Los primeros 900 s del ensayo se llevaron a cabo a pH 4,5 (acético/acetato de sodio 50 mM); a dicho tiempo se cambió el medio por una solución de extracto proteico al mismo pH. La medida de actividad expansina se realizó usando el estiramiento de la matriz de pared celular en presencia del extracto proteico. Como control de la inactivación térmica se utilizaron hipocótilos inmersos en solución buffer de la misma composición que el utilizado para el extracto de proteínas ensayado.

Para evitar ambigüedades, se definieron tres formas para referirse a la actividad expansina. Se definió **actividad expansina** como el estiramiento de la matriz de la pared celular (μm) por unidad de tiempo (min); **actividad expansina neta** ($\mu\text{m min}^{-1}$) como el resultado de la resta del estiramiento mecánico del control inactivado al estiramiento en presencia del extracto proteico; **actividad expansina específica** calculada como el cociente entre el valor de la actividad expansina neta y la concentración de proteína total en el extracto ($\mu\text{m mL min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$).

Se evaluó la actividad expansina en extractos proteicos de hipocótilos de pepino y frutos de *Fragaria x ananassa* en estadios B, 50% R y 100% R. También se hizo un ensayo de dosis-respuesta del extracto proteico de frutilla 100% R, usando 6 concentraciones diferentes de proteína (5, 10, 25, 50, 100, 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

2.1.4. Cuantificación de proteínas

Todas las cuantificaciones se llevaron a cabo mediante el método de Bradford, usando Albúmina de suero bobino como referencia (Bradford, 1976).

2.1.5. Análisis de datos

Los datos correspondientes a los ensayos de crecimiento ácido y determinación de actividad expansina se analizaron mediante ANOVA, las medias se compararon con el test de Tukey o Dunnett ($p < 0,05$) dependiendo de cada caso.

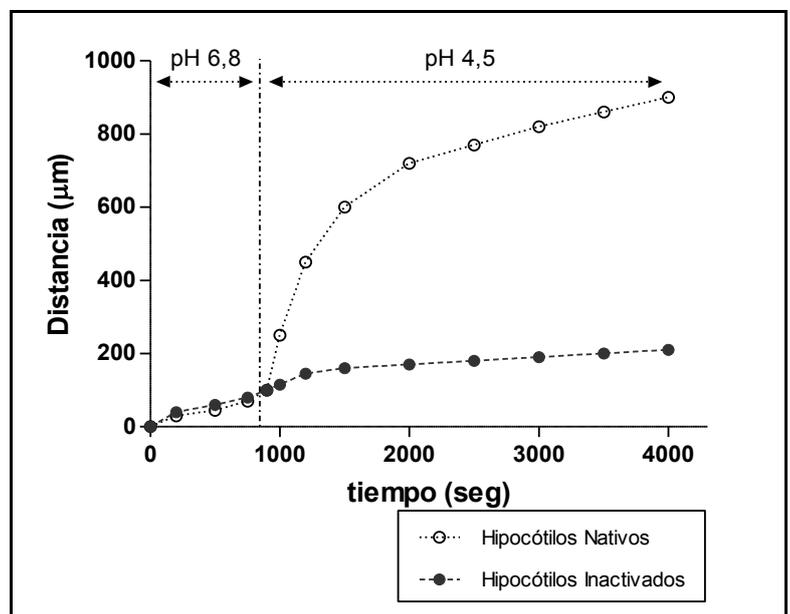
2.2. Resultados

2.2.1. Crecimiento ácido

El fenómeno de crecimiento ácido es el principio en el cual se basa la medida de actividad expansina. Como tal, el primer paso en la adaptación del uso de un texturómetro comercial a la medida de actividad expansina fue la puesta a punto de la medida de este proceso haciendo uso del instrumental descrito en la sección 2.1.3.2.

En los resultados se observó un incremento significativo en la tasa de estiramiento de los hipocótilos nativos con el cambio del pH del medio de 6,8 a 4,5, comparada con la propia de los controles inactivados térmicamente (Fig. 2.2.1). Para el caso de los controles inactivados, si bien fue posible medir una tasa de estiramiento, no se observó respuesta al cambio del pH del medio. Si se comparan las tasas de estiramiento a pH 4,5 de ambos casos, la observada para hipocótilos nativos es aproximadamente 7 veces mayor que la propia de los controles inactivados térmicamente (Fig. 2.2.2).

Fig. 2.2.1. Fenómeno de crecimiento ácido. Representación esquemática de las curvas de distancia vs. tiempo obtenidas en el ensayo de evaluación del crecimiento ácido de los extremos apicales de hipocótilos de pepino. Los círculos llenos (—●—) corresponden al estiramiento de un hipocótilo nativo. Círculos vacíos (---○---) a un hipocótilo inactivado térmicamente (control negativo).



Se evaluó la sensibilidad del método agregando al buffer pH 4,5 agentes químicos con efecto inhibitorio conocido sobre el crecimiento ácido, tal como el NaCl y la urea. En todos los casos ensayados se observó una disminución significativa de la tasa de estiramiento a pH 4,5 de hipocótilos nativos, en comparación con el control sin agentes

inhibitorios. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con NaCl 0,1 M, NaCl 1,0 M y urea 8 M, obteniéndose en todos los casos una tasa de estiramiento a pH 4,5 aproximadamente cuatro veces mayor que para los controles inactivados térmicamente (Fig. 2.2.2). El mayor efecto inhibitorio se observó con NaCl 3,0 M (Fig. 2.2.2), obteniéndose una tasa de estiramiento comparable a la propia de los controles inactivados térmicamente. Todos nuestros resultados coinciden con los descritos previamente por Cosgrove (1989).

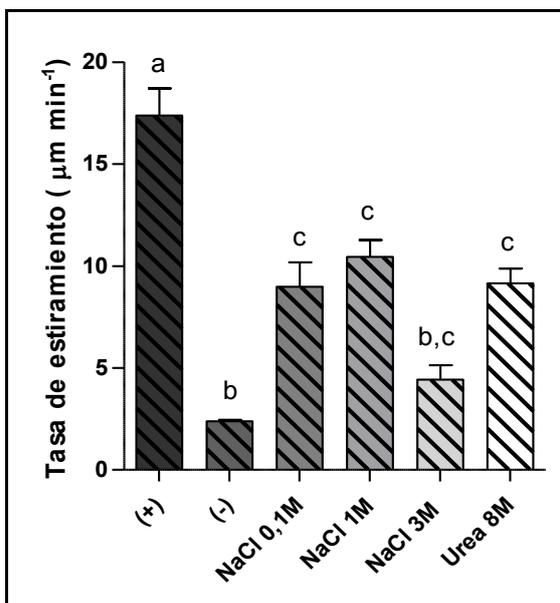


Fig. 2.2.2. Efecto de agentes químicos sobre el crecimiento ácido. Se muestran las tasas de estiramiento de hipocótilos nativos y desnaturalizados, así como también el efecto del NaCl y la urea sobre el fenómeno del crecimiento ácido. Los datos corresponden a las medias \pm el error estándar de diez ensayos independientes para el caso de hipocótilos nativos y desnaturalizados. Para el análisis del efecto de los agentes químicos los resultados corresponden a las medias \pm el error estándar de cinco réplicas independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante un test de Tukey ($p < 0,05$). Letras distintas indican diferencias significativas.

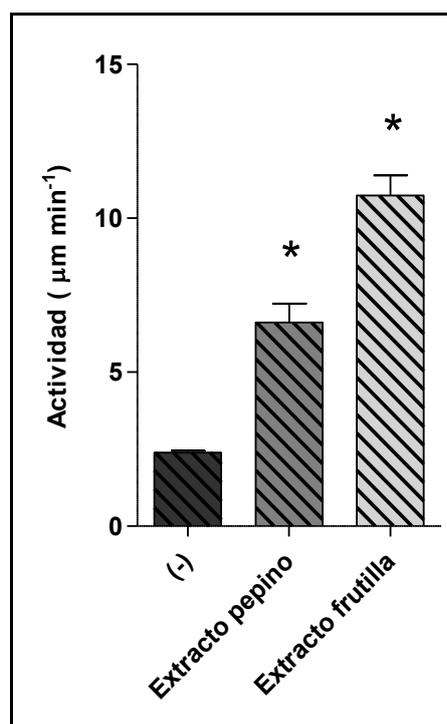
2.2.2. Actividad expansina

La actividad expansina se evaluó midiendo la capacidad de un extracto proteico de reconstituir el fenómeno de crecimiento ácido en hipocótilos desnaturalizados térmicamente. Por este motivo, a los ensayos destinados a la medida de actividad expansina se los denominó “ensayos de reconstitución”.

Como primera medida, se ensayaron extractos proteicos provenientes de hipocótilos de pepino y de frutilla 100% R, intentando repetir los ensayos descritos por McQueen-Mason y col., (1992) y Harrison y col. (2001) en los que se usa el extensómetro “ad hoc”. La tasa de estiramiento de los hipocótilos inactivados térmicamente resultó ser significativamente mayor en todos los casos en los que se

agregó extracto proteico, comparado con los controles a los que se les agregó solamente buffer (Fig. 2.2.3). Se observó un incremento de 2,6 veces en la tasa de estiramiento a pH 4,5 para el caso del extracto de pepino y uno de 4 veces para el caso del extracto de frutilla 100% R. En ambos casos se atribuye el incremento a la actividad de las expansinas presentes en los extractos proteicos.

Fig. 2.2.3. Actividad expansina. Tasas de estiramiento de hipocótilos desnaturalizados térmicamente, a pH 4,5 en presencia y ausencia de extractos proteicos de hipocótilos de pepino o frutilla (100% R). En todos los casos se usó una concentración de proteínas de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados corresponden a las medias de actividad \pm el error estándar de tres determinaciones independientes. Los resultados se analizaron mediante ANOVA y las medias de actividad expansina se compararon contra el control negativo (hipocótilos inactivados) mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$). Los asteriscos indican diferencias significativas.



2.2.3. Variación de actividad expansina durante la maduración

Ante la posibilidad de poder determinar actividad expansina en extractos proteicos, se decidió caracterizar el proceso de maduración del fruto de *Fragaria x ananassa* cv. Chandler desde el punto de vista de la actividad total de esta proteína. Se hicieron extractos proteicos siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.1.2.2 de frutos en los estadios B, 50% R y 100% R y se evaluó la actividad expansina en cada uno de ellos (Fig. 2.2.4).

Se encontraron diferencias significativas en la actividad expansina neta de los estadios 100% R y 50% R comparados con el control en ausencia de extractos proteicos. No fue posible diferenciar estadísticamente la actividad expansina medida en los estadios 100% R y 50% R entre sí, ni tampoco entre los estadios B y el control sin

extracto proteico. Si bien tampoco se observan diferencias significativas en la actividad expansina neta en los estadios B y 50% R, el conjunto de resultados permite observar una tendencia creciente en la actividad expansina a lo largo del proceso de maduración del fruto.

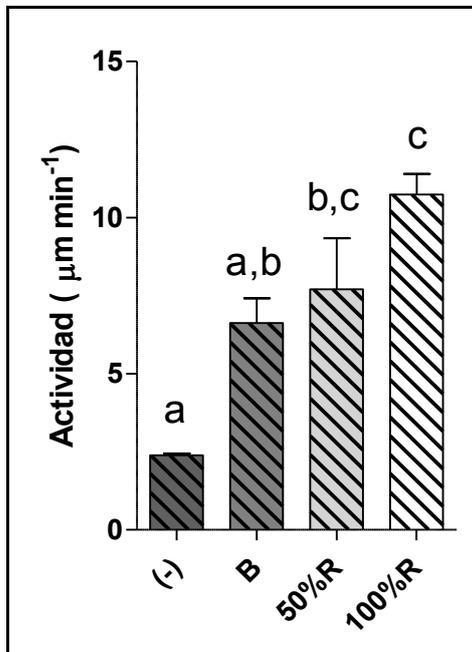


Fig. 2.2.4. Actividad expansina y maduración de frutilla. Se muestran las tasas de estiramiento de hipocótilos desnaturalizados térmicamente en presencia de extractos proteicos de frutos de distintos estadios de madurez, Blanco (B); 50% R y 100% R. En todas las determinaciones se usaron diluciones de los extractos de concentración 250 µg mL⁻¹. Como control (-) se utilizaron hipocótilos inactivados térmicamente. Los resultados corresponden a las medias de actividad expansina neta ± SE de tres determinaciones independientes. Los resultados se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon con un test de Tukey (p<0,05). Distintas letras indican diferencias significativas.

2.2.4. Dosis respuesta

Con el objeto de determinar tanto la sensibilidad del método cómo la concentración mínima de proteína necesaria en los extractos para la medición de la actividad expansina en frutilla, se decidió llevar a cabo una curva dosis/respuesta, usando para ello un extracto proteico correspondiente a frutos 100% R a distintas concentraciones (Fig. 2.2.5). Los resultados indicaron que es posible medir actividad expansina en el extracto 100% R incluso a concentraciones de proteína de 75 µg/mL.

2.2.5. Actividad expansina: definición de una unidad enzimática

Una de las dificultades que se presentan a la hora de trabajar con expansinas es la falta de acuerdo para expresar la actividad de la enzima. Si bien en la mayoría de los intentos por caracterizar a estas enzimas se usan ensayos basados en el crecimiento ácido, no existe consenso en la forma de expresar la actividad de las expansinas.

En el presente trabajo los resultados se muestran utilizando la definición original de los primeros trabajos en los que se describen estas proteínas, por lo cual actividad expansina ($\mu\text{m min}^{-1}$) se refiere al estiramiento total del tejido a pH 4,5. Sin embargo, con el objetivo de facilitar la comparación de la actividad expansina en futuros trabajos se definieron dos unidades de actividad expansina, de forma análoga a las unidades utilizadas para la descripción de enzimas convencionales. Se definió actividad expansina neta ($\mu\text{m min}^{-1}$) a la diferencia entre el estiramiento observado en presencia del extracto proteico y el estiramiento mecánico del control. Se definió como actividad expansina específica ($\mu\text{m min}^{-1} \mu\text{g mL}^{-1}$) al cociente entre el valor de la actividad expansina neta y la concentración de proteínas del extracto.

En la tabla 2.2.1 se resumen los resultados obtenidos para cada caso, discriminando entre actividad expansina, actividad expansina neta y actividad expansina específica. Se aclara en cada caso la concentración de proteínas del extracto ensayado.

Fig. 2.2.5. Dosis-respuesta. Determinación de la actividad expansina en distintas diluciones del extracto proteico de frutos 100% R. Los datos mostrados corresponden a las medias de actividad expansina \pm el error estándar de tres determinaciones independientes. Los resultados se analizaron mediante ANOVA y las medias de actividad se compararon contra el control negativo (hipocótilos inactivados térmicamente) mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los extractos y el control de hipocótilos inactivados.

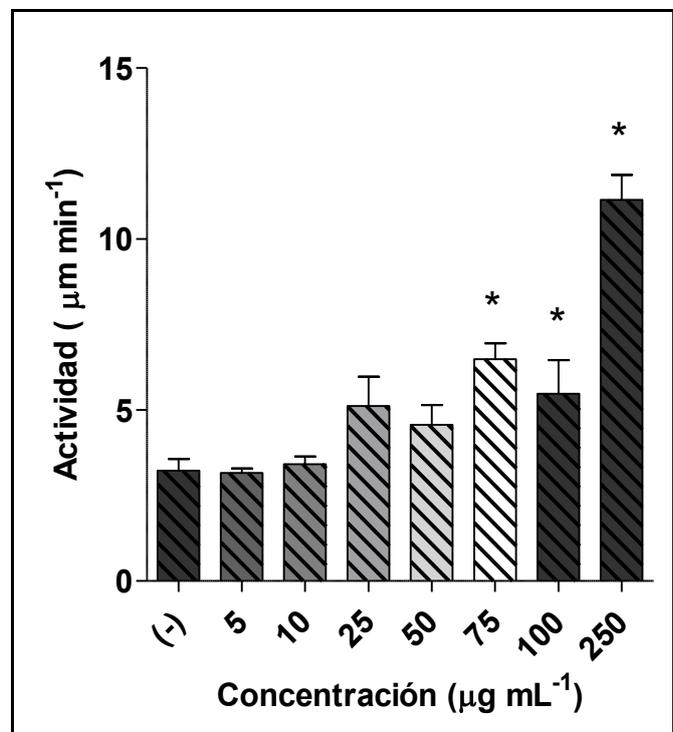


Tabla 2.2.1. Actividad Expansina, actividad expansina neta y actividad expansina específica.

Extracto Proteico	Concentración de Proteína ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Actividad Expansina ($\mu\text{m.min}^{-1}$)	Act. Exp. Net ($\mu\text{m.min}^{-1}$) ^b	Act. Exp. Específica ($\mu\text{m mL.min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$) ^c
Hipocótilos de pepino	250	6,6129±0,6111	4.23±0.61	0.0169±0.0024
Frutilla 100%R	250	10,7419±0,6551	7.93±0.73	0.0317±0.0029
Frutilla 50%R	250	7,7097±1,6234	4.49±1.62	0.0179±0.0065
Frutilla W	250	6,6194±0,7946	3.40±0.79	0.0136±0.0032
Frutilla 100%R	5	3,1613±0,1333	ND	ND
Frutilla 100%R	10	3,4194±0,2219	0.20±0.22	0.0008±0.0009
Frutilla 100%R	25	5,1226±0,8563	1.90±0.86	0.0076±0.0034
Frutilla 100%R	50	4,5677±0,5824	1.34±0.58	0.0054±0.0023
Frutilla 100%R	75	6,4903±0,4652	3.27±0.47	0.0131±0.0019
Frutilla 100%R	100	5,4774±0,9872	2.25±0.99	0.0090±0.0039
Frutilla 100%R	250	11,1484±0,7266	7.93±0.73	0.0317±0.0029

^a Actividad expansina, calculada como la tasa de estiramiento correspondiente al paso a pH 4,5 ($\mu\text{m.min}^{-1}$). Los datos corresponden a las medias \pm el error estándar de tres determinaciones independientes.

^b Actividad expansina neta, calculada como la resta de la tasa estiramiento del control inactivado a la tasa estiramiento dada la presencia del extracto proteico ($\mu\text{m.min}^{-1}$). Los datos corresponden a las medias \pm el error estándar de tres determinaciones independientes.

^c Actividad expansina específica, calculada como el cociente entre la actividad expansina neta y la concentración de proteína del extracto ($\mu\text{m mL.min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$). Los datos corresponden a las medias \pm el error estándar de tres determinaciones independientes.

ND: no detectado.

2.3. Discusión

La teoría del crecimiento ácido fue propuesta por primera vez en 1970 por R. Cleland, A. Hager y colaboradores, vincula a las auxinas con la expansión celular observada en ciertos tejidos vegetales, principalmente en coleoptilos de cereales y otras gramíneas. Establece que las auxinas inducen la acidificación de las inmediaciones de la pared celular vegetal estimulando la síntesis de bombas que secretan protones desde el citoplasma al apoplasto. La acidificación del medio activa enzimas encargadas de interferir con las uniones de soporte de carga de la pared celular. Este fenómeno permite la expansión de la pared producto de la presión de turgencia de la célula y, por lo tanto, la expansión celular.

No fue sino hasta 1989 que Daniel J. Cosgrove (Cosgrove, 1989) comprobó que el fenómeno está mediado por proteínas, llegando a la conclusión de que es un fenómeno dependiente de enzimas. De acuerdo con el autor, el fenómeno del crecimiento ácido imita el proceso de extensión celular in vivo, pudiendo utilizarse su medida en diversos tejidos vegetales para discernir entre las paredes celulares en activo crecimiento de las que no encuentran atravesando dicho proceso. La sensibilidad de la técnica utilizada en su medición sería suficiente para poder diferenciar entre las dos condiciones.

En 1992 Mc Queen-Mason y colaboradores (McQueen-Mason y col., 1992) demostraron que la pared celular de hipocótilos inactivados térmicamente podía recuperar su capacidad de extensión a pH ácido, agregando al medio un extracto proteico obtenido a partir de hipocótilos de pepino. Luego, identificaron a los agentes responsables de dicho fenómeno, una familia diversa de proteínas a las que se las denominó expansinas. Desde su descubrimiento se han identificado un alto número de homólogos en distintas especies de diferentes reinos (Cosgrove, 2015).

Originalmente, la actividad expansina se evaluó en forma cualitativa por medio de ensayos de reconstitución del fenómeno de crecimiento ácido. Con el correr de los años

se han ido desarrollando diversos métodos para el estudio de distintos aspectos de la mecánica de la pared celular vegetal. Los métodos más relevantes en el uso de un extensómetro son: (1) fuerza de ruptura, (2) elasticidad y plasticidad, (3) relajación luego de un estrés y (4) crecimiento ácido (Cosgrove, 2011). Algunas de estas técnicas se adaptaron a la medida de la actividad expansina, tal como el ensayo de relajación de la pared celular luego de un estrés inducido por estiramiento (Goulao y col., 2007). Esta última técnica, si bien permite determinar actividad expansina, resulta ser poco sensible a pequeñas variaciones (Cosgrove, 2011) y presenta la desventaja adicional de que el análisis matemático de los datos obtenidos en el ensayo es dificultoso. En cambio, el ensayo de reconstitución del fenómeno de crecimiento ácido se ha convertido en la técnica de preferencia para la evaluación de la actividad expansina dada la sencillez en su desarrollo y análisis, así como su alta sensibilidad para detectar la acción de α - y β -expansinas (Cosgrove, 2011). Sin embargo, a la fecha, para poder llevar a cabo los ensayos se requiere de la construcción de un extensómetro “*ad-hoc*”, similar al empleado por McQueen-Mason y col., (1992), Cosgrove y col., (2002) y Harrison y col., (2001), lo que ha restringido considerablemente el estudio de la actividad de esta familia de proteínas.

Esta dificultad experimental ha llevado a que la mayoría de los estudios realizados sobre expansinas se basen en datos de expresión génica a nivel de ARNm (Northern-blot o RT-qPCR) y a nivel de proteína por ensayos de inmuno detección con anticuerpos específicos (Western-blot), mientras que existen escasos reportes sobre la actividad de estas proteínas.

Para el caso particular de frutilla, Dotto y col., (2006) reportaron la expresión de cinco expansinas diferentes (FaEXP1, 2, 4, 5 y 6) tanto a nivel de ARNm (Northern-blot) como de proteína (Western-blot). De acuerdo con sus resultados, FaEXP2 y FaEXP5 son expansinas específicas de fruto, y sus niveles de expresión se incrementan significativamente a lo largo del proceso de maduración. Para el caso de FaEXP1, si bien se detectó su expresión a nivel de ARNm en otros tejidos (altos niveles en: raíces,

hojas, sépalos, estambres; baja intensidad en: ovarios, tallos y pecíolos), en fruto los niveles de ARNm aumentan con la maduración al igual que FaEXP2 y FaEXP5. La expresión de FaEXP4 y FAEXP6 se detectó en varios tejidos, al igual que para el caso de FaEXP1, sin embargo, sus niveles de ARNm no se ven alterados sustancialmente a lo largo de la maduración. Los ensayos de expresión a nivel de ARNm reportados en Dotto y col., (2006) se complementaron con estudios a nivel de proteína por medio de inmunodetección por western-blot, usando anticuerpos anti-expansina generados contra la expansina 1 de tomate LeEXP1. Los resultados mostraron una acumulación de expansinas en el estadio 100% Rojo, siendo bajo el contenido de estas proteínas para el estadio 50% Rojo y nulo para el estadio Blanco.

Los resultados de Dotto y col., (2006) se condicen con los reportados por Harrison y col., (2001), quien utilizó un anticuerpo generado contra la expansina 1 de pepino (Cs-EXP1). Cabe destacar que en ninguno de los trabajos mencionados se utilizó anticuerpos generados contra expansinas de frutilla, usándose anticuerpos heterólogos y promiscuos capaces de reconocer a más de una expansina.

Harrison y col., (2001) también reportaron un ensayo de carácter cualitativo en el que se muestra actividad expansina de extractos de frutilla en distintos estadios de madurez. En dicho ensayo se utilizaron tiras de una matriz compuesta por celulosa/xyloglucanos, estiradas a fuerza constante de 11 gr en presencia y ausencia de los extractos proteicos ($1,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Sus resultados muestran una tendencia al incremento en la actividad expansina durante la maduración del fruto, siendo la actividad baja para el estadio blanco e incrementándose significativamente hacia el estadio sobremaduro.

Ambos reportes (Dotto y col., 2006; Harrison y col., 2001) revelan la importancia y la necesidad de un estudio más completo de las expansinas y su rol en el proceso de maduración de los frutos de *Fragaria x ananassa*.

Los resultados del presente capítulo demuestran que es posible realizar dicho estudio en forma confiable y reproducible usando un texturómetro comercial, equipo

común en laboratorios dedicados al estudio de frutos y tecnología poscosecha, equipado con una cubeta “*ad-hoc*”, de fácil construcción a partir de una jeringa plástica de 1 mL. Como método de medida se eligió al ensayo de reconstitución del fenómeno del crecimiento ácido de la pared celular vegetal dada su sencillez a la hora del desarrollo de la medida y por su mayor sensibilidad en comparación con otras técnicas destinadas al mismo fin.

El protocolo adaptado permitió reproducir el fenómeno de crecimiento ácido, obteniéndose resultados similares a los obtenidos con el extensómetro “*ad hoc*” (Cosgrove, 1989). Se observó un aumento significativo de siete veces en la tasa de estiramiento de los hipocótilos nativos con el cambio de pH del medio de 6,8 a 4,5, comparados con la propia de los controles inactivados térmicamente. También se pudo apreciar el efecto inhibitorio del NaCl y de la urea sobre el fenómeno de crecimiento ácido. Cabe señalar que el NaCl es utilizado en los buffers de extracción de expansinas y otras proteínas asociadas a la pared celular vegetal. En tales casos, la alta fuerza iónica del medio rompe la asociación entre las proteínas y los componentes de la pared celular, facilitando su extracción. En el caso de su efecto sobre el crecimiento ácido, es posible que la pérdida del contacto íntimo entre las expansinas y la pared celular sea la responsable del efecto inhibitorio del crecimiento ácido, efecto que aumenta con el incremento de la concentración de la sal. Por el contrario, la urea es un agente caotrópico que a altas concentraciones desnaturaliza las estructuras de las proteínas. Por lo tanto, su efecto inhibitorio probablemente se deba a la desnaturalización de las expansinas propias del hipocótilo. Probablemente la inhibición no es completa dado el tiempo del ensayo y la capacidad del agente de difundir al interior de la matriz celular.

En lo que respecta a las medidas de actividad expansina en los extractos de frutilla, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Harrison y col., (2001) en los que se usó el extensómetro “*ad hoc*”. Se detectó un incremento continuo de la actividad expansina a lo largo del proceso de maduración del fruto, sin embargo, resulta difícil hacer una comparación entre los resultados propios y los reportados por Harrison

y col., (2001). Si bien estos últimos autores presentan sus resultados como valores medios de tres medidas con su correspondiente error estándar, sus resultados no incluyen ningún análisis estadístico. De todos modos, tampoco sería correcto hacer una comparación directa entre los resultados, pues el protocolo utilizado por Harrison y col., (2001) presenta variaciones respecto al utilizado en nuestro caso (distinta matriz de pared celular, distinta fuerza de estiramiento, distinta concentración de proteínas). A pesar de ello, las tendencias y valores absolutos de actividad expansina reportados en cuanto a la actividad a lo largo de la maduración son muy similares a nuestros resultados obtenidos siguiendo el protocolo descrito en las secciones 2.1.2.2 y 2.1.3.3. Este es un ejemplo más de la dificultad que se tiene como consecuencia de la falta de homologación de la expresión de la actividad de estas enzimas. Tal vez expresándola usando la definición de actividad específica propuesta en esta sección los valores podrían ser comparados en forma más directa.

Se destaca el hecho de que también hay coincidencia entre el comportamiento de la actividad expansina observado y los perfiles de expresión reportados en Dotto y col., (2006) y Harrison y col., (2001).

En nuestro caso particular, el límite de sensibilidad del método adaptado para el extracto proteico de un fruto 100% R se determinó en una concentración de proteínas de $75 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pudo detectarse actividad expansina por encima de $75 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que, por debajo de ese valor, no se observó diferencia estadística entre las actividades medidas y el control negativo.

Es importante destacar la importancia de la composición del buffer de extracción de expansinas para un tejido determinado en el éxito de la medida de la actividad expansina. Al igual que Harrison y col., (2001), nosotros no logramos tener éxito en la medida de actividad expansina cuando usamos en frutilla el buffer de extracción diseñado para hipocótilos de pepino y viceversa (uso en pepino del buffer de extracción diseñado para frutilla).

Todos los ensayos de medida de actividad se realizaron usando el equipo TA.XTplus Stable Micro Systems Texture Technologies®, equipado con una celda de carga PL/CEL/30, para una carga máxima de 30 kg. El equipo ofrece la posibilidad de usar una celda de carga de menor capacidad, tal como la PL/CEL/5 o PL/CEL/1 para 5 kg o 1 kg de capacidad máxima de carga respectivamente. Si bien en las condiciones utilizadas el equipo demostró ser lo suficientemente sensible como para realizar los ensayos, la fuerza aplicada sobre la matriz de pared celular se encuentra cercana al límite inferior del rango de uso de la celda. Por lo tanto, teniendo en cuenta el orden de magnitud de la fuerza necesaria para este bioensayo, es posible que el uso de una celda con una menor capacidad de carga mejore la precisión de la medida de la fuerza aplicada sobre la matriz de pared celular, con el concomitante aumento en la sensibilidad del ensayo. Las mismas consideraciones son aplicables a texturómetros similares de otras marcas.

CAPÍTULO 3

SOBREEXPRESIÓN DE CBM-FAEXP2 EN FRAGARIA VESCA CV HAWAII 4

3. Sobreexpresión de CBM-FaEXP2 en *Fragaria vesca* cv Hawaii 4

Resumen

Uno de los factores determinantes de la calidad y vida poscosecha de frutos carnosos es su firmeza, impuesta en gran medida por la resistencia mecánica que ofrece la pared celular vegetal. El fenómeno del ablandamiento de frutos es un proceso altamente regulado en el que participan diversos actores en forma concertada y redundante. Las expansinas (EXPs) son proteínas no hidrolíticas relevantes para el metabolismo de la pared celular vegetal, principalmente en procesos donde es necesaria la relajación de la pared, tal como lo es el fenómeno de ablandamiento. Estas proteínas se caracterizan por presentar un módulo catalítico similar al de las glicosilhidrolasas y un módulo de unión a carbohidratos con fuerte afinidad por celulosa.

En el presente capítulo se analiza la posibilidad de utilizar la sobre-expresión del módulo de unión de carbohidratos de la expansina dos de *Fragaria x ananassa* (FaEXP2) para controlar el fenómeno de ablandamiento usando *Fragaria vesca* cv Hawaii 4 como sistema modelo. La idea central es que la expresión de una proteína con la capacidad de unirse a carbohidratos, pero carente de actividad hidrolítica sobre los mismos, generaría una competencia por el sustrato con el resto de las enzimas involucradas en el metabolismo de la pared celular, lo cual provocaría una reducción global del metabolismo de la pared celular.

Se analizan distintos parámetros de calidad, la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la pared celular y la actividad expansina y poligalacturonasa en frutos transgénicos sobreexpresantes de CBM-FaEXP2.

Objetivos

El objetivo propuesto para esta sección de la tesis fue evaluar el efecto de la sobreexpresión del CBM-FaEXP2 sobre el ablandamiento en frutilla, para lo cual se analizaron plantas transgénicas de *Fragaria vesca* cv Hawaii 4 sobreexpresantes de dicha proteína recombinante.

3.1. Materiales y Métodos

3.1.1. Material vegetal

Se caracterizaron plantas transgénicas de *Fragaria vesca* sobreexpresantes de CBM-FaEXP2 en la pared celular. Estas plantas fueron obtenidas previamente por otros integrantes del grupo, pero no habían sido caracterizadas. A continuación, en las secciones 3.1.1.1 y 3.1.1.2, se describe brevemente la construcción generada y el método de transformación utilizado por la Dra. Cristina Nardi y el Dr. Hernán Rosli, respectivamente.

3.1.1.1. Clonado y construcción del plásmido pK7WG2D.1[CBM-FaEXP2]

El clonado y la construcción del plásmido pK7WG2D.1[CBM-FaEXP2] fue realizado por la Dra. Cristina Nardi en el laboratorio de Fisiología de la Maduración y Senescencia de Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB INTECH, CONICET-UNSAM) con sede en Chascomús, provincia de Buenos Aires.

Se siguió el diseño descrito por Nardi y col., (2015) en el armado de la construcción destinada a la sobreexpresión de la proteína recombinante CBM-FaEXP2 en la pared celular vegetal de *Fragaria vesca* cv. Hawaii 4. Se utilizó el programa en línea SignalP 4.0 del sitio <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (Petersen y col., 2011) y la base de datos ProSite [<http://prosite.expasy.org/>; (Sigrist y col., 2013)] para identificar y delimitar el péptido tránsito (PT) y los dominios conservados en la proteína CBM-FaEXP2, respectivamente.

La secuencia codificante para el péptido tránsito se fusionó a la propia del módulo de unión a carbohidratos (CBM) en dos reacciones de PCR consecutivas (PCR1 y PCR2) usando cebadores específicos y un plásmido con el ADNc completo del gen *FaExp2* como molde. Luego se hizo uso del sistema de recombinación GateWay® para generar los respectivos clones de entrada y de expresión con el producto de la PCR2 y reacciones BP y LR estándar, con los plásmidos pDONR221 y pK7WG2D.1 respectivamente. El vector binario pK7WG2D.1 tiene como marcadores de selección un

gen de resistencia a kanamicina y el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) y, el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (P35S-CaMV) para dirigir la expresión del gen de interés (GOI, neologismo del inglés “*gen of interest*”).

El par de cebadores usados en la reacción PCR1 consistió de: Cebador sentido 1F, un cebador quimérico que contiene el sitio de recombinación attb1 (en minúsculas) y 22 nucleótidos complementarios a la secuencia que codifica al péptido tránsito (mayúsculas): 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAatggctttacttcatgcttg-3'; cebador antisentido, 1R, cebador quimérico que contiene secuencia complementaria al péptido tránsito (PT) y 23 nucleótidos complementarios al extremo 5' de la secuencia que codifica al CBM (subrayado): 5'-TGCCCGTTGATTGTGAATCTGATggcataggtgcctctga-3'. El producto de PCR se purificó haciendo uso del kit GE Healthcare PCR purification kit, y luego se utilizó en la reacción PCR2 como cebador sentido.

El par de cebadores usados en la reacción PCR2 estaba formado por: Cebador sentido 2F, producto de la reacción de PCR1: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAatggctttacttcatgcttgGCTATTACTCTTCTGGTATCTGTCCTCAACCTCTGCAtcagaggcacctatgccATCAGATTCACAATCAACGGGCA-3'; Cebador antisentido 2R, cebador quimérico que contiene la secuencia del sitio de recombinación attb2 (minúsculas), un codón de stop (subrayado) y 21 nucleótidos complementarios al extremo 3' de la secuencia que codifica al CBM, 5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtaCTAGAATTGACCGCCTGAAAACGT-3'.

3.1.1.2. Transformación de *Fragaria vesca*

La transformación de explantos de *F. vesca* Hawaii 4 (PI551572) fue realizada por el Dr. Hernán Rosli en colaboración con el Dr. Kevin Folta (Universidad de Florida, Gainesville). El constructo pK7WG2D.1[CBM-FaEXP2], portador de los elementos necesarios para la sobreexpresión de la proteína recombinante CBM-FaEXP2 en la pared celular de *F. vesca*, fue utilizado para transformar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101. A partir de las mismas, se infectaron

explantos de hoja de *F. vesca* cv. Hawaii 4 (PI551572) mediante co-cultivo y finalmente se regeneraron plantas transformadas por medio del cultivo “*in vitro*” de los tejidos transformados. Los callos obtenidos fueron cultivados en medio de multiplicación en placa, utilizando el antibiótico kanamicina como presión de selección, y luego se agregaron diferentes reguladores del crecimiento a fin de provocar la diferenciación y la regeneración de la planta.

Una vez regenerados, los eventos se propagaron y mantuvieron mediante clonación por estolón.

3.1.1.3. Clasificación de los frutos de acuerdo al estadio de madurez

El cultivar *F. vesca* cv. Hawaii 4 presenta la particularidad de que los frutos no desarrollan el color rojo característico de la mayoría de las variedades de frutilla durante la maduración, permaneciendo prácticamente blancos durante la totalidad de su desarrollo. Este hecho dificultó una rápida clasificación visual de los distintos estadios de madurez. Sin embargo, se pudieron distinguir 5 estadios de madurez fisiológica (Fig. 3.1.1), en función de distintas características morfológicas de los frutos. Dichos estadios se numeraron en forma arbitraria del 1 al 5 siguiendo el desarrollo del fruto. El estadio 1 (E1) se caracterizó por un fruto pequeño aún verde con los aquenios en contacto entre sí. En el estadio 2 (E2), comienza a perderse el color verde y se distingue una pequeña separación entre los aquenios. En el estadio 3 (E3) se denota un incremento en el tamaño del fruto, no se aprecia el color verde, los aquenios se encuentran separados, pero aún no toman el color pardo característico de los estadios sucesivos. En el estadio 4 (E4) el fruto adquiere el tamaño final, al igual que el color de los aquenios. El estadio 5 (E5) se caracteriza por el color pardo de los frutos, indicio del comienzo de su descomposición (Fig. 3.1.1).

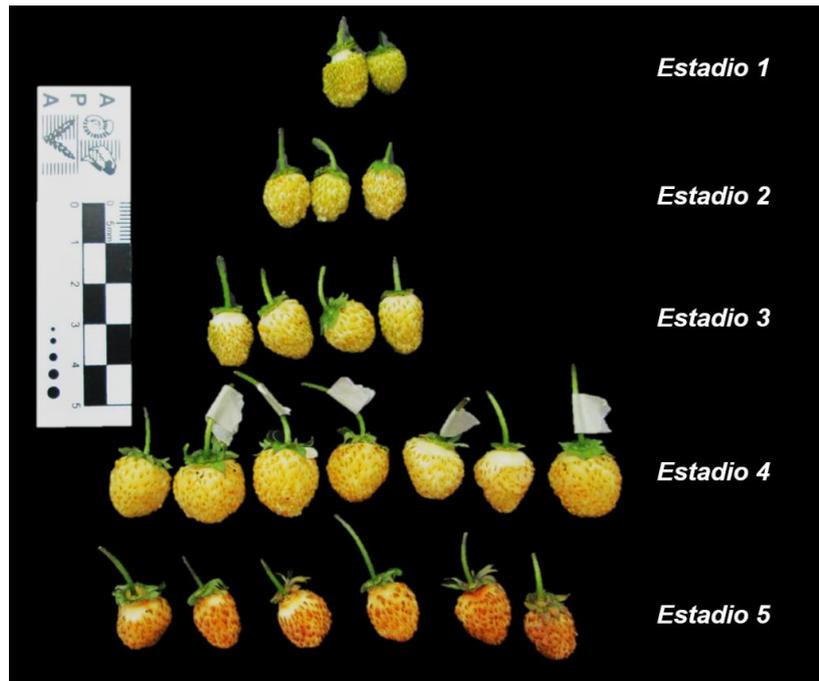


Fig. 3.1.1. Estadios de madurez fisiológica de frutos de *Fragaria vesca* cv. H4.

3.1.2 Extracción de ARN

3.1.2.1. Método del borato caliente

Se hizo extracción de ARN total de frutos *F. vesca* cv. H4 a partir de estadio tres de maduración (E3), tanto en frutos de tipo salvaje como de los provenientes de los distintos eventos de transformación, utilizando el método del borato caliente (Wan y Wilkins, 1994). El mismo se desarrolló en 3 etapas de un día cada una.

Día 1

Se trituraron 2 g de tejido con nitrógeno líquido y se agregaron 15 mL de buffer de extracción (borato de sodio decahidratado [Borax] 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 1% p/v y deoxicolato de sodio 1% p/v, pH 9) suplementado con DTT 10 mM, nonidet P-40 1% v/v y PVP-40 2% p/v, precalentado a 80 °C. A cada homogenato se le agregó 150 µL de solución de Proteinasa K (Promega, 20 mg mL⁻¹) y se lo incubó a 42 °C durante 90 min. Posteriormente se le agregó a cada muestra 100 µL de KCl 2 M por cada 1 mL de buffer de extracción agregado y se incubaron las muestras en hielo durante 60 min. Se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se agregó

un volumen de LiCl 8 M igual a 1/3 del volumen recuperado; se dejó a 4 °C durante toda una noche para precipitar el ARN.

Día 2

Se centrifugaron las suspensiones a 10.000 x *g* durante 20 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se lavó el residuo insoluble (mayormente ARN) 2 veces con LiCl 2 M, centrifugando luego de cada lavado a 10.000 x *g* durante 10 min a 4 °C. El residuo insoluble obtenido se resuspendió en 2 mL de buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y se centrifugó a 10.000 x *g* durante 10 min a 4 °C. Se recuperaron los sobrenadantes, se les agregó 200 µL de KAc 2 M, pH 5,5 y se los incubó en baño de agua-hielo durante 30 min para precipitar los polisacáridos. Se centrifugó a 10.000 x *g* a 4 °C durante 10 min, y se recuperaron los sobrenadantes. A cada uno de ellos se les agregó 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se los incubó a -80 °C durante 2,5 h. Posteriormente se centrifugó a 9.000 x *g* durante 30 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El residuo insoluble obtenido, constituido mayormente por ARN, se lavó con etanol 70% v/v, se centrifugó a 11.000 rpm durante 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se eliminaron los residuos de etanol por evaporación al vacío. El ARN precipitado se disolvió en 300 µL de agua mQ tratada con DPEC (Dietilpirocarbamato) y se lo volvió a precipitar agregando 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Las muestras se dejaron precipitando durante toda una noche a -20 °C.

Día 3

Luego del paso de precipitación, las muestras se centrifugaron a 16.000 x *g* durante 20 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se lavó el material precipitado con etanol 70% v/v, centrifugando luego a 16.000 x *g* por 5 min a 4 °C para separar el material precipitado. Luego de eliminar el etanol residual en los precipitados por desecado al vacío, se disolvió el ARN en 30 µL de agua mQ tratada con DEPC.

Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su uso.

3.1.2.2. Método del CTAB modificado

Se extrajo ARN total de frutos de *F. vesca* cv H4 tipo salvaje y de cuatro eventos de transformación (CBM2, CBM3, CBM4 y CBM 5) en cuatro estadios de madurez (E2, E3, E4 y E5), siguiendo el protocolo del CTAB modificado (Amaya y col, 2016), ajustado al material y equipos disponibles en el laboratorio.

Se pesaron 200 mg de fruto pulverizado en presencia de nitrógeno líquido en tubos eppendorf pre-enfriados de 1,5 mL, se agregó 600 µL de buffer de extracción precalentado a 65 °C, se homogeneizó por agitación con vórtex e incubó a 65 °C durante 10 min. Luego de la incubación en caliente, se centrifugó a 10.000 x *g* a 4 °C durante 5 min, se eliminó el residuo sólido y se separó el sobrenadante. Se hizo una extracción orgánica agregando el mismo volumen de solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) y luego de homogeneizar en vórtex, la muestra se centrifugó a 11.000 x *g* a 4 °C por 10 min para separar las fases. Se recuperó la fase acuosa y se repitió el paso de extracción orgánica una vez más. Luego de los pasos de extracción orgánica, se precipitó el ARN total extraído del tejido agregando a la fase acuosa recuperada LiCl hasta una concentración final de 3 M (3/5 del volumen recuperado en caso de usarse una solución stock de LiCl 8 M), y se dejó en agua-hielo durante 60 min. El ARN precipitado se separó por centrifugación a 17.000 x *g* a 4 °C durante 40 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 500 µL de SSTE precalentado a 65 °C. Una vez resuspendido, se repitió el paso de extracción orgánico con solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v). La fase acuosa se trasvasó a un tubo limpio, se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,2 volúmenes de solución de acetato de sodio 3 M y se precipitó el ARN durante 60 min a -20 °C. Se centrifugó a 17.000 x *g* durante 30 min y se eliminó el sobrenadante. El material precipitado se lavó con 500 µL de solución de etanol 70% (v/v), se secó al vacío y finalmente se disolvió en 25 µL de agua mQ tratada con DEPC. El contenido y pureza de las muestras de ARN se determinó espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 260 nm y 280 nm y luego se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su uso.

Buffers utilizados:**Buffer de extracción de ARN**

- 2% (p/v) CTAB
- 2% (p/v) PVP-40
- 2 M NaCl
- 100 mM Tris-HCl
- 25 mM EDTA
- 2% beta-mercaptoetanol
- pH 8.0

Buffer SSTE

- 10 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA
- 0.5% SDS
- 1 M NaCl
- pH 8.0

Notas:

- Usar guantes en todo momento.
- Esterilizar todo el material y soluciones en autoclave.
- Mantener las muestras en hielo en todo momento, salvo en el paso de disolución del ARN en buffer SSTE, para evitar la precipitación del SDS.
- Almacenar tanto el buffer de extracción como el SSTE a 30 °C para mantener los reactivos en solución.

3.1.3. Análisis del ARN total

Para chequear la integridad del ARN extraído, cada muestra de ARN total (2 μL) fue analizada mediante electroforesis en geles de agarosa desnaturizantes (agarosa 1% p/v, formaldehído 1% v/v, buffer MOPS 1X [MOPS 200 mM, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7,0]). Previo a su siembra en el gel, se agregó a cada muestra 15,5 μL de buffer MOPS 1X, formamida 50% v/v, formaldehído 20% v/v y bromuro de etidio 0,3 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, y se desnaturizó durante 10 min a 65 °C. A cada muestra se le agregó 3,5 μL de buffer muestra para ARN 6X (glicerol 50% p/v, EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0,4% p/v, xilencianol 0,4% p/v). Finalmente, las muestras se sembraron y corrieron en el gel de agarosa desnaturizante a un voltaje constante de 70 V usando como buffer MOPS 1X. La integridad del ARN se determinó visualmente usando un transiluminador evaluando la integridad de las bandas correspondientes al ARNr.

3.1.4. Purificación del ARN

Los extractos de ARN se trataron con RQ1 DNAsa (1 U μL^{-1}) para eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico. Se armaron las siguientes mezclas de reacción para cada muestra de ARN total a purificar:

- Buffer DNAsa 10X: 2,5 μL
- RQ1 DNAsa: 1 μL de solución de enzima cada 1 μg de ARN
- ARN: 4-6 μg
- H₂O DEPC c.s.p.: 25 μL

Armadas las mezclas de reacción, se las incubó a 37 °C durante 30 min. Luego se llevó la mezcla a un volumen de 100 μL con H₂O DEPC y se realizó una extracción agregando 100 μL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Las mezclas se homogeneizaron en vórtex y luego se centrifugaron a 11.000 x g durante 10 min a 4 °C. Se separó la fase acuosa y se precipitó el ARN purificado agregando 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 0,2 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 5,2, e incubando durante 60 min a -20 °C. El material precipitado se separó por centrifugación a 17.000 x g por 45 min a 4 °C, se lavó con 200 μL de etanol 70% (v/v) y se volvió a centrifugar a 17.000 x g durante 10 min a 4 °C. Luego de eliminar los residuos de etanol por desecado al vacío, el ARN purificado se disolvió en 15 μL de H₂O mQ tratada con DEPC.

Se constató la ausencia de contaminación de ADN genómico en el ARN purificado por medio de PCR con cebadores específicos. La ausencia de producto de amplificación dio cuenta de la ausencia de ADN genómico. El ARN purificado se utilizó como molde en la transcripción reversa para generar el ADN complementario (ADNc).

3.1.5. RT-PCR

Se obtuvo ADN complementario (ADNc) de los distintos extractos de ARN por medio de una reacción de transcripción reversa utilizando la enzima M-MLV (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega, 200 U μL^{-1}). Se mezclaron 2 μg de ARN purificado con 0,3 μmoles de hexámeros generados al azar (Random primers, Biodynamics). La mezcla se incubó primero a 70 °C durante 10 min, luego 5 min en hielo y finalmente 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 0,1 μmoles de dNTPs, 5 μL de buffer de reacción M-MLV 5X, 1 μL de enzima M-MLV y la cantidad necesario de H₂O para alcanzar un volumen final de 25 μL . Luego, la mezcla de reacción se incubó a 37 °C por 90 min para generar el ADNc y a 95 °C por 5 min para inactivar

la enzima M-MLV. El ADNc generado se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

El ADNc obtenido a partir del ARN extraído con el método del borato caliente se usó como molde para el chequeo de la transformación de las plantas. El ADNc obtenido a partir de ARN extraído con el método del CTAB modificado se usó como molde para el análisis de expresión de genes.

3.1.6. Caracterización de frutos sobreexpresantes de *F. vesca*

3.1.6.1. Peso de los frutos

Se registró el peso de los frutos luego de la cosecha. Se registró el peso de 15 frutos por evento de transformación, para cada estadio de madurez fisiológica.

3.1.6.2. Firmeza del fruto

La firmeza de los frutos se evaluó utilizando un Texturómetro TX.TAplus, Stable Micro System Texture Technologies®, Scarsdale, NY, equipado con una sonda Perspex cilíndrica de 25 mm de diámetro (código: P/25P) y una celda de carga de 30 kg (PL/CEL/30). Se realizó un ensayo de compresión, midiéndose la fuerza máxima en gr necesaria para generar una deformación del fruto de 0,5 mm. Se usaron las siguientes condiciones para la medida: modo del ensayo: compresión; velocidad pre-ensayo: 0,25 mm s⁻¹; velocidad durante el ensayo: 0,25 mm s⁻¹; velocidad post-test: 10 mm s⁻¹; objetivo a cumplir: distancia de 0,5 mm. Los datos de fuerza en función de la distancia comprimida se adquirieron con el programa "Exponent Lite Analysis" provisto por el equipo, a razón de 200 datos por segundo. Se midió la firmeza de 10 frutos de cada evento de transformación por estadio de madurez fisiológica.

3.1.6.3. Contenido de azúcares solubles en alcohol

Se hicieron extractos etanólicos de frutos de *F. vesca* cv H4, tanto tipo salvaje como de cuatro eventos transgénicos (CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5), en tres estadios de madurez (E3, E4 y E5). para ser utilizados en la determinación de azúcares totales. Frutos congelados se molieron en nitrógeno líquido, luego 1 g del polvo resultante se

resuspendió en 6 mL de etanol absoluto. La mezcla se homogeneizó, se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C y se diluyó 1 mL del sobrenadante a 5 mL finales con agua destilada.

El contenido de azúcares totales se determinó por el método de antrona. Se mezcló 0,1 mL del extracto etanólico diluido con 1 mL de una solución de antrona (2 g L⁻¹) disuelta en H₂SO₄ 66% (v/v). Las mezclas se incubaron a 100 °C por 12 min, se las enfrió en baño de agua en oscuridad por 20 min y finalmente se determinó el contenido de azúcares totales espectrofotométricamente a 625 nm. Se usó glucosa como patrón de referencia.

Las medidas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como g de glucosa por kg de fruto.

3.1.6.4. Aislamiento de polisacáridos de la pared celular

Se analizó el contenido de pared celular en frutos de *F. vesca* cv H4 tipo salvaje y de cuatro eventos transgénicos (CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5), en cuatro estadios de madurez (E2, E3, E4 y E5). Los polisacáridos totales de pared celular se obtuvieron como residuo insoluble en alcohol (RIA) de acuerdo con d'Amour y col., (1993), con algunas modificaciones. Aproximadamente 1 g de frutos congelados se homogeneizaron con 4 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se hirvió con reflujo durante 30 min; el homogenato se centrifugó a 10.000 x g por 30 min, descartándose luego el sobrenadante. El residuo sólido se lavó tres veces con 5 ml de etanol absoluto, repitiéndose el paso de centrifugación en cada ocasión. Finalmente, el residuo se secó a 37 °C hasta la obtención de peso constante. Los resultados se expresaron como mg de RIA cada 100 mg de tejido.

3.1.6.5. Medida de actividad expansina total

Se midió la actividad expansina en frutos de *F. vesca* cv H4 tipo salvaje y de 4 eventos de transformación (CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5) en tres estadios de madurez (E3, E4 y E5). Los extractos proteicos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la

sección 2.1.2.2 y la determinación de la actividad expansina de acuerdo a lo descrito en la sección 2.1.3.3.

3.1.6.6. Medida de actividad poligalacturonasa (PG)

Se midió la actividad PG en frutos de *F. vesca* cv H4 tipo salvaje y de 3 eventos de transformación (CBM3, CBM4 y CBM5) en tres estadios de madurez (E3, E4 y E5). La metodología utilizada para la estimación de la actividad se adaptó de Nogata y col., (1993). Se pesó 1 g de frutos congelados y se le agregó 3 mL de buffer acetato de sodio/ácido acético 0,05 M, PVPP 1% p/v (pH 6,0). La mezcla se homogeneizó y luego se centrifugó a 12.000 x g durante 30 min. Se descartó el sobrenadante. El residuo sólido se lavó con 3 mL de acetato de sodio/ácido acético 0,05 M (pH 6,0) y luego se centrifugó a 12.000 x g durante 30 min. Se descartó el sobrenadante y se repitió el paso de lavado una vez más. El residuo sólido resultante del segundo lavado se extrajo con 3 mL de acetato de sodio/ácido acético 0,05 M (pH 6,0), NaCl 1 M con agitación a 4 °C durante 2 h. Se centrifugó a 12.000 x g durante 30 min y se dializó el sobrenadante durante 16 h contra 20 volúmenes de buffer acetato de sodio/ácido acético 0,05 M, pH 6,0, a fines de eliminar el NaCl. El extracto dializado se utilizó para la determinación de la actividad poligalacturonasa total (tanto endo- como exo-). Se preparó una mezcla de reacción conteniendo 350 µL de ácido poligalacturónico (0,3% p/v) disuelto en buffer acetato de sodio/ácido acético 0,05 M (pH 6,0), 350 µL de buffer acetato de sodio/ácido acético 0,05 M (pH 6,0) y 700 µL de extracto. La cinética se llevó a cabo a 37 °C, se tomaron alícuotas a las 0, 6, 12 y 24 h y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido para interrumpir la reacción.

El contenido de ácido galacturónico liberado se determinó siguiendo el protocolo descrito en Diaz y col., (2007); 100 µL de reactivo de cobre (NaCl 23,3% p/v, acetato de sodio 5,4% p/v, CuSO₄*5H₂O 0,5% p/v, pH 4,8) se añadieron a 100 µL de cada muestra a hidrolizar. Se incubaron las muestras a 100 °C durante 15 min previo al agregado de 0,8 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido (dilución en agua destilada

1:40), y luego se midió la absorbancia a 750 nm. Se realizó una curva de calibración utilizando cantidades variables de ácido galacturónico 1 mM (Fluka). La actividad PG se expresó como nmol de ácido galacturónico liberado por min y por kg de fruto.

3.1.6.7. Análisis de expresión de genes por RT-qPCR

Se buscaron en la base de datos GenBank del sitio web NCBI las siguientes secuencias nucleotídicas de siete genes reportados de *Fragaria x ananassa* involucrados en el metabolismo de la pared celular: *Fragaria x ananassa* expansina 1 (*FaExp1*; AF163812.2); *Fragaria x ananassa* expansina 2 (*FaExp2*; AF159563); *Fragaria x ananassa* expansina 4 (*FaExp4*; DQ183068); *Fragaria x ananassa* expansina 5 (*FaExp5*; AF226702); *Fragaria x ananassa* expansina 6 (*FaExp6*; AF226703); *Fragaria x ananassa* poligalacturonasa 1 (*FaPG1*; DQ458990.1) *Fragaria x ananassa* pectinesterasa 1 (*FaPE1*; AY324809.1). Asimismo, se buscó la secuencia del gen de *Fragaria x ananassa* codificante para la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*FaGAPDH1*; AB363963), a ser usado como gen de referencia. En función de dichas secuencias se buscaron los genes ortólogos en el genoma de *Fragaria vesca* y se usaron sus secuencias en el diseño de cebadores específicos para qPCR utilizando el software Primer3.

Se pusieron a punto las concentraciones de cada juego de cebadores para obtener eficiencias de amplificación cercanas al 100% y se realizó una cuantificación relativa de la expresión de los siete genes a nivel de ARN mensajero, mediante reacciones de amplificación en cadena por la ADN polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). Las mismas se llevaron a cabo utilizando un equipo StepOne Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando SYBR Green I como método de detección. Se siguieron las especificaciones del kit FastStart Universal SYBR Green Master Mix (Roche) para reacciones con un volumen final de 10 µL.

Se usó el siguiente programa de ciclado: 95 °C durante 10 min; 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min, con un paso de medición de fluorescencia al final

de cada ciclo de 15 s. Al final al programa de ciclado se le agregó la obtención de una curva de disociación para cada reacción, de modo tal de detectar posibles contaminaciones.

El análisis se llevó a cabo utilizando muestras de ADNc de frutos tipo salvaje y de cuatro eventos de transformación (CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5) en cuatro estadios de madurez (E2, E3, E4 y E5). Se incluyeron 3 réplicas biológicas de cada condición analizada. La cuantificación relativa se realizó utilizando a una de las réplicas biológicas de frutos tipo salvaje en estadio dos (E2) de maduración como normalizador. Como gen de referencia se utilizó el gen GAPDH1 de *Fragaria vesca*.

3.1.6.8. Análisis secuencial de las proteínas ortólogas predichas en F. vesca

Teniendo presente la condición de “predicho” para los genes encontrados en el genoma de *F. vesca*, se decidió realizar un análisis de las secuencias proteicas predichas de modo tal de confirmar que las proteínas putativas presentan las arquitecturas típicas de las proteínas en estudio. Se utilizó la base de datos ProSite [<http://prosite.expasy.org/>; (Sigrist y col., 2013)] para identificar y delimitar los dominios conservados de las proteínas. Asimismo, se hizo un alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de todas las expansinas de *F. vesca* correspondientes a los genes analizados por RT-qPCR, incluyendo también la secuencia de la proteína FaEXP2, a modo de referencia. Se calcularon las matrices de identidad tanto para las proteínas completas como para cada dominio identificado por separado. Todo el análisis se llevó a cabo empleando el programa en línea Clustal Omega (Sievers et al., 2011) y los alineamientos múltiples se construyeron y editaron con el programa JalView 2 (Waterhouse et al., 2009).

3.2. Resultados

3.2.1. Análisis de las líneas transgénicas y verificación de la expresión del gen *CBM-FaEXP2*

El trabajo se inició a partir de plantas de *Fragaria vesca* preexistentes, transformadas para sobreexpresar el módulo de unión a carbohidratos de la Expansina 2 de *Fragaria x ananassa* (CBM-FaEXP2).

Se describe brevemente la generación de estas plantas, realizada previamente por la Dra. Cristina Nardi y el Dr. Hernán Rosli

Se usó la base de datos de dominios conservados del sitio prosite en la búsqueda y reconocimiento de dominios putativos en la secuencia proteica de la expansina 2 de *Fragaria x ananassa* (FaEXP2). Se encontró que la proteína presenta la arquitectura típica de las expansinas, la cual consiste en un péptido tránsito en el extremo N-terminal, seguido por dominio similar al de las glicosil hidrolasas (EG45, Fig. 3.2.1) y un CBM putativo en el extremo C-terminal de la proteína (Fig. 3.2.1).

Siguiendo la estrategia de clonado mencionado en la sección 3.1.1. se consiguió fusionar el CBM presente en el extremo C-terminal de la proteína FaEXP2 a la secuencia que codifica para el péptido tránsito que dirige la expresión de la proteína nativa a la pared celular, eliminando de ese modo el dominio que presenta similitud con las glicosil hidrolasas (EG45, Fig. 3.2.1).

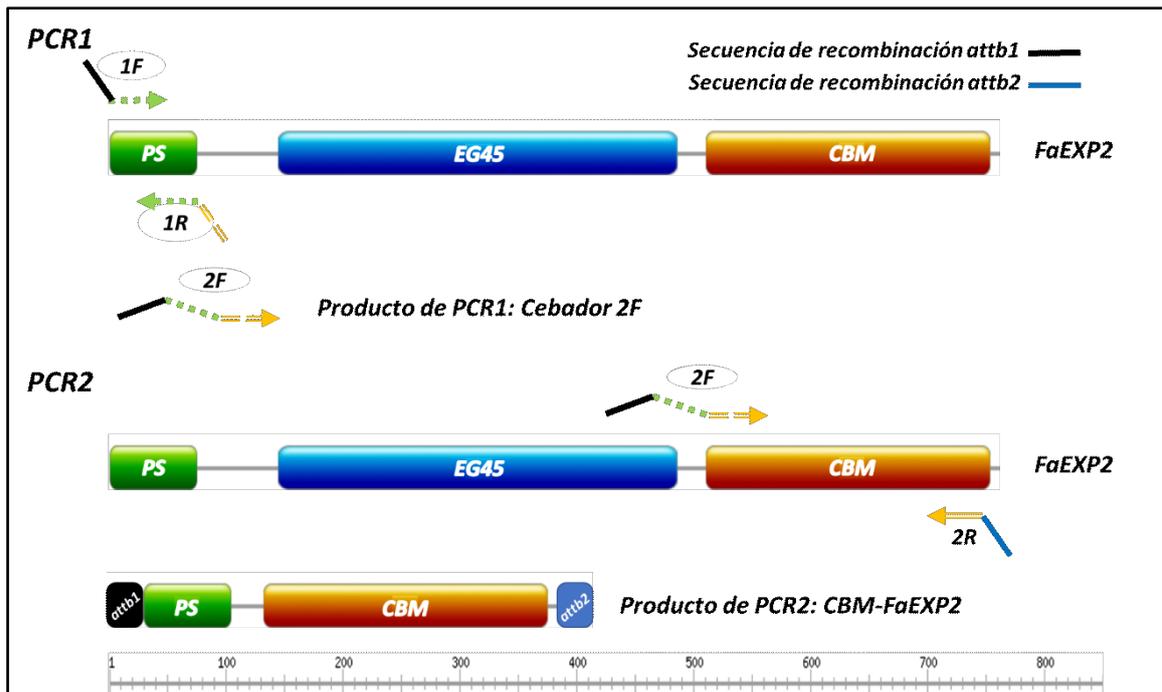


Fig. 3.2.1. Esquema de la estrategia de clonado utilizada. Se muestran las dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR1 y PCR2) utilizadas en la generación de la construcción destinada a la sobreexpresión de la proteína CBM-FaEXP2 en la pared celular de *F. vesca* (ver sección 3.1.1). Se detallan los dominios identificados sobre la secuencia nucleotídica del gen *FaExp2*. PS: péptido tránsito; EG45: dominio similar al de las glicosil hidrolasas; CBM: módulo de unión a carbohidratos; regla: escala en pares de bases. Las flechas indican las regiones de anillado de los cebadores utilizados. Para ambas reacciones se muestran esquemas de los productos de amplificación.

Luego, se introdujo el constructo descrito en *A. tumefaciens* GV3101, a fin de transformar *F. vesca* (3.1.1.2). Luego de pasar por la etapa de regeneración de los explantos de hoja de *F. vesca* cv H4 transformados con el constructo de interés, se recuperaron 7 eventos de transformación independientes, rotulados en forma arbitraria como CBM1 a CBM7.

A partir de este material inicial, se verificó la expresión tanto del transgen de interés (*CBM-FaExp2*) como del gen codificante para el marcador de selección de resistencia a *kanamicina*, por medio de RT-PCR a tiempo final, usándose cebadores específicos para cada gen y ARN extraído de frutos en estadio 3 como molde. Como control de la estabilidad del ADNc se usó el gen de una *endoxilanas* y cebadores específicos, probados en ensayos previos del grupo de investigación. Como control negativo de

transformación se utilizó material proveniente de una línea de *F. vesca* cv H4 sin transformar (WT).

Todas las muestras evaluadas dieron resultado positivo a la amplificación del control endógeno de endoxylanasa, sin embargo, sólo los eventos de transformación dieron resultado positivo a la amplificación tanto del transgen como del gen de resistencia al antibiótico kanamicina (Fig. 3.2.2. a 3.2.4). La evidencia indica que luego de la regeneración de los callos transformados se recuperaron 7 eventos transformados de forma independiente.

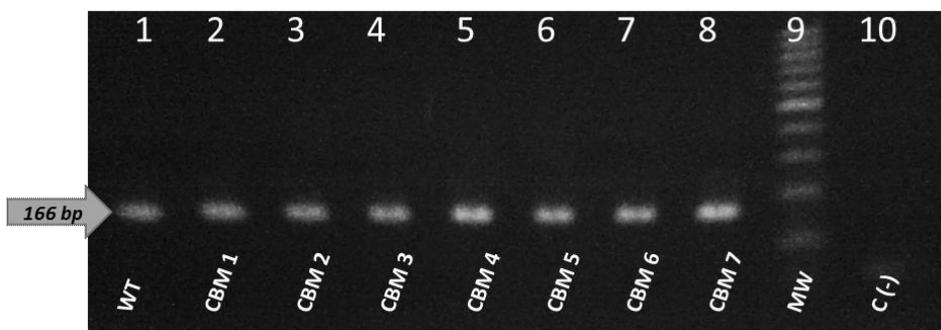


Fig. 3.2.2. Amplificación por RT-PCR de un fragmento de 166 pb del gen de endoxylanasa. WT: evento sin transformar; CBM1 a CBM7 eventos transformados; C (-) control de PCR sin molde.

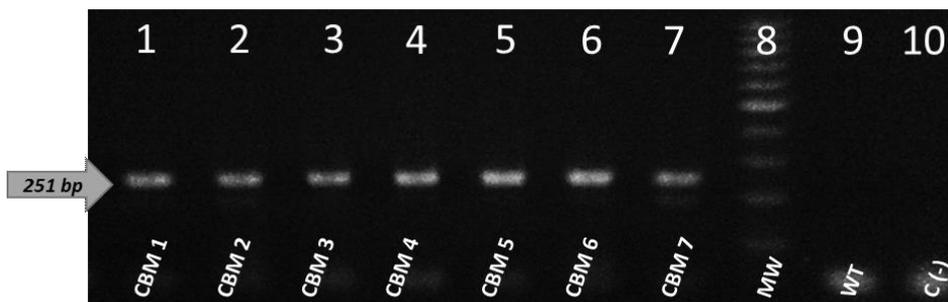


Fig. 3.2.3. Amplificación por RT-PCR de un fragmento de 251 pb del gen de resistencia a kanamicina. WT: evento sin transformar; CBM1 a CBM7 eventos transformados; C (-) control de PCR sin molde.

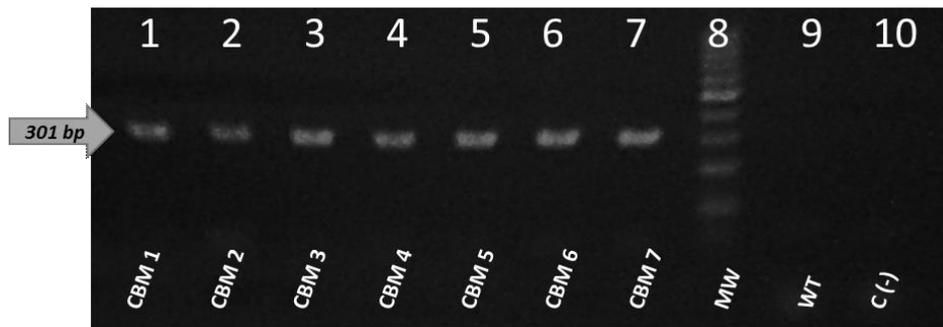


Fig. 3.2.4. Amplificación por RT-PCR de un fragmento de 301 pb del transgen CBM-FaEXP2. WT: evento sin transformar; CBM1 a CBM7 eventos transformados; C (-) control de PCR sin molde.

3.2.2. Extracción de ARN total

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis se usaron dos métodos de extracción de ARN total, uno de ellos fue el método del borato caliente (Wan y Wilkins, 1994), conocido por su robustez y alta calidad del producto final, y el otro fue el método del CTAB modificado (Amaya y col, 2016), probado exitosamente en frutilla. Con el primer método se hicieron las extracciones de ARN total para poder realizar los chequeos de los distintos eventos de transformación, obteniéndose material en buena cantidad y de muy buena calidad (Fig. 3.2.5 y Tabla 3.2.1). El inconveniente con el método del borato caliente fue la cantidad de tejido inicial (2 g), prohibitivo para hacer extracciones necesarias para llevar a cabo el análisis de expresión de genes tal como se lo describió en la sección 3.1.7.7, dada la cantidad de frutos necesarios. Por ello se probó y decidió hacer uso del protocolo del CTAB modificado en el cual se puede partir de 0,2 g de tejido, y completar la extracción de ARN en un día de trabajo. Los resultados obtenidos con este método fueron muy buenos, se obtuvo ARN de muy buena calidad y en una cantidad excelente (Fig. 3.2.5 y Tabla 3.2.1). Teniendo presente la cantidad de tejido inicial para ambos protocolos, el método del CTAB modificado resultó ser mucho más eficiente. Se utilizó este método en la extracción del ARN total de los frutos para llevar a cabo el análisis de expresión de genes comparativo previsto.

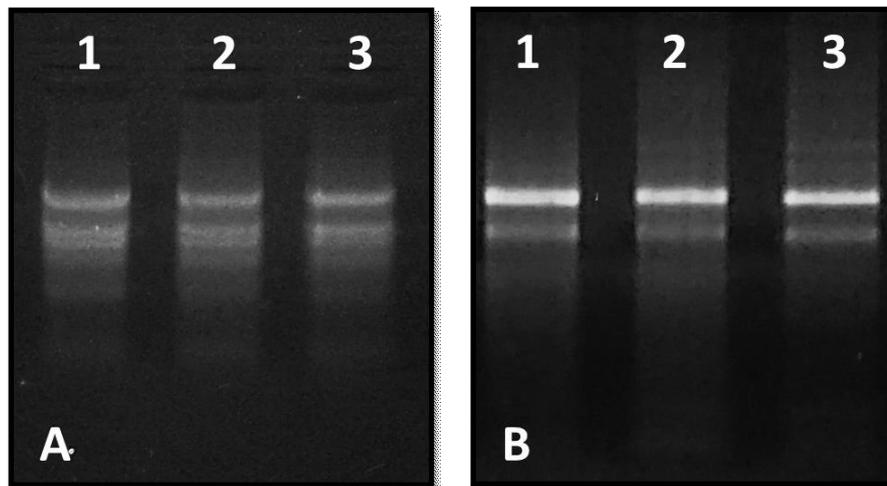


Fig. 3.2.5. Análisis de integridad de ARN. Se muestran ejemplos de muestras de ARN de frutos de *F. vesca* cv. H4 tipo salvaje en el estadio 3 de maduración. A) ARN obtenido con el método del borato caliente. B) ARN obtenido con el método del CTAB modificado.

Tabla 3.2.1. Comparación entre los dos métodos de extracción de ARN utilizados. Las muestras comparadas son las mismas que se muestran en los gels de la Fig. 3.2.5.

Calle	Método	$\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	260/280	($\mu\text{g Totales}$)	$\mu\text{g g}^{-1}$
A 1 (WT)	Borato Caliente	2,68	2,52	67	39
A 2 (WT)	Borato Caliente	2,31	2,58	57,7	37
A 2 (WT)	Borato Caliente	2,16	2,67	54,1	43
B 1 (WT)	CTAB Modificado	1,26	2,15	31,6	142
B 2 (WT)	CTAB Modificado	1,30	2,14	32,6	157
B 3 (WT)	CTAB Modificado	1,50	2,15	37,6	172

3.2.3. Caracterización de los frutos

3.2.3.1. Peso

Todos los frutos provenientes de eventos de transformación presentaron características fenotípicas similares a las de los frutos tipo salvaje (WT), en cuanto a tamaño, forma y color.

Al analizar el perfil del peso de los frutos tipo salvaje entre los estadios E2 a E5 (Fig. 3.2.6), si bien no se observan diferencias significativas en el peso de los frutos a lo largo del proceso de maduración, se ve una tendencia de aumento del peso del fruto del estadio dos (E2) al cuatro (E4), con una sucesiva disminución del peso hacia el estadio cinco (E5) (Fig. 3.2.6).

Al comparar el peso de frutos de los eventos transgénicos con el peso de los frutos tipo salvaje, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los estadios de madurez analizados (Fig. 3.2.7).

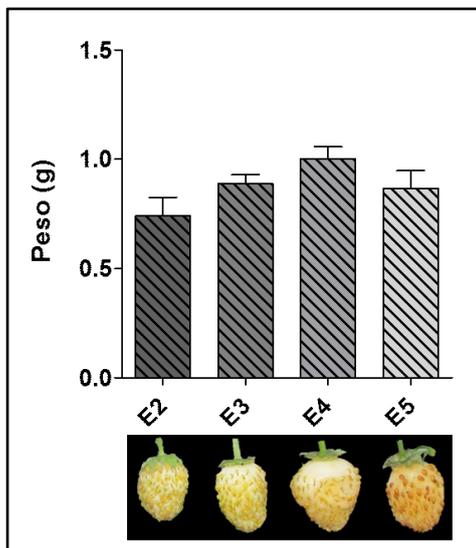


Fig. 3.2.6. Perfil del peso de frutos de *F. vesca* cv H4 tipo salvaje. Se muestran los pesos de los frutos en 4 estadios de madurez (E2, E3, E4 y E5). Los resultados se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon por medio de un test de Tukey ($p < 0,05$).

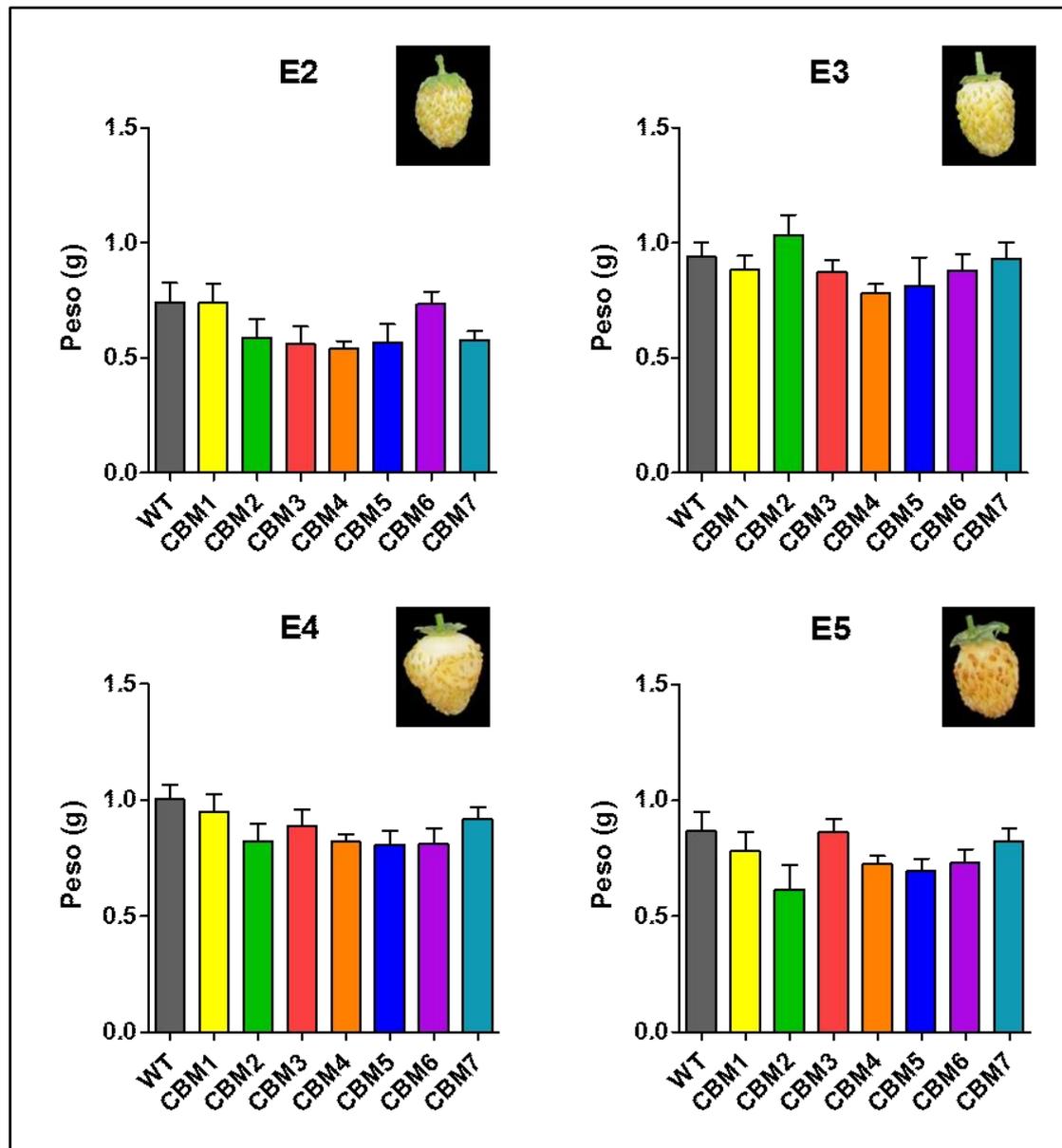


Fig. 3.2.7. Peso de frutos en distintos estadios de madurez fisiológica en planta. WT: frutos tipo salvaje; CBM1 a CBM7 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. Los resultados se analizaron mediante ANOVA en cada estadio de madurez. Las medias de los eventos transformados se compararon contra la media de frutos tipo salvaje mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$).

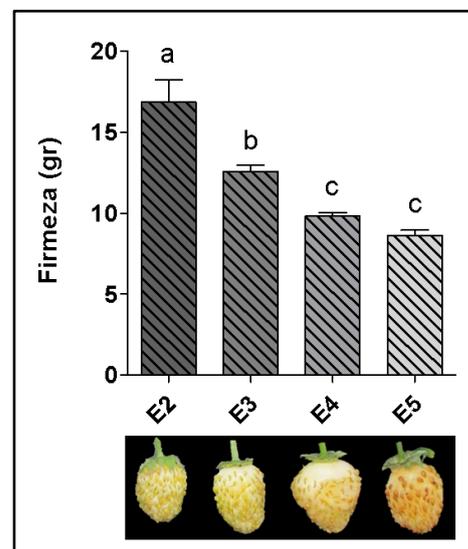
3.2.3.2. Firmeza

Como primera instancia se analizó el perfil de firmeza en frutos de *F. vesca* cv H4 tipo salvaje entre los estadios dos (E2) y cinco (E5). El cultivar se caracterizó por presentar frutos blandos. Comparados con frutos de *Fragaria x ananassa* la firmeza medida en *F. vesca* se encuentra casi un orden de magnitud por debajo de los valores

esperados para la variedad comercial. Asimismo, al igual que en la variedad comercial, se observó una disminución progresiva en la firmeza con el avance de la maduración (Fig. 3.2.8), siendo la disminución entre los estadios dos (E2) y tres (E3) la de mayor relevancia. No se observó diferencia estadística en los valores de firmeza media entre los estadios cuatro (E4) y cinco (E5) (Fig. 3.2.8).

En lo que respecta a los eventos transformados, no se observaron diferencias significativas en la firmeza de los frutos transgénicos comparados con los frutos tipo salvaje en los estadios 2 y 5, pero sí se encontraron diferencias significativas en los estadios 3 y 4 (Fig. 3.2.9). Para el estadio 3 (E3) se observa que los eventos CBM1, CBM 3, CBM 4, CBM5, CBM6 y CBM7 presentan una firmeza mayor a la de los frutos tipo salvaje (Fig. 3.2.9). Para el caso del estadio 4 la diferencia se mantiene para los eventos CBM1, CBM3, CBM4 y CBM7, pero deja de observarse en los eventos CBM5 y CBM6 (Fig. 3.2.9).

Fig. 3.2.8. Perfil de la firmeza de frutos tipo salvaje de *F. vesca* cv H4. Se muestra la firmeza (gr) de frutos en 4 estadios de madurez en planta (E2, E3, E4 y E5). Los resultados se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon por medio de un test de Tukey ($p < 0,05$). Letras distintas indican diferencias significativas.



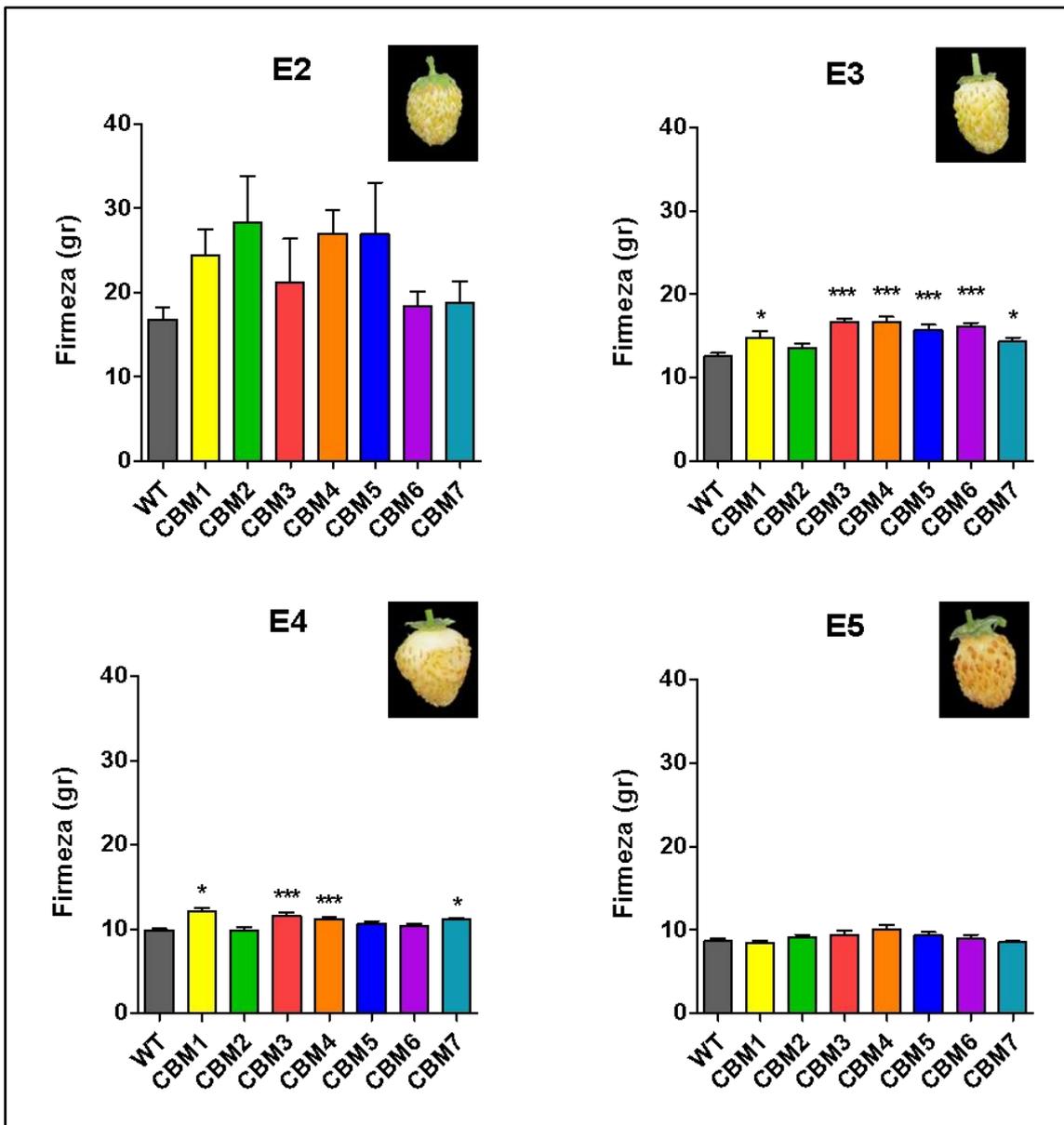


Fig. 3.2.9. Firmeza de frutos en distintos estadios de madurez fisiológica en planta. WT: frutos tipo salvaje; CBM1 a CBM7 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. Los resultados se analizaron mediante ANOVA por estadio de madurez. Las medias de los eventos transformados se compararon contra la media de frutos tipo salvaje mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$). Los asteriscos (*) indican diferencia estadística con el tipo salvaje.

3.2.3.3. Aislamiento de polisacáridos de la pared celular

Se aislaron los componentes de la pared celular vegetal de frutos como residuos insolubles en alcohol (RIA). En el análisis se incluyeron frutos tipo salvaje y frutos de cuatro eventos transformados (CBM2, CBM3, CBM4, CBM5) en cuatro estadios de madurez (E2, E3, E4 y E5). Se estudió el perfil de RIA en la maduración para cada evento (Fig. 3.2.10), y también se comparó el contenido de RIA de los distintos eventos

transformados con el propio de los frutos tipo salvaje en cada uno de los estadios de madurez analizados (Fig. 3.2.11).

No se observaron diferencias en los perfiles de RIA de los distintos eventos analizados (Fig. 3.2.10). Hay una caída pronunciada en el contenido de RIA entre los estadios E2 y E3, para luego mantenerse hasta el final de la maduración, a excepción del evento CBM5, donde también se verifica un descenso en el contenido de RIA entre E3 y E4. Para la mayoría de los eventos, no se observan diferencias significativas en el contenido de RIA correspondiente a los tres últimos estadios de madurez (E3, E4 y E5). Sin embargo, se repite un patrón de disminución entre los estadios E3 y E4 y, un leve aumento entre E4 y E5.

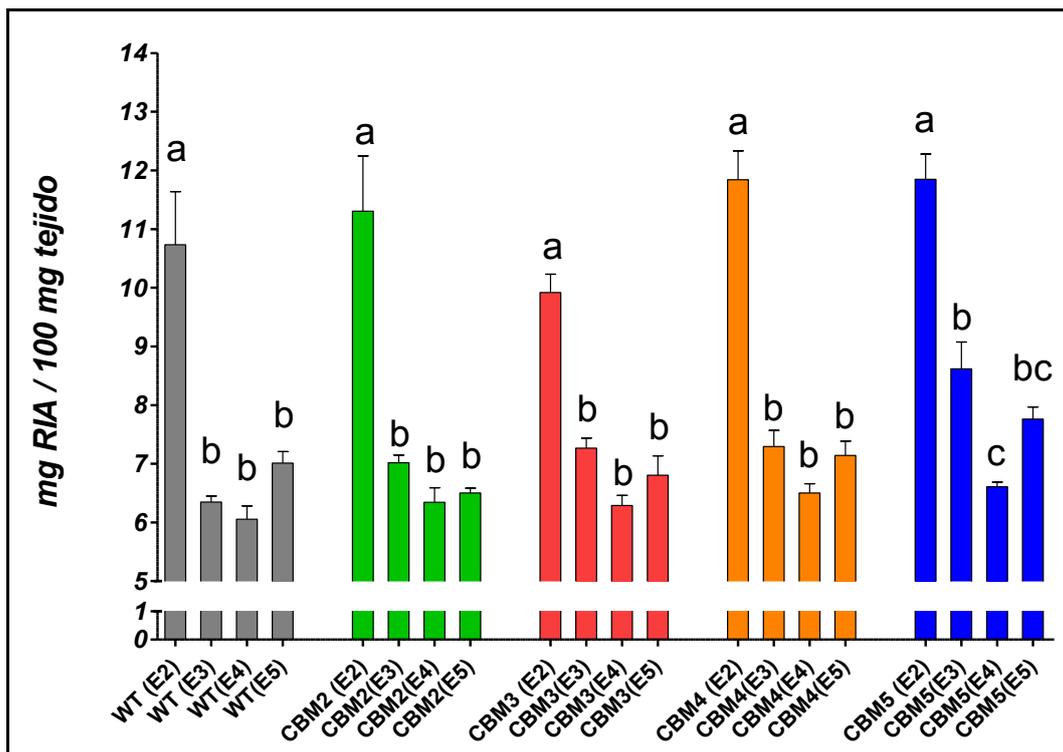


Fig. 3.2.10. Perfil de contenido de pared celular expresado como RIA de frutos de *F. vesca* cv H4. WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5: frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de maduración. Los resultados para cada evento se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante un test de Tukey ($p < 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre estadios del WT o de cada evento.

En lo que respecta a la comparación del contenido de RIA de los eventos transgénicos con el tipo salvaje, sólo se observaron diferencias significativas en dicho contenido en frutos del evento CBM5 en el estadio tres (E3) de maduración (Fig. 3.2.11). Si bien no se observaron diferencias significativas en el contenido de RIA en los estadios dos, cuatro y cinco entre ninguno de los eventos transformados y tipo salvaje, cabe destacar que en los estadios dos, tres y cuatro (E2, E3 y E4) existe una tendencia a un mayor contenido RIA para los eventos transformados (Fig. 3.2.11).

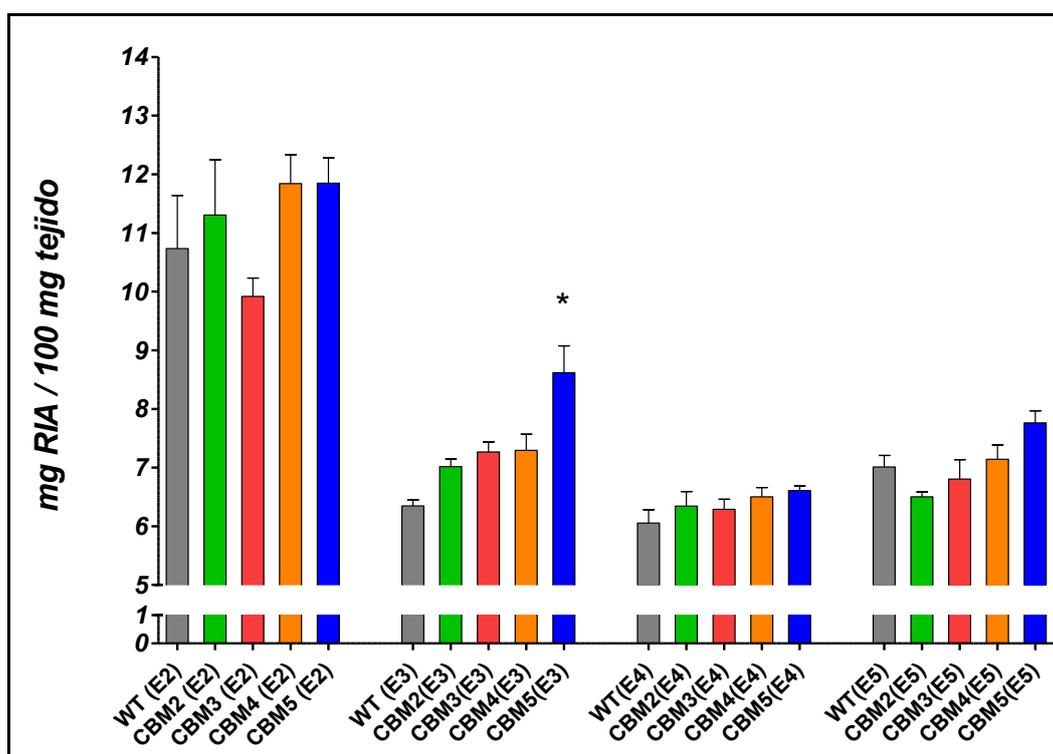


Fig. 3.2.11. Residuos insolubles en alcohol de frutos en distintos estadios en planta. WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5: frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de maduración. Los resultados se analizaron mediante ANOVA por estadio de madurez. Las medias correspondientes a los frutos transformados se compararon contra la media de los frutos tipo salvaje mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$). Los asteriscos (*) indican diferencia estadística con respecto al WT.

3.2.3.4. Azúcares totales solubles en alcohol

Se analizó el contenido de azúcares totales en frutos tipo salvaje y en frutos de cuatro eventos transformados (CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5) en tres estadios de madurez (E3, E4 y E5). Al igual que para el caso del análisis del contenido de pared como RIA, se estudió tanto el perfil de cada evento en los distintos estadios de madurez,

como una comparación del contenido de azúcares totales de los frutos transgénicos con frutos tipos salvaje en cada estadio de madurez. En lo que respecta a los perfiles, no se observó un único comportamiento (Fig. 3.2.12). Para el caso de los frutos tipo salvaje se observó una disminución en el contenido de los azúcares totales disueltos en alcohol del estadio tres (E3) al estadio cinco (E5), mientras que no se observó un perfil definido para el caso de los eventos transgénicos (Fig. 3.2.12). CBM3 presentó un perfil similar al de los frutos tipo salvaje, mientras que en CBM2 y CBM4 no se observaron diferencias estadísticas en el contenido de azúcares totales en los tres estadios de maduración estudiados. En CBM5 se observaron diferencias significativas entre los estadios E4 y E5, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas entre ninguno de estos dos estadios y el estadio E3 (Fig. 3.2.12).

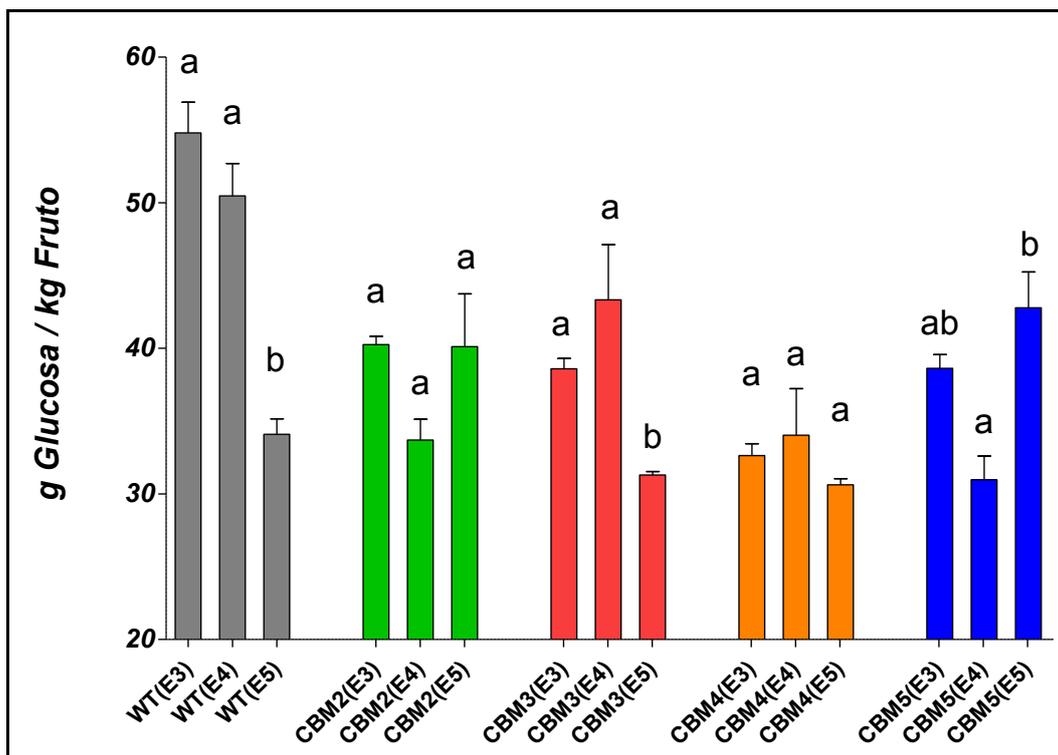


Fig. 3.2.12. Perfil de contenido de azúcares totales de frutos de *F. vesca* cv H4. WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E3, E4 y E5: estadios de madurez. Los resultados para cada evento se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante un test de Tukey ($p < 0,05$). Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa.

Al comparar el contenido de azúcares de los distintos eventos transgénicos con los frutos tipo salvaje en cada estadio, se observaron diferencias significativas en todos los casos, al menos en uno de los eventos transgénicos (Fig. 3.2.13). En el estadio tres (E3) todos los eventos transgénicos presentaron un menor contenido de azúcares totales que los frutos tipo salvaje (Fig. 3.2.13). En el estadio cuatro (E4), se observó la misma tendencia, a excepción del evento CBM3, que a pesar de tener una media menor a la de los frutos tipo salvaje, no presentó diferencia estadística con el control sin transformar (Fig. 3.2.13). En el estadio cinco (E5), sólo se observaron diferencias significativas en el evento CBM5, con un contenido de azúcares mayor al de los frutos tipo salvaje (Fig. 3.2.13).

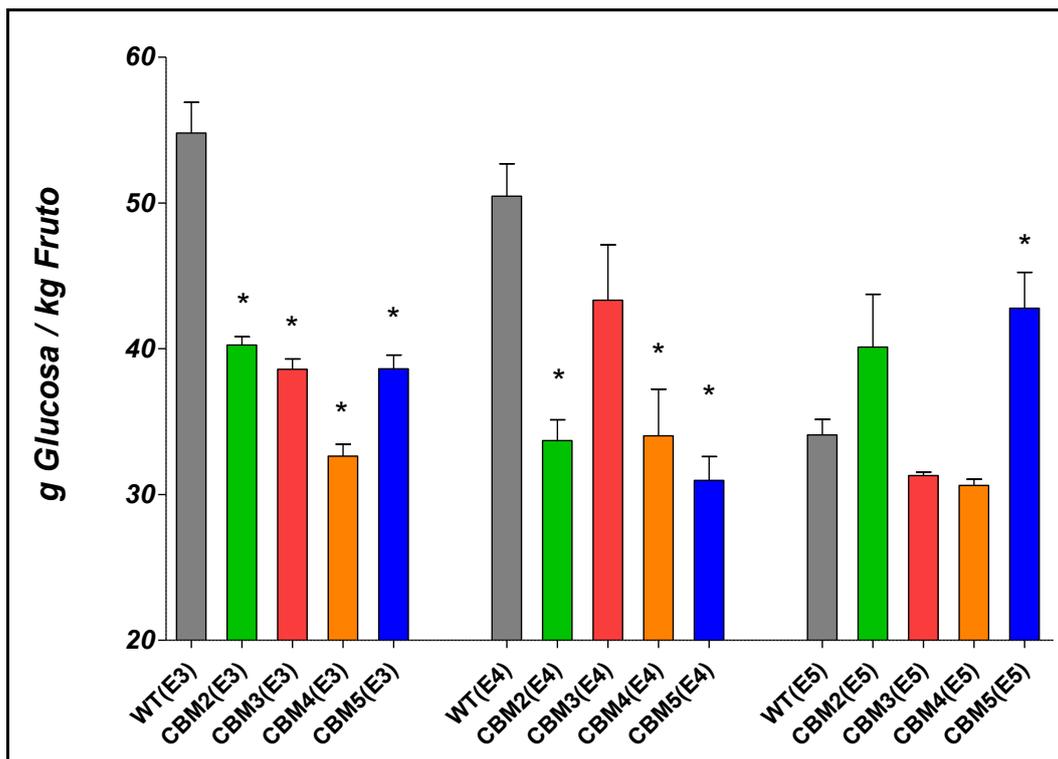


Fig. 3.2.13. Azúcares totales en tres estadios de madurez fisiológica en planta. WT: evento sin transformar; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 eventos transformados; E3, E4 y E5: estadios de madurez. Los resultados se analizaron mediante ANOVA por estadio de madurez. Las medias correspondientes a los eventos transformados se compararon contra la media de los frutos tipo salvaje mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con el tipo salvaje.

3.2.3.5. Genes ortólogos en *F. vesca* y puesta a punto de cebadores para RT-PCR

Se buscaron en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) las secuencias nucleotídicas de los siete genes involucrados en el metabolismo de la pared celular, mencionados en la sección 3.1.7.7. A excepción de los genes FaExp2, FaExp4 y FaPG1, las secuencias disponibles en la base de datos corresponden a secuencias parciales de los genes de interés. Se usaron dichas secuencias en la búsqueda de los genes ortólogos en el genoma de *F. vesca*. Se encontraron los siete genes de interés, sin embargo, los mismos están identificados en el genoma de *F. vesca* como genes predichos dada su homología secuencial con genes previamente caracterizados y, por lo tanto, sus nombres son diferentes a los de los genes conocidos en *Fragaria x ananassa* (Tabla 3.2.1), a pesar de que sus secuencias en la mayoría de los casos sean 100% idénticas. Interesantemente los genes ortólogos de FaEXP1 y FaEXP6 en *F. vesca* tienen el mismo nombre FvEXP6, a pesar de ser genes diferentes. Por tal motivo en el presente trabajo se las considera isoformas de la misma enzima, y se las nombró arbitrariamente como FvEXP6a al análogo de FaEXP1 y FvEXP6b al análogo de FaEXP6.

Se usaron las secuencias de los genes ortólogos encontrados en el diseño de cebadores específicos para PCR en tiempo real. Las concentraciones de los cebadores diseñados se ajustaron para obtener eficiencias de amplificación cercanas al 100% (Tabla 3.2.2).

Tabla 3.2.1. Genes analizados. Se muestra la notación de los genes caracterizados previamente en *Fragaria x ananassa* y la propia de los ortólogos predichos en *F. vesca*. Para cada secuencia se indica su número de referencia, GenBank para el caso de *Fragaria x ananassa* y NCBI para el caso de *F. vesca*.

<i>Fragaria x ananassa</i> (<i>Fxa</i>)	GeneBank <i>Fxa</i>	Gen ortólogo en <i>F. vesca</i>	Referencia NCBI <i>F. vesca</i>
<i>FaExp1</i> expansina 1	AF163812.2	<i>FvExp6a</i> expansin-A6, isoforma a	XM_004302701.2
<i>FaExp2</i> expansina 2	AF159563	<i>FvExp10</i> expansina-A10	XM_004307684.2
<i>FaExp4</i> expansina 4	DQ183068	<i>FvExp1</i> expansina-A1	XM_004297244.2
<i>FaExp5</i> expansina 5	AF226702	<i>FvExp1-like</i> expansina-A1-like	XM_004299299.2
<i>FaExp6</i> expansina 6	AF226703.1	<i>FvEXP6b</i> expansina-A6, isoforma b	XM_004300379.2
<i>FaPG1</i> poligalacturonasa 1	DQ458990.1	<i>FvPG-like</i> exo-poligalacturonasa-like	XM_004293396.2
<i>FaPE1</i> pectinesterasa 1	AY324809.1	<i>FvPPE8B-like</i> pectinesterasa/pectinesterasa inhibidor PPE8B-like	XM_004287634.2
<i>FaGAPDH1</i> gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 1	AB363963	<i>FvGAPC2</i> gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa GAPC2, citosolica	XM_004309993.2

Tabla 3.2.2. Nombres y secuencias de los cebadores usados en las reacciones de RT-qPCR. Para cada juego de cebadores se muestra la concentración de uso en las reacciones de PCR, así como el tamaño del producto de amplificación. Fw: cebador sentido; Rv: cebador antisentido.

Cebador	Gen	Secuencia (5' => 3')	Concentración (nM)	Amplicón (bp)
FaEXP1 qFw	FvExp6a	AAAGGGAATGAGAGGGTG	500	162
FaEXP1 qRv		ACTGGCTTACATAAACTTGAC		
FaEXP2 qFw	FvExp10	AAAGGGGAGGGGATCAGATTC	400	182
FaEXP2 qRv		CTTGTCGGTTGAGGTAGT		
FaEXP4 qFw	FvExp1	TCTTCTTGGTGGGTCTTC	300	147
FaEXP4 qRv		GGCTGTAGAGGTTTCCATA		
FaEXP5 qFw	FvExp1-like	AATACAGAGCTGGAATCGT	500	109
FaEXP5 qRv		ATTAGGACCAGGTTGAAGTAT		
FaEXP6 qFw	FvExp6b	AATCTTTACAGCCAGGGAT	500	142
FaEXP6 qRv		AAATCGAAGGACTTCCAGA		
FaPG1-qFw	FvPG1	AATGTGAGATTGACAGAGTG	200	72
FaPG1-qRv		GTGGAAATTTTTGCTGTTAAGTG		
FaPE1-qFw	FvPPE8B- like	CAAGTGCACCCAATTCTGA	500	123
FaPE1-qRv		CTGAGCTACCACAACGTCCA		
FaGAPDH1-qFw	FvGAPC2	TCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG	100	132
FaGAPDH1-qRv		AGCAGGCAGAACCTTTCCGACAG		

3.2.3.6. Identificación de dominios en los genes predichos en *F. vesca* analizados RT-qPCR

Se hizo un análisis de dominios conservados en las secuencias proteicas de los genes putativos de *F. vesca* analizados por pcr en tiempo real, de modo tal de confirmar la naturaleza de los genes en estudio. En todas las secuencias se encontraron los elementos característicos de cada proteína.

Para el caso de las expansinas, todas presentaron la arquitectura característica de estas proteínas, con un péptido tránsito en el extremo N-terminal (que dirige la expresión a la vía secretoria), seguido por un dominio similar al de las glicosil hidrolasas y por último un módulo de unión a carbohidratos en el extremo C-terminal. Para el caso de FvPG1 se encontró el sitio activo característico de las poligalacturonasas entre los residuos 242 y 255. También se identificó el sitio activo característico de las pectinesterasas en la secuencia proteica de FvPPE8B-like entre los residuos 343 y 352.

3.2.3.7. Análisis de Expansinas por alineamiento múltiple

Se compararon las secuencias proteicas de las expansinas estudiadas por PCR en tiempo real a través de alineamientos múltiples de secuencias (Fig. 3.2.14), se calcularon matrices con porcentajes de identidad tanto para las secuencias de las proteínas completas como para las secuencias correspondientes a los dos dominios identificados en estas proteínas (Tablas 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5 y 3.2.6). Al analizar las secuencias completas se observa un alto grado de conservación entre las expansinas estudiadas, siendo el rango de los porcentajes de identidad observados entre 67-100%. La secuencia de la proteína FaEXP2 de donde se extrajo el CBM para realizar el estudio del efecto de la sobreexpresión de un CBM sobre el fruto, presentó un alto grado de similitud con las expansinas propias de *F. vesca*, siendo el rango de porcentajes de identidad entre 68%-84%. Las secuencias correspondientes a FaEXP2 y su análogo FvEXP10 resultaron ser un 100% idénticas, la única diferencia observada es que la proteína de *F. vesca* tiene un residuo más en el extremo C-terminal.

El alto grado de conservación se mantiene en los dos dominios identificados, aunque la conservación del dominio catalítico (rango: 75%-90%) es un poco más alta que la observada en el CBM (rango: 66%-86%). La mayor divergencia se observó en el péptido tránsito, donde los porcentajes de identidad observados resultaron ser muy bajos en comparación al resto de las secuencias analizadas (rango de porcentajes de identidad: 13%-39%).

Tabla 3.2.3. Matriz de identidad para las secuencias completas de las expansinas estudiadas. Los valores se expresan como porcentaje (%) de identidad.

Proteínas completas						
	FvEXP6a	FvEXP6b	FvEXP10	FaExp2	FvEXP1	FvEXP1-like
FvEXP6a	100,00	82,56	70,24	70,12	68,00	69,88
FvEXP6b	82,56	100,00	68,77	68,65	67,33	69,20
FvEXP10	70,24	68,77	100,00	100,00	74,00	75,50
FaExp2	70,12	68,65	100,00	100,00	73,90	75,40
FvEXP1	68,00	67,33	74,00	73,90	100,00	83,94
FvEXP1-like	69,88	69,20	75,50	75,40	83,94	100,00

Tabla 3.2.4. Matriz de identidad para las secuencias correspondientes a los dominios catalíticos identificados en las expansinas estudiadas. Los valores se expresan como porcentaje (%) de identidad.

Dominios catalíticos						
	FvEXP6a	FvEXP6b	FvEXP10	FaExp2	FvEXP1	FvEXP1-like
FvEXP6a	100,00	89,57	80,53	80,53	75,22	82,30
FvEXP6b	89,57	100,00	77,88	77,88	75,22	81,42
FvEXP10	80,53	77,88	100,00	100,00	77,88	81,42
FaExp2	80,53	77,88	100,00	100,00	77,88	81,42
FvEXP1	75,22	75,22	77,88	77,88	100,00	89,38
FvEXP1-like	82,30	81,42	81,42	81,42	89,38	100,00

Tabla 3.2.5. Matriz de identidad para las secuencias correspondientes a los módulos de unión a carbohidrato identificados en las expansinas estudiadas. Los valores se expresan como porcentaje (%) de identidad.

Módulos de Unión a Carbohidratos						
	FvEXP6a	FvEXP6b	FvEXP10	FaExp2	FvEXP1	FvEXP1-like
FvEXP6a	100,00	82,50	72,50	72,50	71,25	66,25
FvEXP6b	82,50	100,00	70,00	70,00	71,25	68,75
FvEXP10	72,50	70,00	100,00	100,00	82,50	78,75
FaExp2	72,50	70,00	100,00	100,00	82,50	78,75
FvEXP1	71,25	71,25	82,50	82,50	100,00	86,25
FvEXP1-like	66,25	68,75	78,75	78,75	86,25	100,00

Tabla 3.2.5. Matriz de identidad para las secuencias correspondientes a los péptidos tránsito identificados en las expansinas estudiadas. Los valores se expresan como porcentaje (%) de identidad.

Péptidos Tránsito						
	FvEXP6a	FvEXP6b	FvEXP10	FaEXP2	FvEXP1	FvEXP1-like
FvEXP6a	100.00	33.33	29.41	29.41	20.00	33.33
FvEXP6b	33.33	100.00	38.89	38.89	22.22	21.05
FvEXP10	29.41	38.89	100.00	100.00	14.29	13.33
FaEXP2	29.41	38.89	100.00	100.00	14.29	13.33
FvEXP1	20.00	22.22	14.29	14.29	100.00	35.00
FvEXP1-like	33.33	21.05	13.33	13.33	35.00	100.00

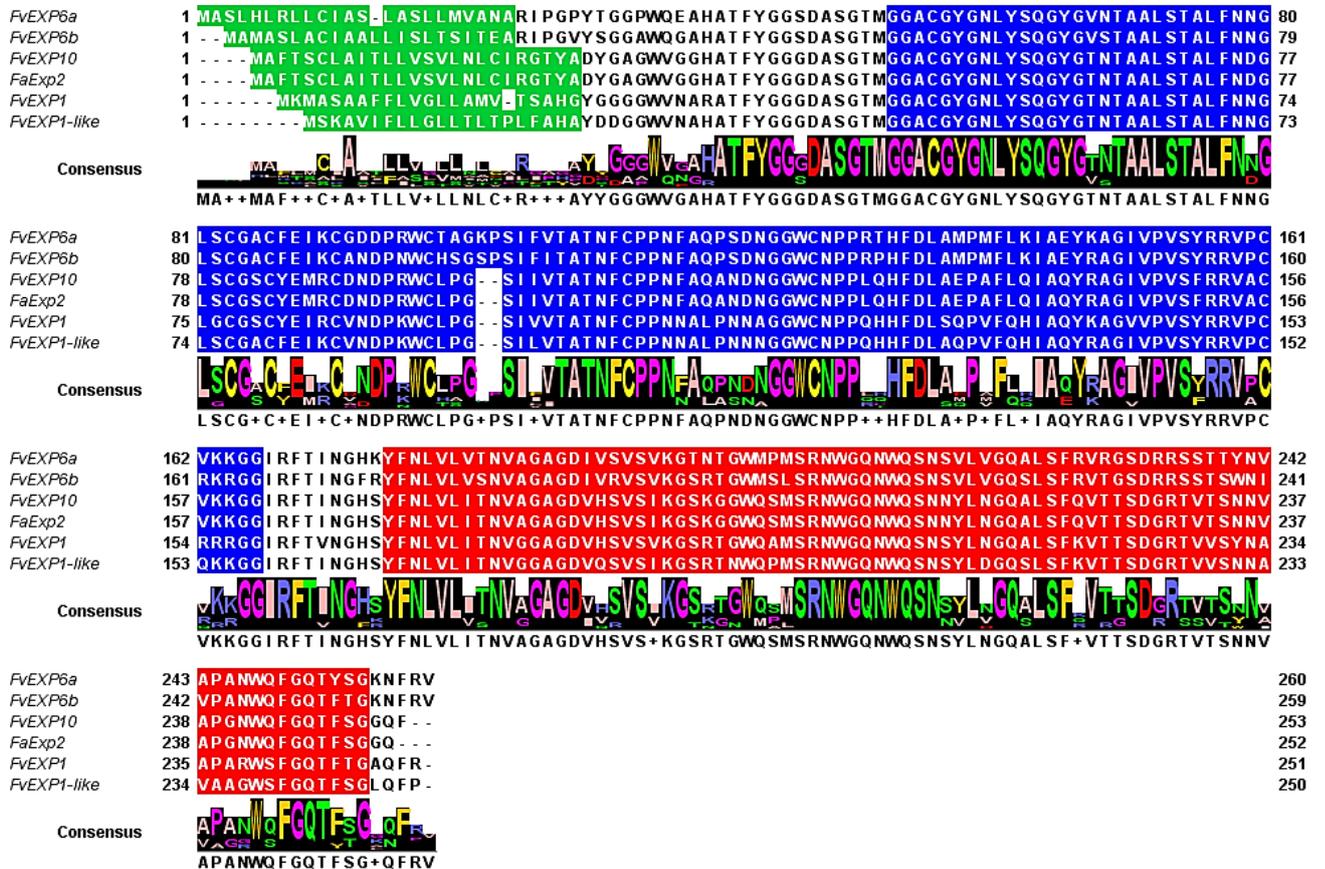


Fig. 3.2.14. Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de seis expansinas: FvEXP6a, FvEXP6b, FvEXP10, FaEXP2, FvEXP1 y FvEXP1-like. En verde se indican las secuencias correspondientes a los péptidos tránsito; en azul a los dominios símil glicosil hidrolasas; en rojo a los módulos de unión a carbohidrato.

3.2.3.8. Expresión relativa

Se realizó un análisis comparativo de la expresión de siete genes involucrados en el metabolismo de la pared celular (ver sección 3.1.7.8), contrastando los niveles de expresión relativos de ARNm de dichos genes en frutos de eventos transgénicos con los correspondientes a frutos tipo salvaje. Para cada gen estudiado se realizaron dos análisis complementarios. En el primero, se estudiaron los perfiles de expresión para cada evento por separado, de modo de evaluar posibles cambios con respecto al perfil de expresión observado en frutos tipo salvaje. En el segundo, se compararon los niveles de expresión por estadio, siempre contrastando los valores medios de expresión relativos de frutos transgénicos con los correspondientes al de frutos tipo salvaje en cada estadio. En ambos análisis se relativizaron los valores de expresión a una de las réplicas biológicas de frutos tipo salvaje en estadio dos de maduración (WT E2).

3.2.3.8.1. *FvExp6a*

El perfil de expresión del gen *FvExp6a* en frutos tipo salvaje se caracterizó por una continua disminución de los niveles de ARNm con el avance de la maduración (Fig. 3.2.14). Los perfiles observados en los eventos transgénicos resultaron ser similares al de los frutos tipo salvaje (Fig. 3.2.15). Sin embargo, en los eventos CBM3, CBM4 y CBM5, la disminución resultó ser menos pronunciada que los frutos tanto del tipo salvaje como los del evento CBM2, entre los estadios dos y tres (E2-E3).

Al comparar la expresión del gen por estadio, a excepción del evento CBM2 en el estadio 3 (E3), se observó una tendencia hacia una mayor expresión en los frutos correspondientes a eventos transformados que en los frutos tipo salvaje, que en algunos casos fue estadísticamente significativa (Fig. 3.2.16).

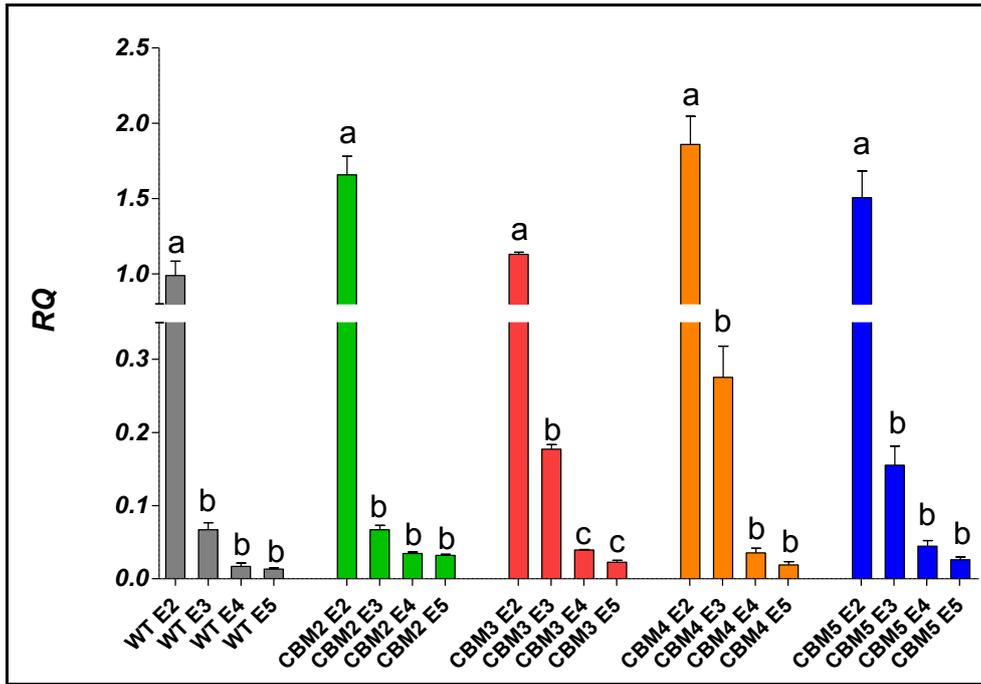


Fig. 3.2.15. Perfiles de expresión relativa de *FvExp6a* en frutos de *F. vesca* cv. H4. WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. La cuantificación se relativizó a una de las réplicas biológicas de frutos WT E2. Los resultados para cada evento se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante un test de Tukey ($p < 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre estadios de una misma planta.

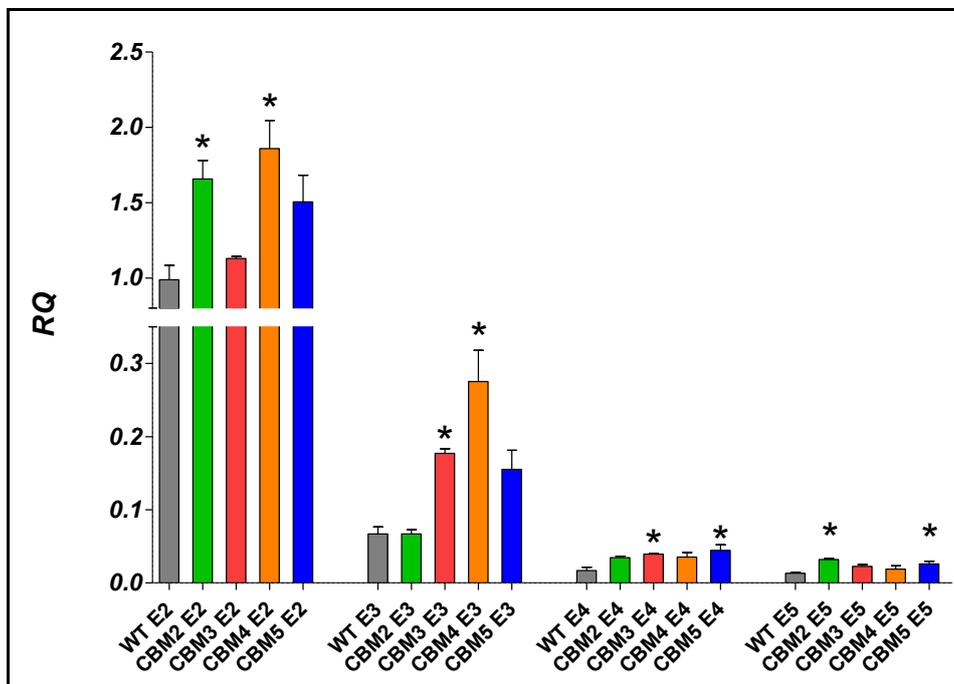


Fig. 3.2.16. Análisis comparativo de la expresión de *FvExp6a* en frutos de *F. vesca* cv. H4, relativa a la expresión en el tipo salvaje en estadio dos (E2). WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. La cuantificación se relativizó a una de las réplicas biológicas de frutos WT E2. Los resultados se analizaron mediante ANOVA por estadio de madurez. Las medias correspondientes a los eventos transgénicos se compararon con la media de frutos tipo salvaje mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$). Los asteriscos (*) indican diferencia estadística con respecto al tipo salvaje.

3.2.3.8.2. *FvExp6b*

Los resultados obtenidos para los perfiles de expresión a nivel de ARNm del gen *FvExp6b* en frutos tipo salvaje fueron similares a los obtenidos para la isoforma *FvExp6a*. Se observó una continua disminución en los niveles de su ARNm con el avance de la maduración del fruto (Fig. 3.2.17). Los perfiles correspondientes a los eventos transgénicos resultaron ser similares al propio de los frutos tipo salvaje, con la diferencia de una disminución de la expresión menos pronunciada en los eventos CBM3, CBM4 y CBM5 entre los estadios dos y tres (E2-E3).

En la comparación de los niveles de expresión por estadio, sólo se observaron diferencias significativas en los estadios tres y cuatro, siendo en ambos casos la expresión observada en los frutos de los eventos CBM3, CBM4 y CBM5 mayor a la correspondiente de los frutos tipo salvaje (Fig. 3.2.18). La misma tendencia se observó en todos los eventos en el estadio cinco (E5; Fig. 3.2.18).

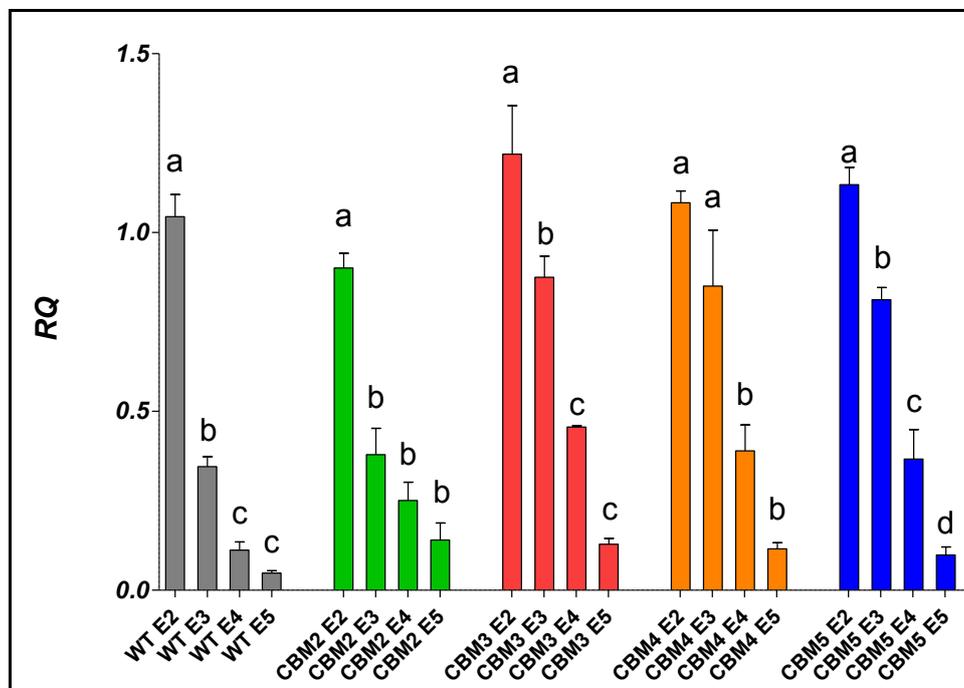


Fig. 3.2.17. Perfiles de expresión relativa de *FvExp6b* en frutos de *F. vesca* cv. H4. WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. La cuantificación se relativizó a una de las réplicas biológicas de frutos WT E2. Los resultados para cada evento se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante un test de Tukey ($p < 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

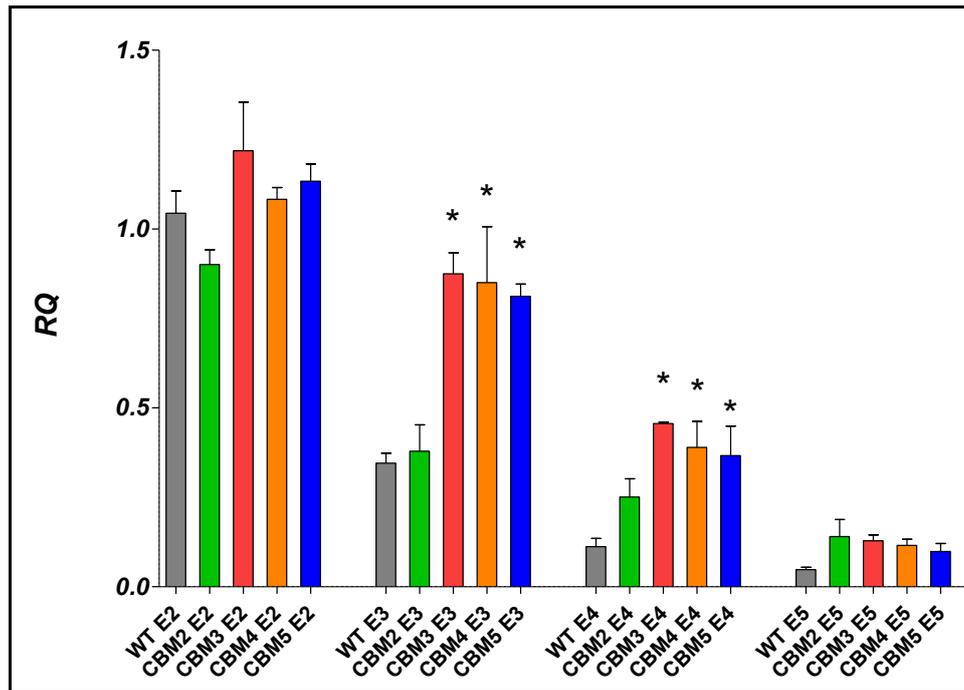


Fig. 3.2.18. Análisis comparativo de la expresión de *FvExp6b* en frutos de *F. vesca* cv. H4, relativa a la expresión en el tipo salvaje en estadio dos. WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. La cuantificación se relativizó a una de las réplicas biológicas de frutos WT E2. Los resultados se analizaron mediante ANOVA por estadio de madurez. Las medias correspondientes a los eventos transgénicos se compararon con la media de frutos tipo salvaje mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$). Los asteriscos (*) indican diferencia estadística al tipo salvaje.

3.2.3.8.3. *FvExp10*

El perfil de expresión del gen *FvExp10* para los frutos tipo salvaje se caracterizó por una clara disminución en los niveles de ARNm con la maduración (Fig. 3.2.19). Los perfiles observados para los eventos transgénicos presentaron las mismas características, con la salvedad de que en los eventos CBM4 y CBM5 la disminución de los niveles de ARNm resultó ser menos pronunciada que en el resto de los eventos analizados (Fig. 3.2.19).

En todos los estadios de madurez analizados se obtuvieron diferencias significativas con los niveles de expresión de los frutos tipo salvaje, al menos en uno de los eventos transgénicos analizados (Fig. 3.2.20), siendo en todos los casos la expresión observada en los frutos transgénicos mayor que la correspondientes a los frutos tipo salvaje. A pesar de no resultar significativas, se apreció una tendencia general a una mayor expresión en los eventos transgénicos que los frutos tipo salvaje, sobre todo en los estadios tres, cuatro y cinco (E3, E4 y E5).

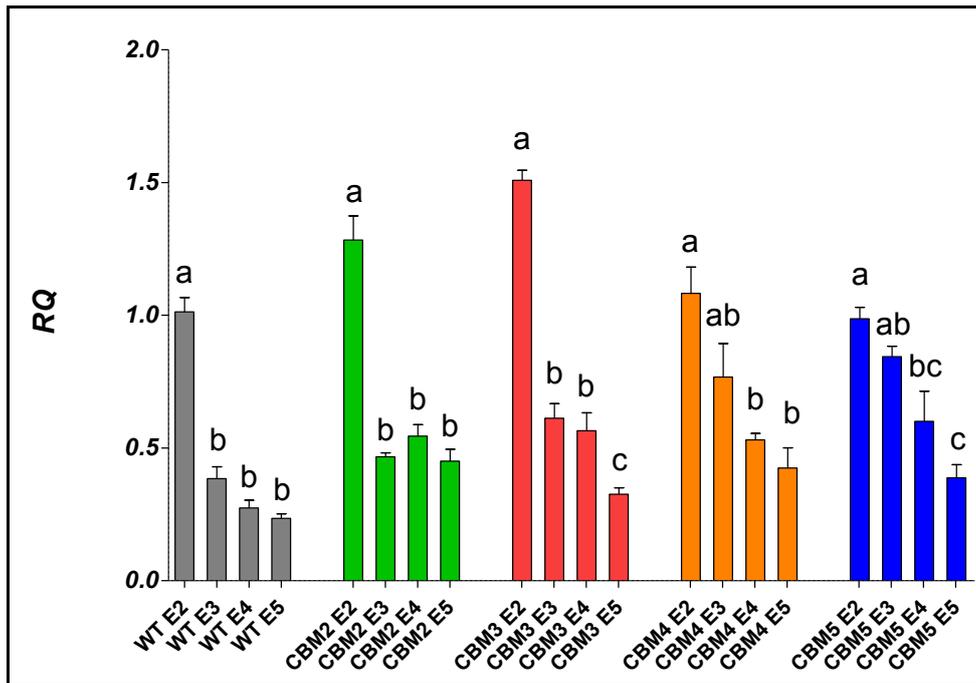


Fig. 3.2.19. Perfiles de expresión relativa de *FvExp10* en frutos de *F. vesca* cv. H4. WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. La cuantificación se relativizó a una de las réplicas biológicas de frutos WT E2. Los resultados para cada evento se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante un test de Tukey ($p < 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

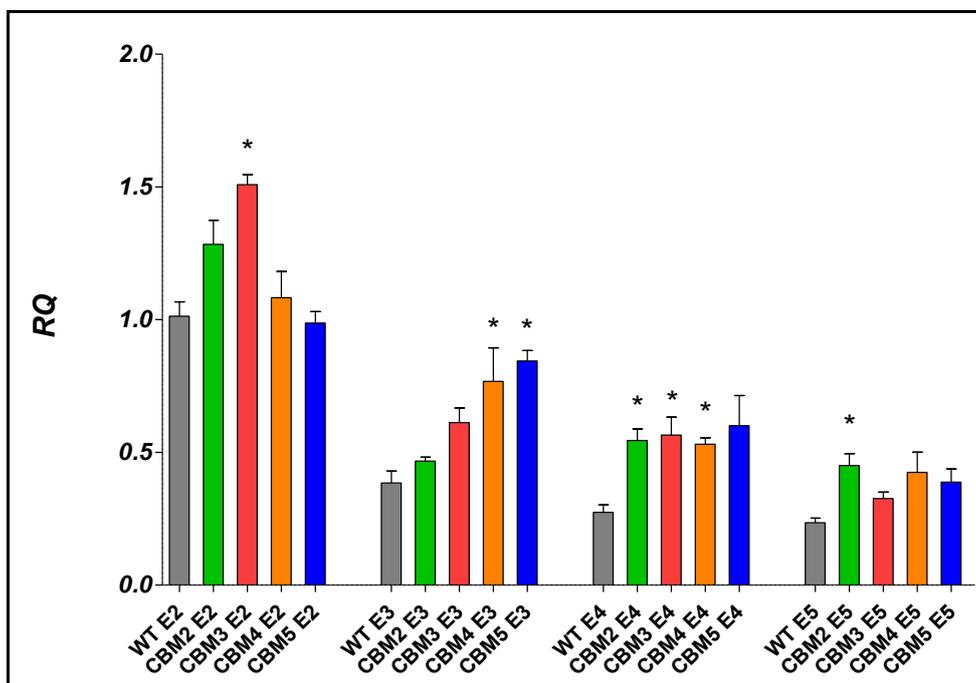


Fig. 3.2.20. Análisis comparativo de la expresión de *FvExp10* en frutos de *F. vesca* cv. H4, relativa a la expresión en el tipo salvaje en estadio dos (E2). WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. La cuantificación se relativizó a una de las réplicas biológicas de frutos WT E2. Los resultados se analizaron mediante ANOVA por estadio de madurez. Las medias correspondientes a los eventos transgénicos se compararon con la media de frutos tipo salvaje mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$). Los asteriscos (*) indican diferencia estadística al tipo salvaje.

3.2.3.8.4. *FvExp1*

El perfil de expresión del gen *FvExp1* en frutos tipo salvaje se caracterizó por una marcada disminución en los niveles de ARNm entre los estadios dos y tres (E2-E3; Fig. 3.2.20). Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión del gen entre los estadios tres (E3), cuatro (E4) y cinco (E5), los resultados mostraron una clara tendencia hacia la disminución en los niveles de ARNm con la maduración del fruto (Fig. 3.2.21). Los perfiles de expresión observados en los eventos transgénicos resultaron ser similares al obtenido para los frutos tipo salvaje, (Fig. 3.2.21), siendo la disminución entre los estadios dos y tres (E2 y E3) la de mayor relevancia (Fig. 3.2.21).

No se detectaron diferencias significativas en la comparación de la expresión relativa en los eventos transgénicos con los frutos tipo salvaje en el estadio dos de maduración (Fig. 3.2.22). Sólo se observaron diferencias significativas para el evento CBM4 en el estadio tres (E3), para el CBM5 en el estadio cuatro (E4) y para el CBM2 en el estadio cinco (E5), en todos los casos observándose una mayor expresión para los eventos transgénicos que para los frutos tipo salvaje en cada estadio (Fig. 3.2.22).

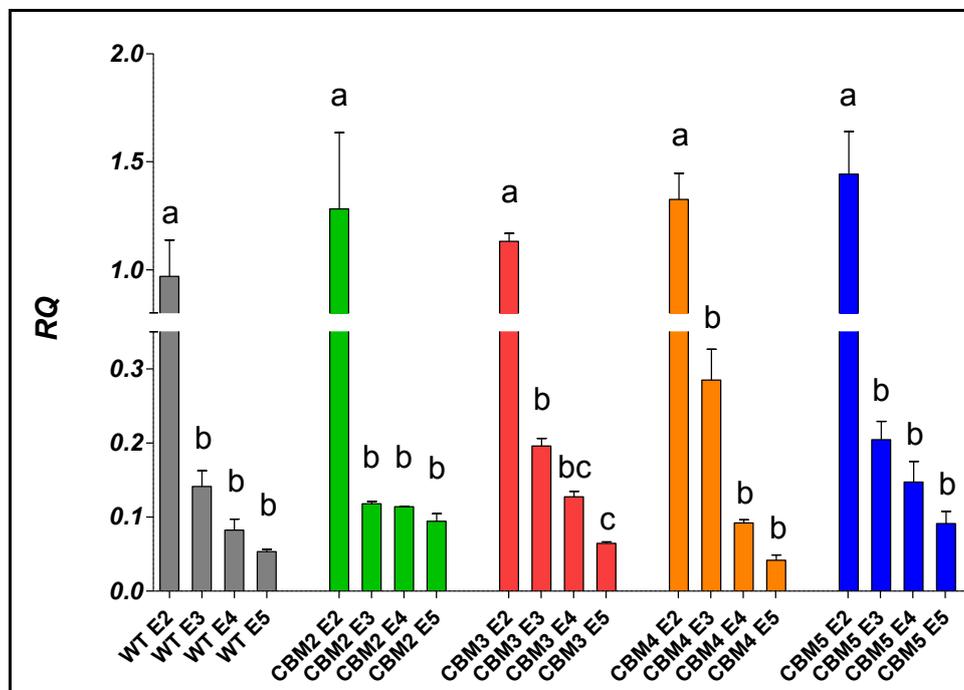


Fig. 3.2.21. Perfiles de expresión relativa de *FvExp1* en frutos de *F. vesca* cv. H4. WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. La cuantificación se relativizó a una de las réplicas biológicas de frutos WT E2. Los resultados para cada evento se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante un test de Tukey ($p < 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

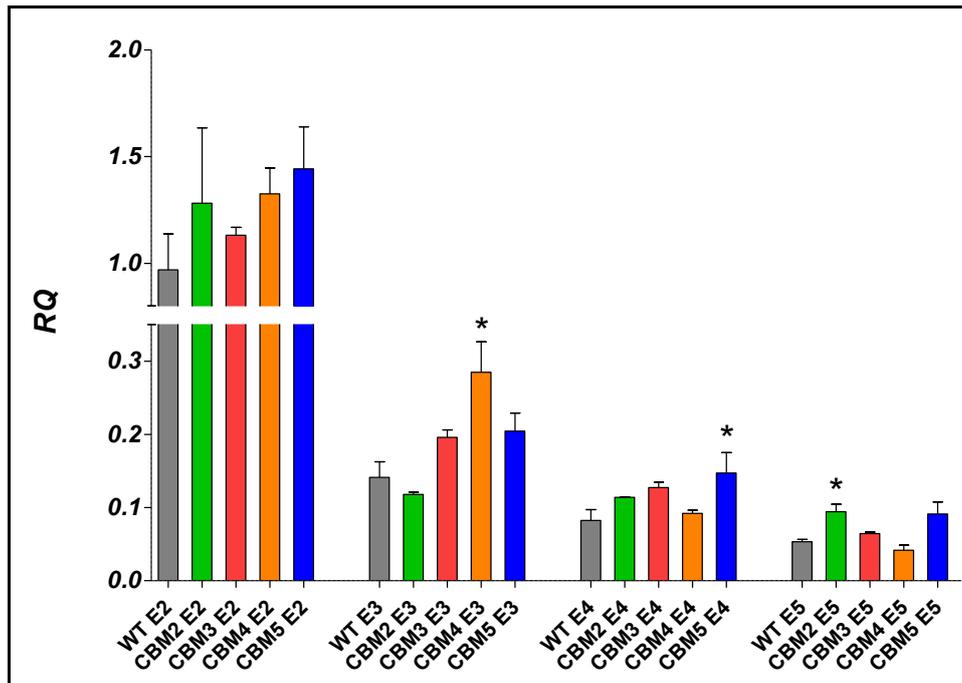


Fig. 3.2.22. Análisis comparativo de la expresión de *FvExp1* en frutos de *F. vesca* cv. H4, relativa a la expresión en el tipo salvaje en estadio dos (E2). WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. La cuantificación se relativizó a una de las réplicas biológicas de frutos WT E2. Los resultados se analizaron mediante ANOVA por estadio de madurez. Las medias correspondientes a los eventos transgénicos se compararon con la media de frutos tipo salvaje mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$). Los asteriscos (*) indican diferencia estadística al tipo salvaje.

3.2.3.8.5. *FvExp1-like*

La expresión del gen *FvExp1-like* a nivel de ARNm en frutos tipo salvaje se caracterizó por disminuir entre los estadios dos y tres (E2-E3), mantenerse prácticamente constante entre los estadios tres y cuatro (E3-E4), y finalmente aumentar entre los estadios cuatro y cinco (E4-E5; Fig. 3.2.23). Los perfiles observados en los distintos eventos transgénicos resultaron ser similares al descrito para los frutos tipo salvaje, salvo en el evento CBM5 en el que no se observó el aumento en la expresión al final de la maduración entre los estadios cuatro y cinco (E4-E5), como en el resto de los eventos analizados (Fig. 3.2.23).

En la comparación de la expresión relativa del gen entre los frutos de los eventos transgénicos y los frutos tipo salvaje por estadio, se observaron diferencias significativas en todos los estadios de maduración, al menos para uno de los eventos transgénicos (Fig. 3.2.24). En el estadio dos (E2) se observó una tendencia hacia una menor

expresión en los eventos transgénicos que en los frutos tipo salvaje, siendo la observada en el evento CBM2 estadísticamente significativa (Fig. 3.2.24). En el estadio tres (E3) sólo se observaron diferencias significativas en los eventos CBM3 y CBM4, siendo la expresión en los frutos de esos eventos mayor a la de los frutos tipo salvaje (Fig. 3.2.24). En el estadio cinco (E5) se observaron diferencias significativas en los eventos CBM4 y CBM5, siendo mayores los niveles de ARNm en el primero y, menores en el segundo.

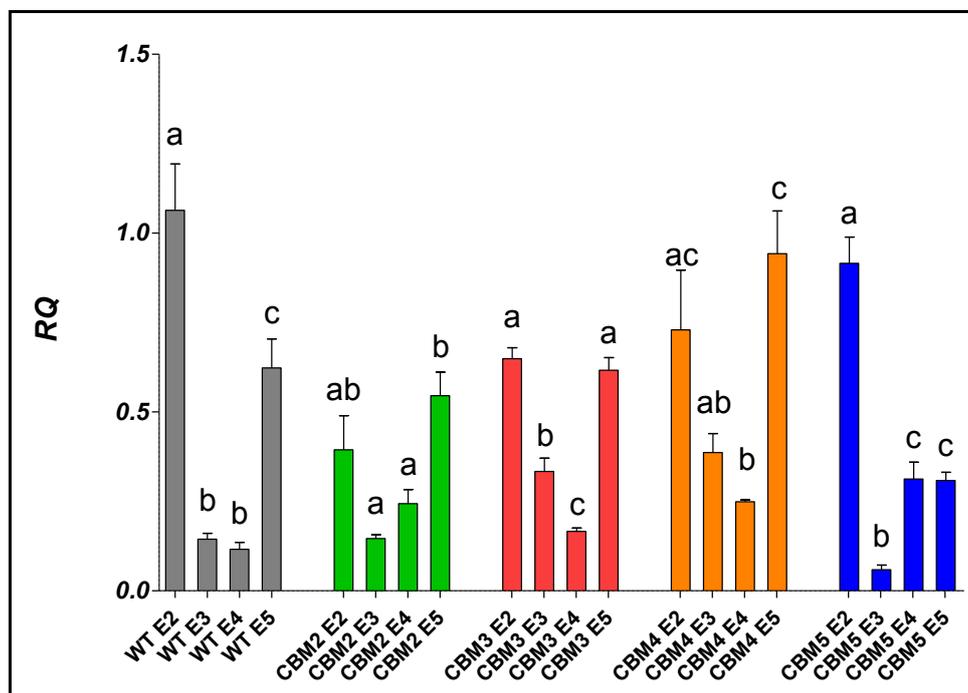


Fig. 3.2.23. Perfiles de expresión relativa de *FvExp1*-like en frutos de *F. vesca* cv. H4. WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. La cuantificación se relativizó a una de las réplicas biológicas de frutos WT E2. Los resultados para cada evento se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante un test de Tukey ($p < 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

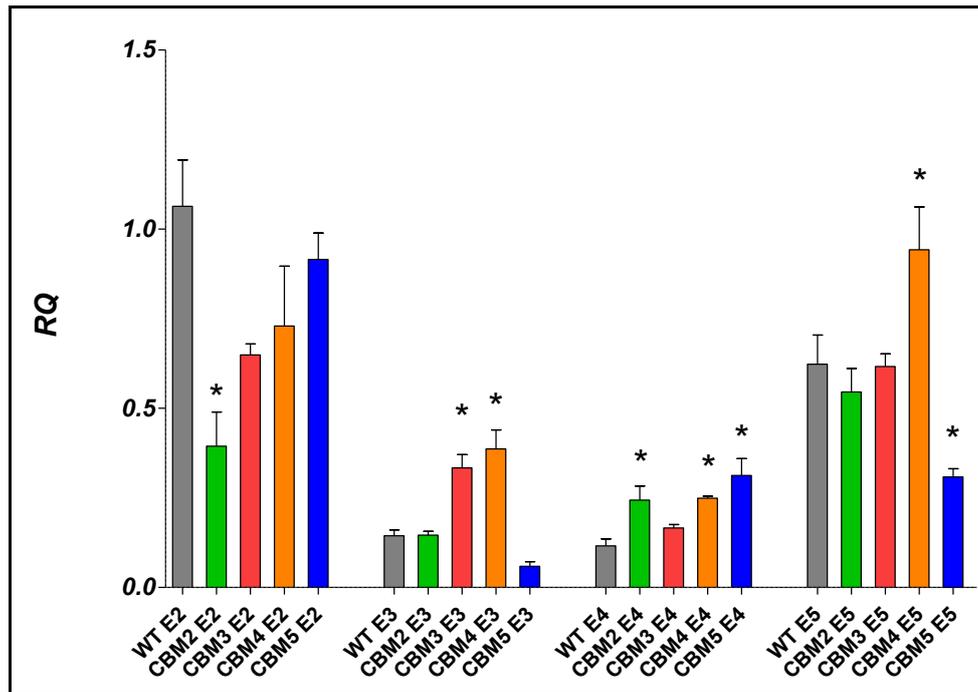


Fig. 3.2.24. Análisis comparativo de la expresión de *FvExp1-like* en frutos de *F. vesca* cv. H4, relativa a la expresión en el tipo salvaje en estadio dos (E2). WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. La cuantificación se relativizó a una de las réplicas biológicas de frutos WT E2. Los resultados se analizaron mediante ANOVA por estadio de madurez. Las medias correspondientes a los eventos transgénicos se compararon con la media de frutos tipo salvaje mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$). Los asteriscos (*) indican diferencia estadística al tipo salvaje.

3.2.3.8.6. *FvPPE8B-like*

El perfil de la expresión del gen *FvPPE8B-like* en frutos tipo salvaje se caracterizó por una rápida disminución en los niveles de ARNm del gen con el avance de la maduración (Fig. 3.2.25). Los perfiles observados en los eventos transgénicos resultaron ser muy similares al propio de los frutos tipo salvaje, con la salvedad de que en los frutos del evento CBM4 la caída en los niveles de ARNm entre los estadios dos y tres (E2-E3) no fue tan pronunciada como en el resto de los eventos analizados (Fig. 3.2.25).

No se detectaron diferencias significativas entre los niveles de expresión en frutos de los distintos eventos transgénicos y tipo salvaje en el estadio dos (E2) de maduración (Fig. 3.2.26). En el estadio tres (E3) sólo se observó una mayor expresión respecto a los frutos tipo salvaje en el evento CBM3, siendo esta mayor al de los frutos sin transformar (Fig. 3.2.26). A excepción del evento CBM4 en el estadio cinco (E5), todos los eventos mostraron una mayor expresión del gen *FvPP8B-like* que los frutos tipo salvaje en los estadios cuatro y cinco (E4 y E5; Fig. 3.2.26).

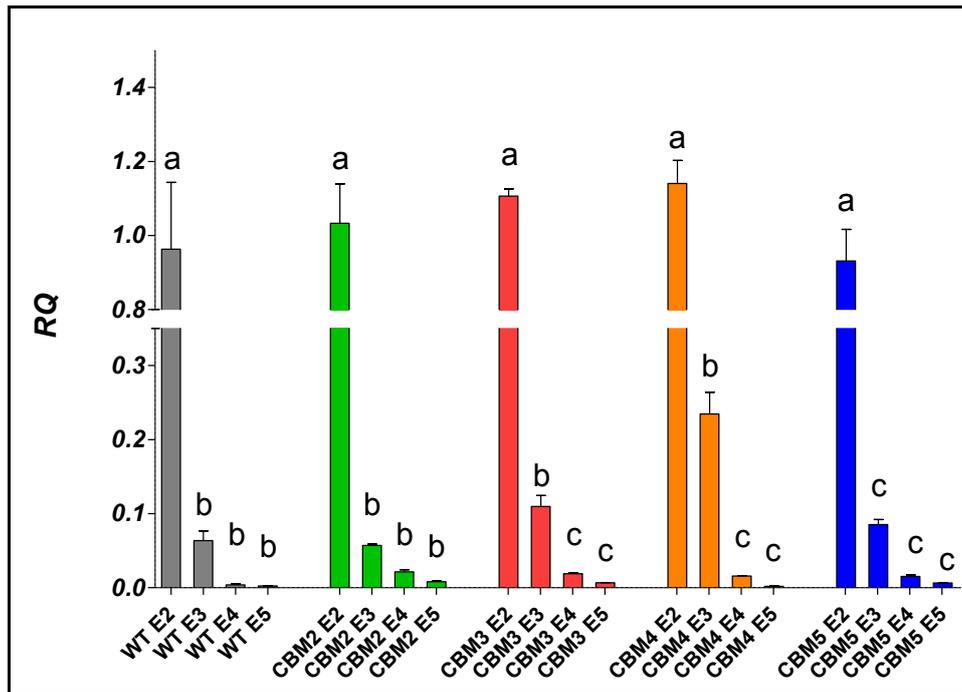


Fig. 3.2.25. Perfiles de expresión relativa de *FvPPE8B-like* en frutos de *F. vesca* cv. H4. WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. La cuantificación se relativizó a una de las réplicas biológicas de frutos WT E2. Los resultados para cada evento se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante un test de Tukey ($p < 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

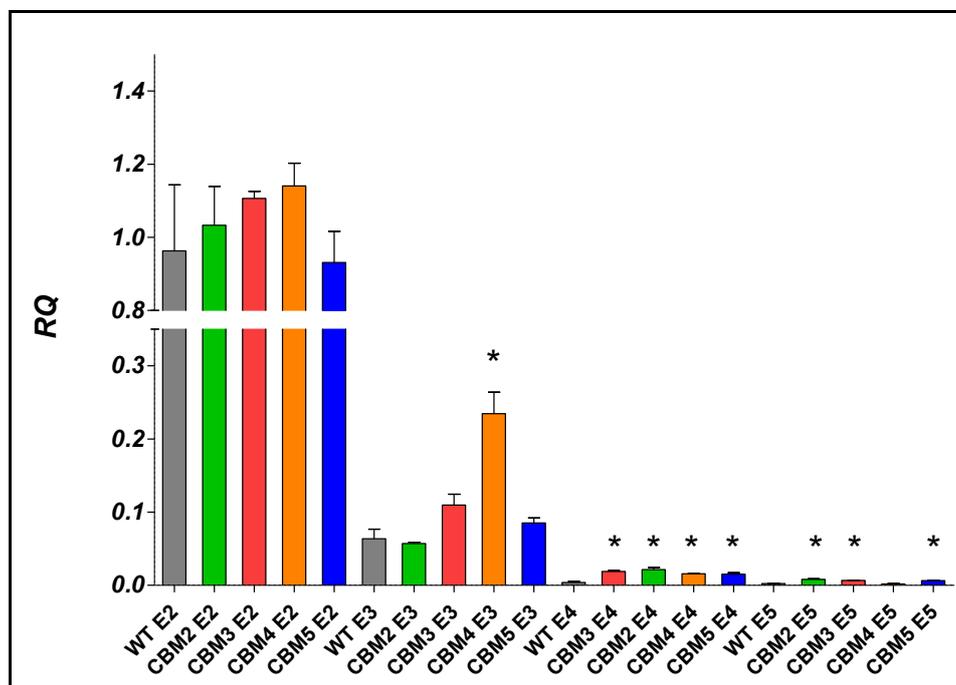


Fig. 3.2.26. Análisis comparativo de la expresión de *FvPPE8B-like* en frutos de *F. vesca* cv. H4, relativa a la expresión en el tipo salvaje en estadio dos (E2). WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. La cuantificación se relativizó a una de las réplicas biológicas de frutos WT E2. Los resultados se analizaron mediante ANOVA por estadio de madurez. Las medias correspondientes a los eventos transgénicos se compararon con la media de frutos tipo salvaje mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$). Los asteriscos (*) indican diferencia estadística al tipo salvaje.

3.2.3.8.7. *FvPG1*

El perfil de los niveles expresión relativa para el gen *FvPG1* durante la maduración de frutos tipo salvaje se caracterizó por una rápida disminución de los niveles de ARNm entre los estadios dos y tres (E2-E3), para mantenerse prácticamente constante hasta el final de la maduración del fruto (Fig. 3.2.27). El evento CBM2 presentó un perfil de expresión similar al observado en los frutos tipo salvaje, sin embargo, en los eventos CBM3, CBM4 y CBM5 se obtuvieron perfiles diferentes al observado en los frutos tanto tipo salvaje como a los del evento CBM2. En el evento CBM3 la expresión se mantuvo constante entre los estadios dos y tres (E2-E3), disminuyó entre los estadios tres y cuatro (E3-E4) y se mantuvo constante hasta el final de la maduración (E4-E5; Fig. 3.2.27). En los eventos CBM4 y CBM5 se observaron perfiles de expresión similares, caracterizados por un ligero aumento en los niveles de ARNm entre los estadios dos y tres (E2-E3), para luego disminuir en forma continua hacia el final de la maduración (E3-E5; Fig. 3.2.27).

No se detectaron diferencias significativas en la expresión relativa del gen *FvPG1* entre los frutos de los eventos transgénicos y frutos tipo salvaje en el estadio dos (E2) de maduración (Fig. 3.2.28). En el estadio tres (E3) se observó una tendencia hacia una mayor expresión del gen a nivel de ARNm en los cuatro eventos transgénicos analizados, siendo la correspondiente a los eventos CBM3, CBM4 y CBM5 estadísticamente significativa (Fig. 3.2.28). Para estos tres eventos la expresión relativa resultó ser aproximadamente unas cuatro veces superior a la observada en los frutos tipo salvaje. En el estadio cuatro (E4), la expresión del gen resultó ser mayor a la observada en frutos tipo salvaje en los cuatro eventos transgénicos analizados, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en todos los casos (Fig. 3.2.28). En el estadio cinco (E5) sólo se observaron diferencias significativas en la expresión relativa entre los frutos del evento CBM2 y los frutos tipo salvaje (Fig. 3.2.28). La misma tendencia, aunque no estadísticamente significativa se observó en los eventos CBM4 y CBM5.

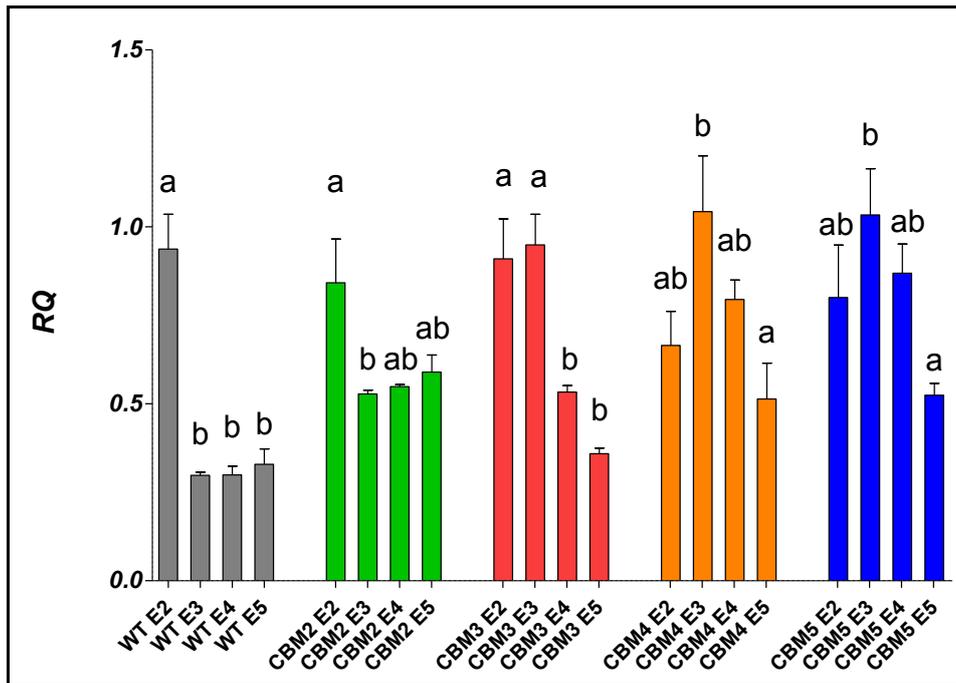


Fig. 3.2.27. Perfiles de expresión relativa de *FvPG* en frutos de *F. vesca* cv. H4. WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. La cuantificación se relativizó a una de las réplicas biológicas de frutos WT E2. Los resultados para cada evento se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante un test de Tukey ($p < 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

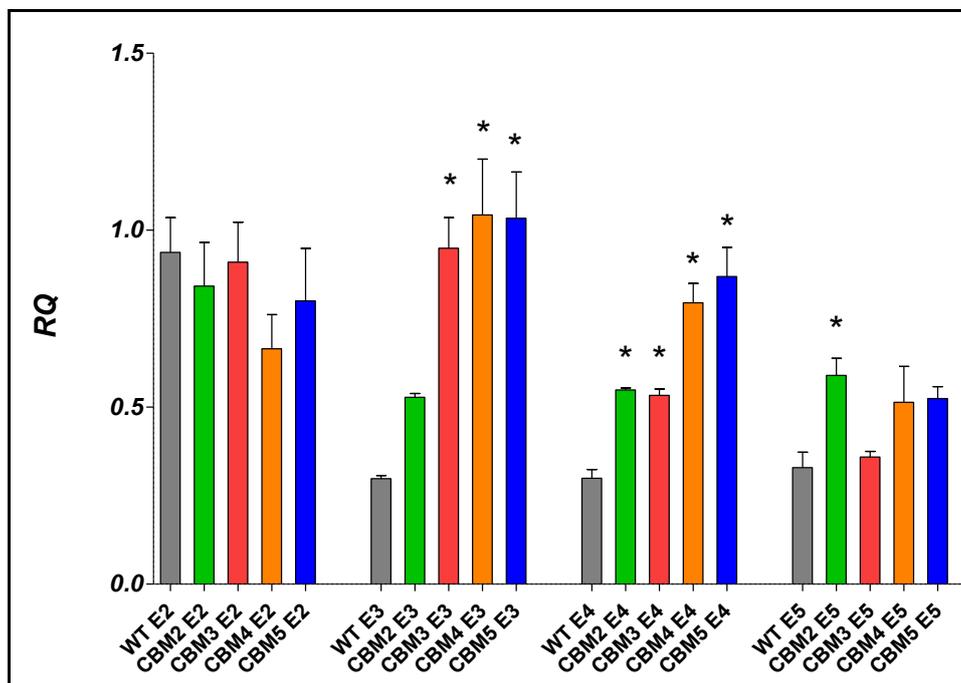


Fig. 3.2.28. Análisis comparativo de la expresión de *FvPG* en frutos de *F. vesca* cv. H4, relativa a la expresión en el tipo salvaje en estadio dos (E2). WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. La cuantificación se relativizó a una de las réplicas biológicas de frutos WT E2. Los resultados se analizaron mediante ANOVA por estadio de madurez. Las medias correspondientes a los eventos transgénicos se compararon con la media de frutos tipo salvaje mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$). Los asteriscos (*) indican diferencia estadística al tipo salvaje.

3.2.3.9. Actividad Poligalacturonasa (PG)

Se midió la actividad poligalacturonasa en frutos tanto tipo salvaje como provenientes de los eventos CBM3, CBM4 y CBM5, en tres estadios de madurez (E3, E4 y E5; ver sección 3.1.7.7).

Se realizó un análisis de los perfiles de actividad PG para cada evento por separado, (Fig. 3.2.29. A). En frutos tipo salvaje se observó un aumento de la actividad PG entre los últimos estadios de madurez (E4-E5) (Fig. 3.2.29. A). Ninguno de los perfiles observados en los eventos transgénicos coincidió con el de los frutos del tipo salvaje (Fig. 3.2.29. A). En el evento CBM3 se observó una continua disminución en la actividad PG con la maduración, mientras que en los eventos CBM4 y CBM5 no se observaron diferencias significativas en la actividad PG en ninguno de los estadios de madurez analizados (Fig. 3.2.29 A).

Al comparar la actividad de los eventos transgénicos con la observada en frutos tipo salvaje por estadio de madurez, en todos los estadios la actividad en los eventos transgénicos resultó ser inferior a la medida en los frutos tipo salvaje, siendo la diferencia estadísticamente significativa en la mayoría de los casos (Fig. 3.2.29. B).

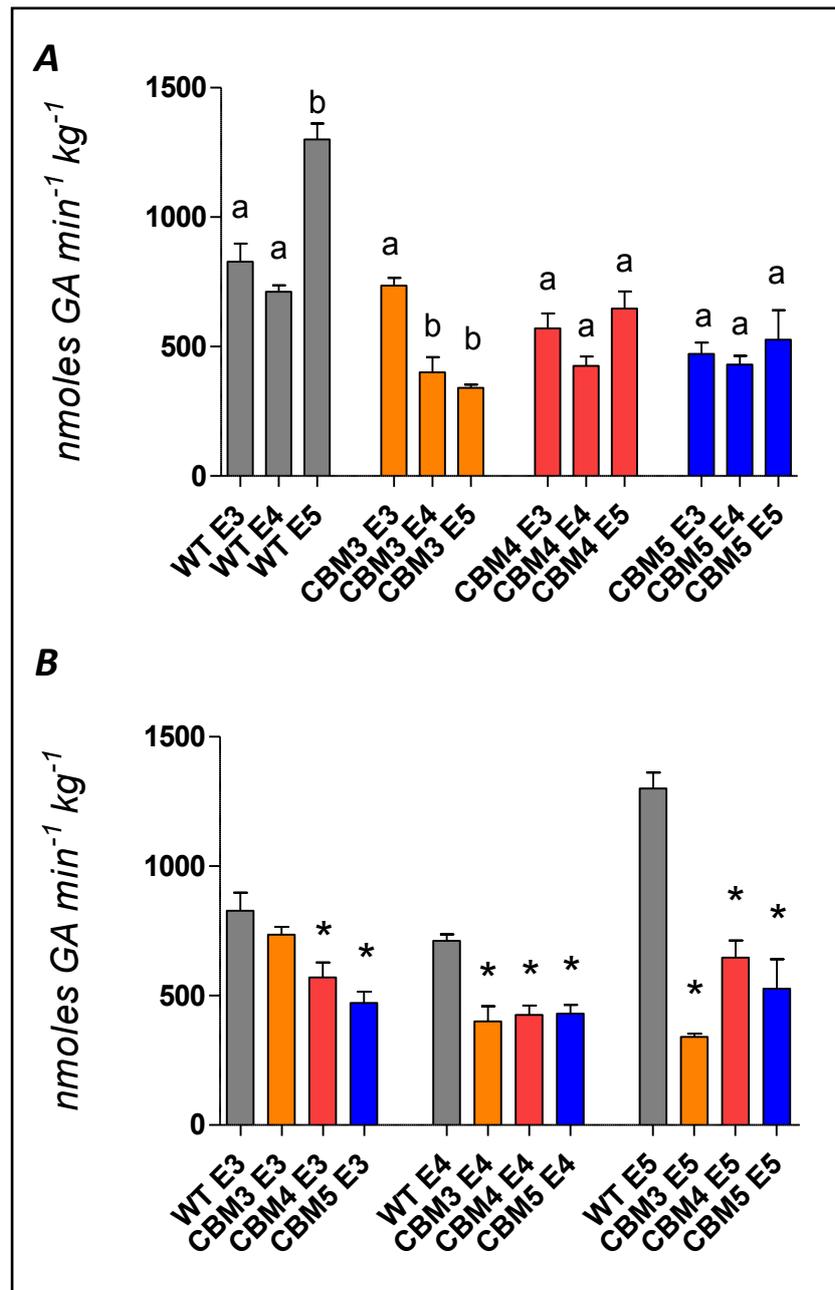


Fig. 3.2.29. Actividad PG en frutos de *F. vesca* cv. H4. WT: frutos tipo salvaje; CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E3, E4 y E5: estadios de madurez. Actividad normalizada en función del peso del tejido, expresada como nmol de ácido galacturónico liberado por min y por kg de fruto. A) Perfiles de actividad PG de cada evento analizado, los resultados se analizaron por evento mediante ANOVA y las medias se compararon utilizando un test de Tukey ($p < 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. B) Análisis comparativo de la actividad PG en frutos de *F. vesca* cv H4 entre los eventos transformados y los frutos del tipo salvaje. Los resultados se analizaron por estadio de madurez mediante ANOVA. Las medias correspondientes a los eventos transgénicos se compararon con la media de frutos tipo salvaje utilizando un test de Dunnett ($p < 0,05$). Los asteriscos (*) indican diferencia estadística al tipo salvaje.

3.2.3.10. Actividad Expansina

Con el objetivo de determinar la mejor condición para la determinación de la actividad expansina en frutos de *F. vesca* cv. H4 se realizó una curva dosis respuesta para cada extracto de frutos tipo salvaje, en cada uno de los estadios de madurez analizado. En todos los casos se determinó tanto la extensión total neta del hipocótilo en el tiempo de ensayo a pH 4,5, como la actividad expansina específica (Fig. 3.2.30, Fig. 3.2.31 y Fig. 3.2.32). Se eligió como mejor condición a la mayor concentración de proteínas del extracto que cumpla con el requisito de mayor actividad neta para una misma actividad específica. Con ello se buscó la existencia de un punto de saturación en el sistema de medición elegido.

Para el estadio tres (E3) de maduración, se eligió como mejor condición a una concentración de proteínas de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La extensión total neta resultó en un aumento continuo con la concentración del extracto analizado (40, 100 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Fig. 3.2.30 A), mientras que no se observaron diferencias significativas en la actividad expansina específica entre las distintas concentraciones ensayadas (Fig. 3.2.30 B). Sí se observaron diferencias significativas entre la actividad específica determinada en presencia de las distintas diluciones del extracto proteico y el control sin proteína (Fig. 3.2.30 B).

Para el estadio cuatro (E4) de maduración, se eligió como mejor condición a una concentración de proteínas de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En este estadio en particular se ensayaron las siguientes concentraciones del extracto proteico: 0, 100, 250 y 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se observó un aumento continuo de la extensión total neta hasta la de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 3.2.31 A). No se observaron diferencias significativas en la actividad expansina específica a las distintas concentraciones ensayadas (Fig. 3.2.31 B). Todas las determinaciones en presencia de proteína presentaron diferencias significativas con el control sin proteína (Fig. 3.2.31 B). Se eligió como mejor condición a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por el hecho de no llegar a concentraciones de más 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en los extractos de todos los eventos analizados.

Finalmente, para el estadio cinco (E5), se eligió como mejor condición a una concentración de proteínas de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La extensión total neta resultó en un aumento continuo con la concentración del extracto analizado (0, 100, 200 y 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Fig. 3.2.32 A), mientras que no se observaron diferencias significativas en la actividad expansina específica entre las distintas concentraciones ensayadas (Fig. 3.2.32 B). Sí se observaron diferencias significativas entre la actividad específica determinada en presencia de las distintas diluciones del extracto proteico y el control sin proteína (Fig. 3.2.32 B). Se eligió como mejor condición a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por el hecho de no llegar a concentraciones de más 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en los extractos de todos los eventos analizados.

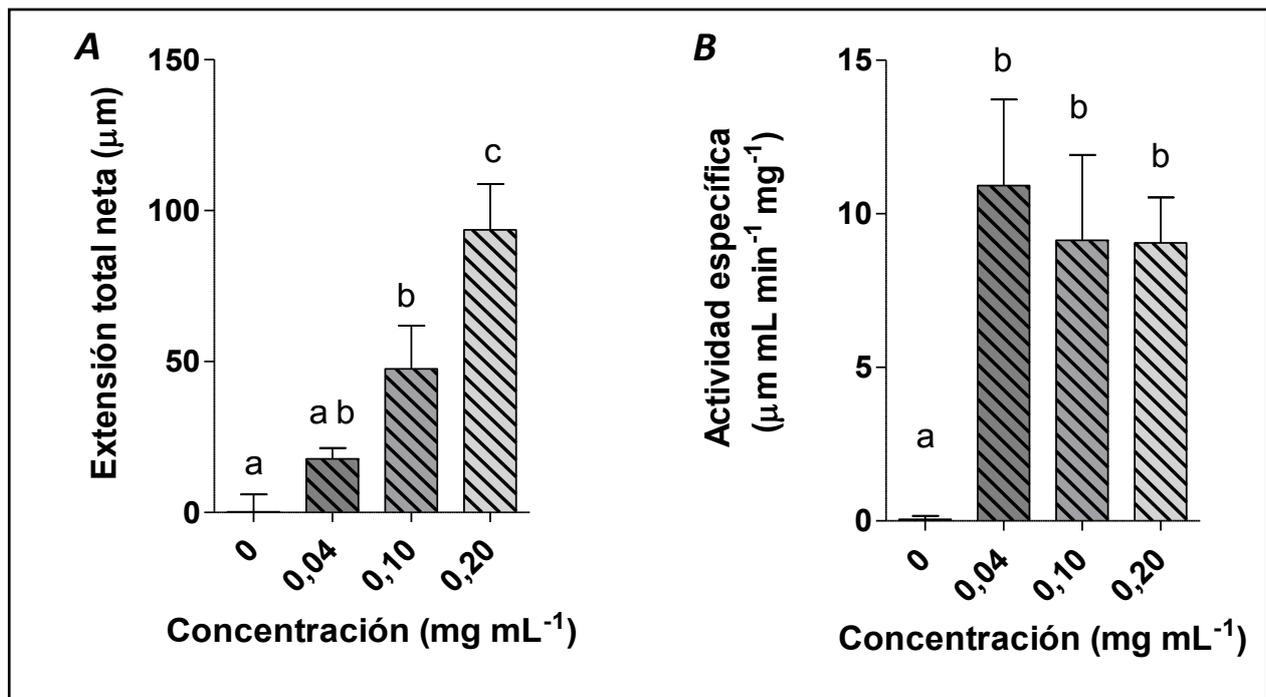


Fig. 3.2.30. Dosis/respuesta para la actividad expansina total en frutos de *F. vesca* cv. H4 tipo salvaje en estadio tres (E3) de maduración. A) Actividad neta expresada como $\mu\text{m min}^{-1}$. B) Actividad expansina específica expresada como $\mu\text{m} \cdot \text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. En ambos casos los resultados se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon entre sí utilizando un test de Tukey ($p < 0,05$). Letras distintas indican diferencias significativas.

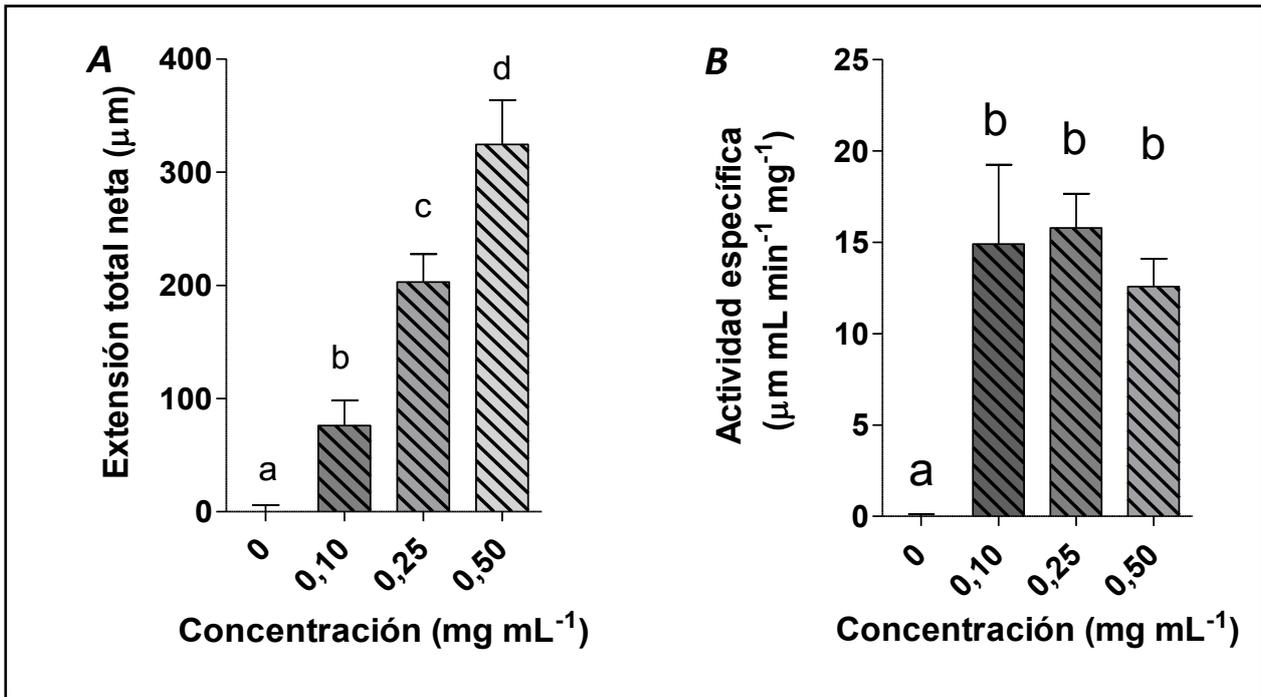


Fig. 3.2.31. Dosis/respuesta para la actividad expansina total en frutos de *F. vesca* cv. H4 tipo salvaje en estadio cuatro (E4) de maduración. A) Actividad neta expresada como $\mu\text{m min}^{-1}$. B) Actividad expansina específica expresada como $\mu\text{m}\cdot\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. En ambos casos los resultados se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon entre sí utilizando un test de Tukey ($p<0,05$). Letras distintas indican diferencias significativas.

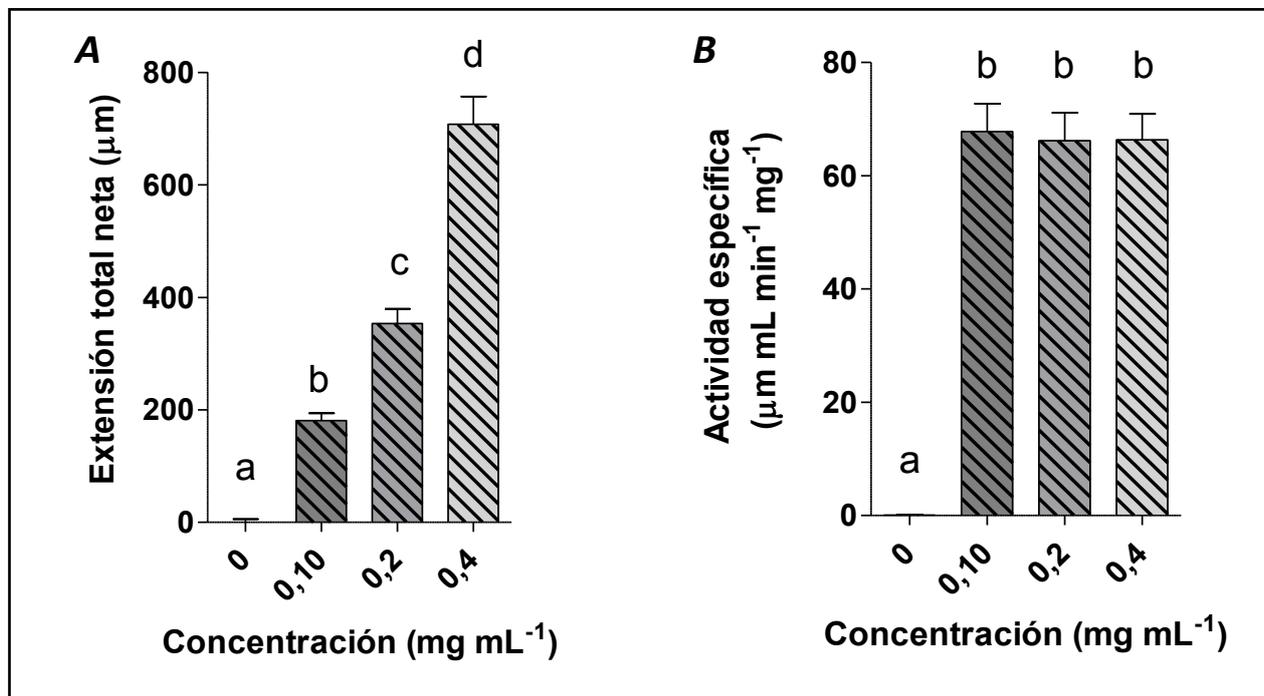


Fig. 3.2.32. Dosis/respuesta para la actividad expansina total en frutos de *F. vesca* cv. H4 tipo salvaje en estadio cinco (E5) de maduración. A) Actividad neta expresada como $\mu\text{m min}^{-1}$. B) Actividad expansina específica expresada como $\mu\text{m}\cdot\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. En ambos casos los resultados se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon entre sí utilizando un test de Tukey ($p<0,05$). Letras distintas indican diferencias significativas.

Se construyó el perfil de actividad expansina específica durante la maduración de frutos tipo salvaje con los resultados obtenidos en los ensayos dosis respuesta para cada estadio de madurez (E3, E4 y E5; Fig. 3.2.33 A), observándose un aumento continuo en la actividad expansina específica con la maduración (Fig.3.2.33 A). En lo que respecta a los perfiles de los distintos eventos transgénicos, se observó un comportamiento distinto al de los frutos tipos salvaje. Si bien no se obtuvieron diferencias significativas en las actividades específicas entre los estadios tres (E3) y cuatro (E4), se observa en todos los eventos transgénicos una tendencia hacia una ligera disminución en la actividad antes de aumentar considerablemente en el estadio cinco (E5; Fig. 3.2.33 A).

Al comparar por estadio la actividad expansina determinada en los frutos transgénicos con la propia de los frutos tipo salvaje, en el estadio tres (E3) de maduración sólo se observaron diferencias significativas en la actividad expansina determinada en el evento CBM5, siendo esta menor a la observada en frutos tipo salvaje (Fig. 3.2.33 B). En los estadios cuatro (E4) y cinco (E5) en cambio, todos los frutos provenientes de eventos transgénicos presentaron una menor actividad expansina que en los frutos tipo salvaje, siendo la diferencia en todos los casos estadísticamente significativa (Fig. 3.2.33 B).

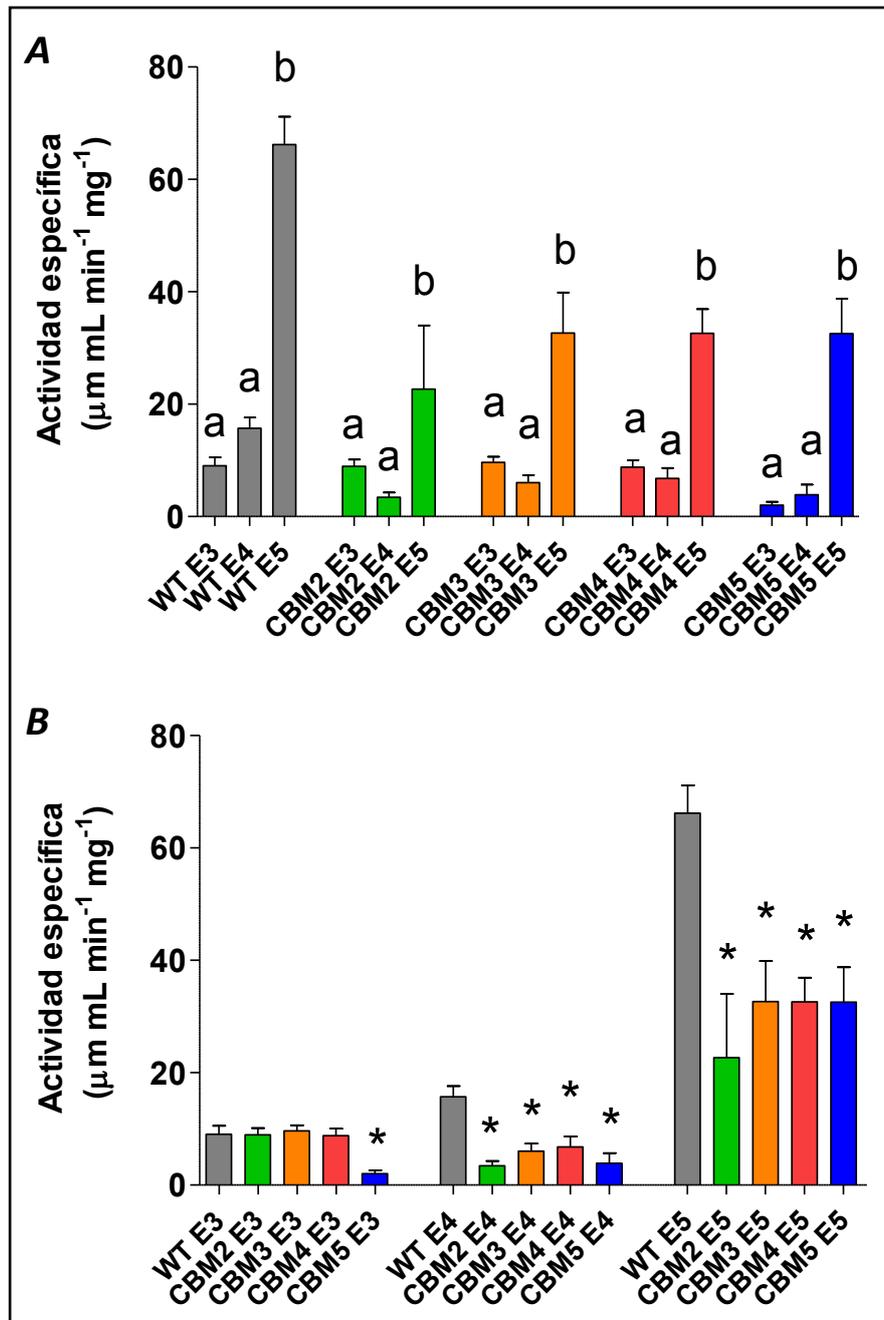


Fig. 3.2.34. A) Perfil de la actividad expansina específica ($\mu\text{m}\cdot\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) en frutos de *F. vesca* cv. H4 entre los estadios tres y cinco (E3-E5) de maduración. WT: frutos tipo salvaje; CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5: eventos transformados; E3, E4 y E5: estadios de maduración. Los resultados se analizaron por estadio de madurez mediante ANOVA y las medias se compararon entre sí utilizando un test de Tukey ($p < 0,05$). Letras distintas indican diferencias significativas. B) Comparación entre la actividad expansina específica ($\mu\text{m}\cdot\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) en frutos de cuatro eventos transgénicos (CBM2, CBM3, CBM4 y CBM5) y frutos tipo salvaje (WT), en los estadios tres, cuatro y cinco de maduración (E3, E4 y E5). Los resultados se analizaron mediante ANOVA y las medias de los eventos transgénicos se compararon con la propia de los frutos tipo salvaje por estadio, utilizando un test de Dunnett ($p < 0,05$). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con la actividad observada en frutos tipo salvaje.

3.3. Discusión

Uno de los factores determinantes de la calidad y vida poscosecha de un fruto es su firmeza, dada principalmente por la rigidez mecánica impuesta por la pared celular. En el área de la tecnología poscosecha es constante el estudio y desarrollo de nuevas estrategias que permitan controlar el ablandamiento de los frutos. Tradicionalmente las mismas se diseñan en base a tratamientos físicos y químicos, pero con el advenimiento de las herramientas de la ingeniería genética y la biología molecular se han desarrollado estrategias utilizando estas tecnologías, principalmente valiéndose del silenciamiento de genes clave del metabolismo de la pared celular. Si bien se ha conseguido reducir la expresión de estos genes a niveles muy bajos, no se han obtenido grandes diferencias en la firmeza final del producto, lo que nos habla de un fenómeno altamente regulado en el que participan varios actores en forma concertada y redundante.

En este capítulo se presentó el desarrollo de una estrategia basada en la ingeniería genética y biología molecular, con la que se intentó conseguir una disminución general del metabolismo de la pared celular sobreexpresando el módulo de unión a carbohidratos de la expansina dos de *Fragaria x ananassa* (CBM-FaEXP2) en la pared celular de *F. vesca*. Por su carácter de módulo, un CBM debería mantener tanto su plegamiento como sus propiedades fuera del contexto de la proteína a la que pertenece. Previamente, se caracterizó in-vitro a la proteína recombinante CBM-FaEXP2, producida en células de *E. coli* (Nardi y col., 2013), demostrándose que el módulo aislado mantiene su capacidad de unión a carbohidratos, pudiendo unirse en forma promiscua a celulosa, xilano y pectinas. Su sobreexpresión en la pared debería entonces generar una competencia por los sustratos con el resto de las enzimas involucradas en el metabolismo de la pared, provocando una reducción general del mismo, con un concomitante efecto sobre las propiedades y características del fruto.

Existen antecedentes del uso de una estrategia similar en *A. thaliana*, en la que se estudió la sobreexpresión constitutiva del CBM-FaEXP2 en la pared celular (Nardi y

col., 2015). En esa ocasión la sobreexpresión generó una alteración en el metabolismo de la pared, que se tradujo en plantas más altas, paredes con mayor contenido de carbohidratos y enriquecidas en pectinas, células de mayor tamaño, disminución en la expresión de algunos genes (*AtPG*, *Atβ-Gal*, *Atβ-Xyl5*, *AtExp8*, *AtExp5*, *Atα-Ara1*) y en la actividad de algunas enzimas del metabolismo de la pared celular (PG, β-Gal, β-Xyl, α-Ara).

La misma estrategia aplicada en *F. vesca* cv H4 en esta tesis dio lugar a frutos que no se diferenciaron en su morfología y desarrollo al compararlos con frutos tipo salvaje, mientras que sí se observaron diferencias en cuanto a su firmeza, contenido de azúcares solubles, expresión de genes relacionados al metabolismo de la pared celular y actividad de poligalacturonasa, principal enzima que degrada pectinas de la pared celular.

En lo que respecta a las características fenotípicas de los frutos, no se observaron diferencias en color, tamaño y peso entre los eventos transgénicos y los frutos tipo salvaje, ni tampoco se observaron diferencias fenotípicas entre las plantas enteras, lo cual constituye una marcada diferencia con lo reportado previamente en *A. thaliana* (Nardi y col., 2015).

En cuanto a la firmeza del fruto, tanto para los controles como para las líneas transgénicas se observa que el principal descenso de la misma ocurre entre los estadios E2 y E4, y luego continúa descendiendo levemente en el estadio E5. Excepto en la línea CBM2, los frutos de todas las líneas transgénicas presentaron mayor firmeza (14-33%) que los controles en el estadio E3. Dicha diferencia también persistió en el estadio E4 para las líneas 1, 3, 4 y 7 (14-24%) (Fig. 3.2.10). En el caso del estadio E2, los frutos provenientes de varias de las líneas transgénicas presentaron una clara tendencia hacia una mayor firmeza, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Cabe señalar, que el cultivar *F. vesca* cv. H4 produce un fruto blando con valores de firmeza que rondan en el límite inferior de operación del equipo empleado en las mediciones. Este hecho, sumado al pequeño tamaño y la irregularidad en la forma de

los frutos redujo la precisión de la medida, aumentando considerablemente su dispersión. Es probable que el uso de un método destructivo para la medición de la firmeza, en el que cual la forma del fruto no influya de la misma manera en la medición, sea más apropiado para estos frutos.

Los perfiles observados correspondientes al contenido de pared aislado como residuos insolubles en alcohol fueron similares a los descritos en reportes previos para las variedades de frutillas comerciales (Rosli y col., 2004), con la salvedad del pequeño aumento observado al final de la maduración en todos los eventos analizados. Se destaca el hecho de que el fenómeno coincide con el decaimiento del peso del fruto observado entre los estadios cuatro y cinco (E4 y E5, Fig. 3.2.7). Teniendo en cuenta que el valor del contenido de AIR se normaliza en función del peso fresco de tejido utilizado, es probable el aumento observado sea un artefacto producto del parámetro de normalización elegido. Sería necesario hacer uso del peso seco del tejido para corroborar lo antes dicho.

En cuanto a la comparación del contenido de pared de los eventos transgénicos con el propio de los frutos tipo salvaje, si bien sólo se detectaron diferencias significativas para el evento CBM5 en el estadio tres (E3), se observó una ligera tendencia hacia un mayor contenido en los eventos transgénicos, principalmente en los estadios tres y cuatro (E3 y E4, Fig. 3.2.12), coincidiendo con los estadios en los que se detectaron las mayores diferencias en firmeza.

Se conoce que el metabolismo de la pared celular es un fenómeno altamente regulado de modo tal de mantener la homeostásis de la misma (Höfte, 2015; Wolf y col., 2012), por lo que es de esperar que los cambios ocurridos luego de provocar una modificación en su metabolismo, de existir, sean sutiles. Para el caso del uso de la estrategia en *A. thaliana* se reportaron plantas transgénicas con mayor contenido de pared (Nardi y col., 2015), sin embargo, las mayores diferencias resultaron en la proporción de los polisacáridos que la componen, observándose un enriquecimiento en el contenido de pectinas en la pared de las plantas transgénicas en detrimento del

contenido de celulosa (Nardi y col., 2015). De este modo, es posible que la diferencia de firmeza hallada en los frutos transgénicos sea debida no solo a variaciones en el contenido de pared celular, sino también a un cambio en las proporciones de los componentes que la constituyen. Un futuro análisis de la composición de la pared permitiría corroborar o descartar esta hipótesis.

Con respecto al contenido de azúcares totales solubles en alcohol, se detectó un menor contenido en los frutos transgénicos en dos de los 3 estadios estudiados (E3 y E4, Fig. 3.2.14). Nuevamente, los estadios en los que se observan las diferencias en el contenido de azúcares solubles se condicen con los estadios en los que se observa mayor firmeza en los eventos transgénicos, así como también una tendencia hacia un mayor contenido de pared como residuos insolubles en alcohol. De este modo, podría existir una relación entre una mayor integridad de la pared celular y un menor contenido de azúcares solubles totales. La degradación de la pared puede conducir a un aumento de azúcares solubles (Posé y col., 2011).

Al comparar los perfiles de expresión de los cinco genes de expansinas analizados (*FvExp6a*; *FvExp6b*; *FvExp10*; *FvExp1*; *FvExp1-like*), un gen de poligalacturonasa (*FvPG1*), y un gen de pectin-metil-esterasa (*FvPPE8B-like*), no se observaron mayores diferencias entre los correspondientes a los eventos transgénicos con los propios de los de los frutos tipo salvaje, a excepción del gen *FvPG1*, en el que los eventos CBM3, CBM4 y CBM5 sí presentaron perfiles de expresión diferentes al de los frutos tipo salvaje. La presencia del CBM-FaEXP2 en la pared no afectaría el perfil de expresión de estos genes a lo largo de la maduración. De nuestro conocimiento este es el primer trabajo en el que se reportan los perfiles de expresión de genes del metabolismo de la pared celular durante la maduración de *F. vesca* cv H4, lo cual nos impide corroborar estas tendencias contra datos de la bibliografía. En cambio, existen diversos trabajos en los que describen los perfiles de expresión de los mismos genes en diferentes cultivares de *Fragaria x ananassa*:

Autores	Gene/s en Estudio	Cultivar de <i>Fragaria ananassa</i>
Harrison y col., 2001	<i>FaEXP2; FaEXP3; FaExp4; FaExp5; FaExp6; FaExp7</i>	Brighton
Dotto y col., 2006	<i>FaExp1; FaEXP2; FaExp4; FaExp5; FaExp6</i>	Selva, Camarosa y Toyonoka
Figuroa y col., 2009	<i>FaExp1; FaEXP2; FaExp4; FaExp5; FaExp6</i>	Chandler y <i>F. chiloensis</i>
Villarreal y col., 2008	<i>FaPG1</i>	Selva, Camarosa y Toyonoka
Zhou y col, 2015	<i>FaPG1</i>	Sweet Charlie y Toyonoka
Castillejo y col., 2004	<i>FaPE1</i>	Chandler

En dichos estudios se observa que los perfiles de expresión a lo largo de la maduración pueden variar considerablemente entre los distintos cultivares, presentando perfiles de aumento o disminución en la expresión dependiendo del cultivar de que se trate, siendo los perfiles de disminución los menos frecuentes.

Para el caso particular de expansinas (Harrison y col., 2001; Dotto y col., 2006; Figuroa y col., 2009), todos los reportes corresponden a ensayos de Northern-blot. Un hecho consistente en estos reportes es que para todos los cultivares y especies analizadas de *Fragaria*, la expresión del gen *FaExp2* tiende a aumentar con la maduración del fruto, o a lo sumo presentar altos niveles de expresión desde estadios iniciales del proceso de maduración y mantenerlos constantes. Lo mismo no ocurre en *F. vesca*, donde se observó que la expresión del gen *FvExp10* (análogo de *FaExp2*) presentó una elevada expresión en el estadio dos (E2, equivalente a verde grande), para luego disminuir constantemente hacia el final de la maduración del fruto (Fig. 3.2.19). A excepción del gen *FvExp1-like* (análogo de *FaExp5*), el resto de los genes estudiados en *F. vesca* presentó un perfil de disminución en la expresión a nivel de ARNm con la maduración.

Al comparar los niveles de expresión de los genes de los eventos transgénicos con los de los frutos tipo salvaje por estadio, se observó una clara tendencia hacia una mayor expresión en los eventos transgénicos que en los frutos tipo salvaje. Caso contrario a lo reportado en *A. thaliana* (Nardi y col., 2015), en el que la sobreexpresión

del CBM-FaEXP2 en la pared celular resultó en una disminución de algunos genes del metabolismo de la pared (*AtPG*, *Atβ-Gal*, *Atβ-Xyl5*, *AtExp8*, *AtExp5*, *Atα-Ara1*) en las plantas transgénicas comparadas con los controles.

En lo que respecta al análisis de la actividad expansina en el fruto de *F. vesca*, las mediciones se lograron realizar sin ningún inconveniente utilizando el protocolo descrito en el capítulo dos del presente manuscrito (2.1.3.), con la suficiente sensibilidad para analizar la actividad de estas enzimas a lo largo de la maduración de los frutos.

El perfil de actividad de expansina específica de los controles y de los transgénicos fue similar, observándose un aumento continuo con la maduración del fruto, hasta alcanzar el valor máximo en E5 (Fig. 3.2.34). Este perfil de actividad es similar al observado en *Fragaria x ananassa*, descrito en el capítulo uno de este manuscrito (2.2.3.) y en los reportes previos (Harrison y col., 2001). La comparación de la actividad expansina específica de frutos controles o transgénicos en el mismo estadio indicó que estos últimos poseían valores significativamente más bajos en los estadios E4 y E5; incluso el evento CBM5 poseía menor actividad desde el estadio anterior (E3) (Fig. 3.2.34).

Al analizar en conjunto los perfiles de actividad expansina con los perfiles de expresión de los genes de expansina estudiados, sólo se observó una correlación entre el perfil de expresión de *FvExp1-like* (Fig. 3.2.23 y Fig. 3.2.24), que es el único que se incrementa entre los estadios E3-E5, al igual que la actividad expansina específica. Este gen es análogo a *FaExp5* de *Fragaria x ananassa*, cuya expresión es específica del fruto (Harrison y col., 2001; Dotto y col., 2006). Casualmente, en el estadio 3 sólo se encuentran diferencias significativas en el evento CBM5 en ambos estudios, mientras que para los estadios 4 y 5 en ambos casos se observan las mismas diferencias. En *Fragaria x ananassa* se han reportado varios genes de expansina que se expresan en el fruto a lo largo de la maduración (Harrison y col., 2001; Dotto y col., 2006; Figueroa y col., 2009).

De acuerdo a sus niveles de expresión en cultivares de frutilla comercial de firmeza contrastante, se ha correlacionado un mayor ablandamiento del fruto a una expresión mayor, o más temprana, de los genes *FaExp1*, *FaExp2* y *FaExp5* (Dotto y col., 2006). En el caso de *F. vesca*, podría suponerse que el gen *FvExp1-like* (análogo al gen *FaExp5*) contribuye significativamente al ablandamiento del fruto, con el sustento de la correlación positiva entre los perfiles de actividad y los de expresión del gen a nivel de ARNm, y la correlación negativa del resto de los genes de expansina analizados.

De forma similar a lo observado para el caso de actividad expansina, en el análisis de la actividad PG, se observó que los frutos transgénicos presentaron menor actividad que los frutos del tipo salvaje.

Los resultados obtenidos en las determinaciones de actividad expansina y poligalacturonasa se contrapusieron en gran medida con las cuantificaciones relativas de la expresión de los genes analizados. En general, las actividades medidas en los eventos transgénicos resultó ser menor que en los frutos tipo salvaje, mientras que se observó una mayor expresión de los genes a nivel de ARNm en los eventos transgénicos que en los frutos tipo salvaje. Cabría de esperar que un mayor nivel de ARNm se tradujera en una mayor cantidad de proteína y por lo tanto en mayor actividad, pero no fue el caso observado para las enzimas medidas.

En *A. thaliana*, la sobreexpresión de CBM-FaEXP2 en la pared celular vegetal (Nardi y col., 2015), afectó de modo similar la actividad de un conjunto de enzimas relacionadas a la degradación de la pared celular, disminuyendo la actividad de (PG, β -Galactosidasa, β -Xylosidasa y α -Arabinofuranosidasa). Sin embargo, el efecto sobre la expresión fue el opuesto al observado en esta tesis, y la expresión de los genes relacionados (*AtPG*, *At β -Gal*, *At β -Xyl5*, *AtExp8*, *AtExp5* y *At α -Ara1*) fue menor en las plantas transgénicas, lo cual correlaciona con los datos de actividad enzimática (Nardi y col., 2015).

Se ha reportado que el CBM-FaEXP2 tiene la capacidad de disminuir la actividad de enzimas del metabolismo de la pared celular (poligalacturonasa, pectinasa,

endoglucanasa, xilanasa, endoglucanasa), al menos “*in-vitro*” (Nardi y col., 2013). El hecho de que se observe una disminución en la actividad de enzimas de pared tanto en *A. thaliana* como en frutos de *F. vesca*, sugiere que el mismo fenómeno podría ocurrir “*in-vivo*” en plantas sobreexpresantes de un dominio de expansinas.

Actualmente se sabe que las plantas cuentan con complejos mecanismos para mantener la homeostasis de la pared celular vegetal (Höfte, 2015; Wolf y col., 2014; Wolf y col., 2012). Cambios tanto en el metabolismo como en la composición de la pared resultan en la inducción de cambios compensatorios en el propio metabolismo de la pared de modo tal de mantener su homeostasis. Por ejemplo, se ha reportado que en plantas de *A. thaliana* con pectinmetilesterasa (PME) inhibida debido a la sobreexpresión del inhibidor de pectinmetilesterasa (PMEI), se observa un aumento en la vía de señalización de los brasinoesteroides, conocida por desencadenar cambios compensatorios aumentando la expresión de agentes que aumentan la relajación de la pared celular, entre ellos las expansinas y la misma PME (Höfte, 2015; Wolf y col., 2014). En ese caso, la modificación en la expresión de PME se produce como consecuencia, y a modo de compensación, de la pérdida de los puentes de Calcio dada la inhibición de la PME (Wolf y col., 2014; Wolf y col., 2012; Peaucelle y col., 2012).

Los resultados obtenidos en la caracterización de los frutos de *F. vesca* sobreexpresantes de CBM-FaEXP2 se corresponden con un metabolismo de la pared celular alterado, en el que se disminuye la actividad de al menos dos enzimas claves para el metabolismo de la pared, como lo son las expansinas y PG, quedando pendiente la evaluación de otras enzimas de pared tal como PE, β -Gal, β -Xyl, α -Ara y EGasa. El fenómeno reportado es similar al observado en *A. thaliana* sobreexpresantes de PME1 (Wolf y col., 2014 y Wolf y col 2012), en las que también se observa un aumento en la expresión a nivel de ARNm de expansina y PME. Es posible suponer un efecto de compensación similar en los frutos transgénicos de *F. vesca* sobreexpresantes de CBM-FaEXP2.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZACIÓN DEL CBM-FAARA 1

4. Caracterización del CBM-FaARA1

Resumen

Las α -L-arabinofuranosidasas (α -L-AFasas EC 3.2.1.55) son enzimas involucradas en el catabolismo de diversos polisacáridos de la pared celular vegetal, tales como pectinas y hemicelulosas, catalizando la hidrólisis de residuos de α -L-arabinofuranosidos no reductores. Análisis bio-informáticos de las secuencias aminoacídicas de las α -L-arabinofuranosidasas de *Fragaria x ananassa* predicen la presencia de un dominio de unión a carbohidratos de la familia CBM_4_9 en estas proteínas, asociado con afinidad por diversos carbohidratos. En este capítulo se presenta la caracterización del perfil de afinidades del CBM putativo de la enzima α -L-arabinofuranosidasa 1 de *Fragaria x ananassa* (CBM-FaARA1). La secuencia correspondiente al CBM predicho se clonó y expresó en células de *E. coli*. La proteína recombinante resultante se purificó a partir de agregados proteicos (cuerpos de inclusión) por medio de una cromatografía de afinidad al níquel en condiciones desnaturalizantes. La proteína recombinante purificada y replegada se sometió a ensayos de unión a carbohidratos y electroforesis en geles de retardo, encontrándose que la misma posee afinidad por homogalacturonanos y celulosa.

Objetivos

El objetivo de este capítulo fue caracterizar las propiedades de unión a carbohidratos del CBM predicho en la secuencia de la enzima α -L-AFasa 1 de *Fragaria x ananassa*, contribuyendo de esa forma al conocimiento de las α -L-AFasas, miembros de la familia GH51, en un aspecto que aún no había sido caracterizado.

4.1. Materiales y Métodos

4.1.1. Análisis in silico de los CBM de arabinofuranosidasas de *Fragaria x ananassa*

Se llevó a cabo una búsqueda de dominios conservados en las tres proteínas FaARA reportadas para *Fragaria x ananassa* (FaARA1, FaARA2 y FaARA3, números de acceso: ABV08815.1, ABV08816.1 y EF635630.1, respectivamente), usando la base de datos de dominios conservados del sitio NCBI (NCBI Conserved Domains Database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, Marchler-Bauer et al., 2015). Se delimitaron las secuencias de los dominios identificados y se analizaron mediante un alineamiento múltiple realizado con el programa Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Los alineamientos se editaron con el programa JalView 2 (Waterhouse et al., 2009).

4.1.2. Clonado y expresión heteróloga de proteínas recombinantes

Con el objetivo de realizar un análisis comparativo de la capacidad de unión a carbohidratos de los distintos dominios presentes en la enzima α -L-arabinofuranosidasa 1 de *Fragaria x ananassa*, se generaron dos construcciones independientes, diseñadas para la expresión tanto del módulo de unión a carbohidratos (CBM-FaARA1) como del dominio catalítico (DC-FaARA1), identificados en la secuencia de la enzima. También se clonó la secuencia completa de la proteína, para comparar su comportamiento frente a carbohidratos con el propio del CBM-FaARA1.

Las construcciones diseñadas para la expresión heteróloga de las tres proteínas recombinantes se armaron haciendo uso de la tecnología de recombinación GateWay® (Invitrogen™). Las secuencias nucleotídicas de los dominios identificados, así como de la región codificante para la α -L-arabinofuranosidasa 1 de *Fragaria x ananassa* completa se delimitaron y clonaron por PCR haciendo uso de cebadores específicos para cada caso y un plásmido con el ADNc completo del gen *FaAra1* como molde, proveniente de resultados previos del grupo. En las Tablas 4.1.1 y 4.1.2 se detallan las secuencias de los cebadores usados en el clonado de cada construcción. En cada caso, se generó un

vector de entrada mediante una reacción de recombinación BP entre el producto de cada PCR y el plásmido pDONR221 (Invitrogen™) siguiendo las recomendaciones del fabricante de la Clonasa BP. Los clones de expresión se construyeron mediante una reacción de recombinación LR entre cada vector de entrada generado y el plásmido pDEST17 (Invitrogen™), siguiendo las especificaciones del proveedor de la Clonasa LR. Células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformadas con cada clon de expresión se cultivaron en 100 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg mL⁻¹) y cloranfenicol (30 µg mL⁻¹), a 37 °C y con agitación de 200 rpm hasta alcanzar una DO_{600 nm} = 0,5; luego se disminuyó la temperatura del cultivo a 30 °C y agregó IPTG (1 mM final) para inducir la expresión de proteínas recombinantes. El cultivo se mantuvo en esas condiciones durante 4 h. Las células se cosecharon por centrifugación a 8000 x g a 4 °C por 10 min y los pellets se almacenaron a – 80 °C hasta su uso.

Tabla 4.1 Pares de cebadores utilizados en la construcción de los clones de expresión.

<i>Construcción</i>	<i>Cebador</i>	<i>Molde</i>	<i>Amplicón (pb)</i>
<i>CBM-FaARA1</i>	<i>GW-CBM/FL(FaAra1) Fw</i>	<i>ABV08815.1</i>	<i>715</i>
	<i>CBM(FaAra1)-GW Rv</i>		
<i>DC-FaARA1</i>	<i>GW-DC(FaAra1) Fw</i>	<i>ABV08815.1</i>	<i>1180</i>
	<i>DC/FL(FaAra1)-GW Rv</i>		
<i>FL-FaARA1</i>	<i>GW-CBM/FL(FaAra1) Fw</i>	<i>ABV08815.1</i>	<i>2011</i>
	<i>CD/FL(FaAra1)-GW Rv</i>		

Tabla 4.2 Secuencias de los cebadores utilizados en la construcción de los clones de expresión. Secuencias GateWay agregadas para la recombinación específica: en letra negra y cursiva; Codón de stop para bacteria: las tres letras subrayadas en cada cebador anti sentido; Secuencias cebadoras específicas: letras sin adornar.

<i>Cebador</i>	<i>Secuencia 5'=>3'</i>
<i>GW-CBM/FL(FaARA1) Fw</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATCGAGGGCAGAGTTGAAGTCCAAACAGCACAG-3'
<i>CBM(FaARA1)-GW Rv</i>	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAAATGTCCCTTGTACGTGTCCAAAG-3'
<i>GW-CD(FaARA1) Fw</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATCGAGGGCAGAGCCAGAAAAGGGTTGATATGG-3'
<i>CD/FL(FaARA1)-GW Rv</i>	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAGCTAGAAGAGATAGAGGAAG-3'
<i>GW-CBM/FL(FaARA1) Fw</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATCGAGGGCAGAGTTGAAGTCCAAACAGCACAG-3'
<i>CD/FL(FaARA1)-GW Rv</i>	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAGCTAGAAGAGATAGAGGAAG-3'

4.1.3. Purificación de proteínas en condiciones desnaturalizantes

Se aplicó la misma estrategia para todas las proteínas recombinantes. Los pellets de células inducidas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS se resuspendieron en buffer A (Na_2HPO_4 8,0 mM, K_2HPO_4 1,4 mM, NaCl 286,0 mM, KCl 2,6 mM, pH 7,4), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 2,0 mM, DTT (1,4-Dithiothreitol) 0,1 mM y EDTA (ácido etilendiamintetracético) 5,0 mM; en una proporción de 30 mL de buffer A por cada gramo de peso húmedo de pellet de células. La suspensión de células se incubó durante 30 min en hielo y luego se sometió el preparado a 3 ciclos de sonicado en hielo (1 min de sonicado, 1 minuto de descanso) en un equipo Sonics® Vibra-Cell VCX130 PB configurado a un 30% de amplitud. Los lisados se centrifugaron a $10.000 \times g$ y 4°C durante 20 min. El residuo insoluble conteniendo agregados de proteína recombinante (cuerpos de inclusión) se disolvió en buffer B (buffer A suplementado con 1% de SDS [Sodium Dodecyl Sulfate]) y la solución resultante se usó como punto de partida en la purificación de las proteínas recombinantes mediante una cromatografía de afinidad al níquel (NiAC) en condiciones desnaturalizantes. Se siguió el protocolo descrito por Schlager et al. (2012) con mínimas modificaciones. La cromatografía se adaptó a una columna HisTrap HP (GE Healthcare) de 1 mL y a un cromatógrafo Äkta Prime Plus (GE Healthcare). Se usó buffer C (buffer A suplementado con 0,1% p/v de sarkosyl (n-lauroil sarcosinato de sodio) como buffer de lavado y equilibrado y, buffer D (buffer C suplementado con 500 mM de imidazol [1,3-Diazol]) como buffer de elución.

El cromatógrafo utilizado es un FPLC diseñado específicamente para purificación de proteínas. Permite monitorear la cromatografía en tiempo real midiendo la absorbancia a 280 nm, la conductividad de la fase móvil y el porcentaje (%) del buffer B. También viene provisto de un colector automático de fracciones, con lo cual fue sencillo una vez terminada la cromatografía seleccionar aquellas fracciones correspondientes a las proteínas purificadas.

La concentración de la proteína purificada se determinó por medio del método de Bradford usando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar (Bradford, 1976); luego la

solución de proteína se diluyó con buffer Tris-HCl 20 mM, Urea 8,0 M, pH 8,5 hasta una concentración final de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El replegado de la proteína recombinante se llevó a cabo por medio de una diálisis a 4 °C por 18 h contra buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8,0.

4.1.4. SDS-PAGE

La secuencia de purificación de las proteínas recombinantes se analizó por SDS-PAGE y Western blot. Los SDS-PAGEs se realizaron en geles de poliacrilamida al 12% para el caso de la proteína recombinante CBM-FaARA1, y del 10% para el caso de las proteínas RC-FaARA1 y FI-FaARA1, de acuerdo con Laemmli (1970) usando un equipo Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). Los geles se tiñeron con nitrato de plata de acuerdo con Blum et al. (1987).

4.1.5. Western blot

El Western blot se llevó a cabo usando el anticuerpo Penta-His™ Antibody (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Bloqueo

Se colocó la membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas en un recipiente pequeño (con el tamaño justo de la membrana) y se agregó la solución de bloqueo (PBS-T, BSA 5%, aproximadamente 20 mL). Se incubó durante toda la noche a 50 rpm en la cámara fría (4 °C). Se recuperó la solución de bloqueo y se la guardó a -20°C.

Lavado 1

Se hicieron 3 lavados consecutivos con TBS TT (20 ml) durante 10 minutos a 80 rpm. Luego se escurrió bien la solución de lavado y se pasó directamente a la incubación con el anticuerpo primario.

Incubación con anticuerpo primario

En el mismo recipiente en el que se hizo el bloqueo y lavado 1, se agregó la solución del anticuerpo primario, lo suficiente como para cubrir la membrana y se incubó 1 h a temperatura ambiente y 50 rpm. Se recuperó la solución de anticuerpo y se la guardó en freezer (-20) °C inmediatamente.

Lavado 2

Se hicieron 3 lavados consecutivos con TBS TT (20 ml) durante 10 minutos a 80 rpm. Luego se escurrió bien la solución de lavado y se pasó directamente a la incubación con el anticuerpo secundario.

Incubación con anticuerpo secundario.

Se agregó la solución del anticuerpo secundario, lo suficiente como para cubrir la membrana. Se incubó 1 h a temperatura ambiente con agitación a 50 rpm. Se recuperó la solución de anticuerpo, se la congeló y guardó en freezer (-20) °C inmediatamente.

Lavado 3

Se realizaron 4 lavados consecutivos con 20 ml TBS-TT, durante 10 minutos a 80 rpm. Se conservó la membrana sumergida en el último lavado hasta el momento de su revelado por quimioluminiscencia.

Detección

El revelado del western-blot se llevó a cabo mediante una reacción de quimioluminiscencia, seguida de un paso de detección de la señal quimioluminiscente usando el equipo CDGIT (detector de quimioluminiscencia de la empresa LICOR) y el programa asociado, Image Studio Digits ver 5, para generar directamente una imagen digital del western-blot.

En el caso de la reacción de quimioluminiscencia se utilizaron reactivos preparados en el laboratorio, soluciones A y B (ver soluciones empleadas) Se mezclaron partes iguales de las soluciones A y B (solución de detección) y se incubó la membrana con 5 mL de la solución de detección durante 4 minutos. Luego se detectó la señal quimioluminiscente empleando el modo de máxima resolución del detector

Soluciones empleadas

- **PBS (1x)**
NaCl 145 mM;
NaH₂PO₄.H₂O 1,47 mM;
Na₂HPO₄ 8,09 mM;
pH 7,4
Conservar a temperatura ambiente.
- **PBS-T-BSA 5%**
PBS 1x
Tween-20 0,1 % (v/v).
BSA 5% (p/v)
Conservar en freezer a -20 °C.

- **TBS 1 X**
NaCl 150 mM;
Tris 50 mM;
pH 7,4.
Conservar a temperatura ambiente.
- **TBS TT 1 X**
TBS 1x
Tween-20 0,05 % (v/v)
Triton X-100 0,2 % (v/v)
Preparar la cantidad a usar en el momento.
- **Anticuerpo Primario**
Anticuerpo Anti-His, hecho en ratón, monoclonal, Quiagen;
Dilución: 1/5.000 en TBS, BSA 3%.
- **Anticuerpo Secundario**
Anticuerpo Anti-mouse hecho en conejo;
Dilución 1/10.000 en TBS, Leche 10%.
- **Solución de Detección**
Mezcla de las soluciones A y B 1:1 (v:v)
- **Solución A (volumen final 5 ml)**
4,592 ml de H₂O destilada;
333 ul Tris 1,5 M Tris 1,5 M pH 8,8;
25 ul de Cumárico 15 mg/ml DMSO (aprox. 90 mM);
50 ul Luminol 44 mg/ml DMSO (aprox. 250 mM).
- **Solución B (volumen final 5 ml)**
4,662 ml H₂O destilada;
333 ul Tris 1,5 M pH 8,8;
5 ul de H₂O₂ 30%

4.1.6. Caracterización de las propiedades de unión “in vitro”

4.1.6.1. Ensayos de unión a carbohidratos

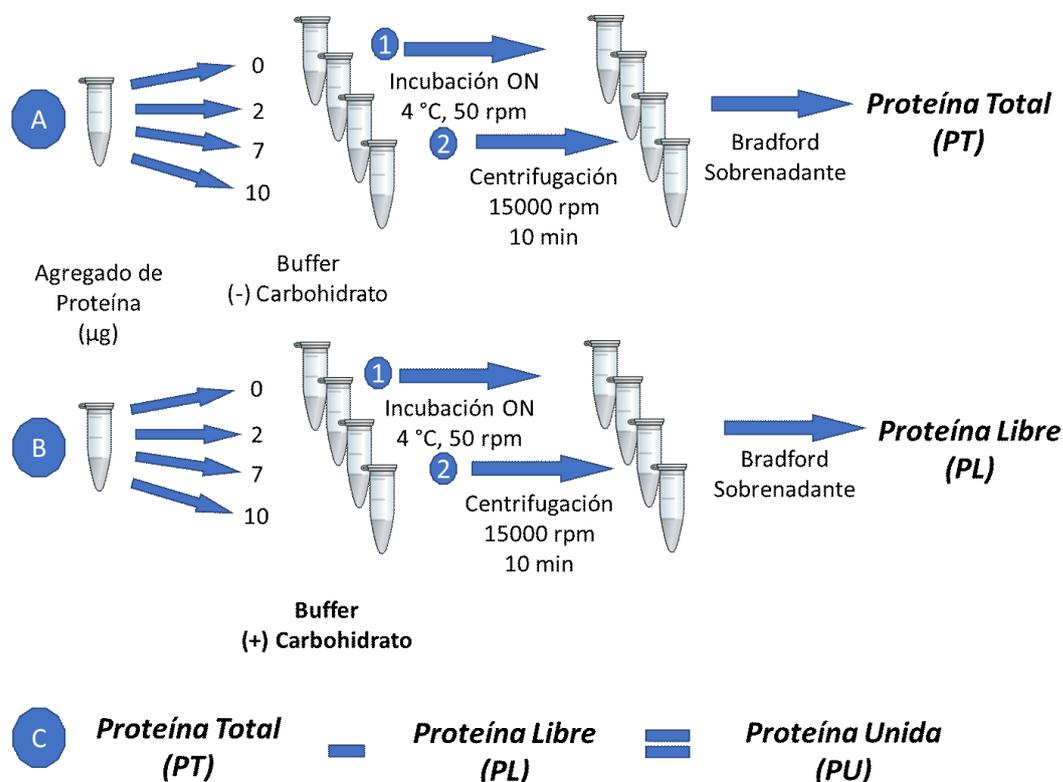
Se estudió la afinidad del CBM-FaARA1 recombinante a diferentes polisacáridos de la pared celular vegetal, de acuerdo con Nardi y col., (2013), con algunas modificaciones. Se usaron los siguientes polisacáridos como sustratos: celulosa microcristalina, xilano de avena, gel de pectato de Calcio, y almidón (incluido cómo un posible control de “no afinidad”).

Se enfrentaron distintas cantidades de proteína recombinante a 2,5 mg de sustrato insoluble en un volumen final de 0,5 mL (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; Fig. 4.1.1. B). Las mezclas se incubaron durante toda la noche a 4 °C y 50 rpm y luego se las centrifugó a 15.000 x g durante 10 min. Se determinó la proteína libre (mg mL⁻¹) en el sobrenadante y se calculó la proteína unida (mg g⁻¹) restando la proteína libre determinada a la proteína total agregada y normalizando por la cantidad de sustrato agregado (Fig. 4.1.1 C). Para determinar la proteína total agregada se repitió el experimento sin

carbohidratos (Fig. 4.1.1. A). Para cada par: CBM-FaARA1/sustrato se construyó una isoterma de adsorción graficando proteína unida (mg g^{-1}) vs proteína libre (mg mL^{-1} ; ver esquema en la Fig. 4.1.1. D), se hizo una regresión lineal simple de la curva obtenida y se calculó, de ser posible, una constante de afinidad aparente a partir de la pendiente de la regresión resultante.

Se generó pectato de calcio de modo tal de obtener un sustrato insoluble compatible con el ensayo propuesto, tratando ácido poligalacturónico con CaCl_2 . Se agregaron $20 \mu\text{L}$ de una solución de CaCl_2 500 mM a $500 \mu\text{L}$ de solución de ácido poligalacturónico (APL, 5 mg mL^{-1}) en buffer acético/acetato 50 mM, pH 4,5. Las mezclas se homogeneizaron, incubaron a temperatura ambiente por 30 min y luego el gel insoluble se separó de la suspensión por centrifugación (2 min a $15.000 \times g$).

Todos los sustratos se lavaron y equilibraron con buffer tris-HCl 20 mM pH 8,0 previo su uso. En el caso de residuo insoluble del pectato de calcio, el gel se disgregó con pipeta de modo tal de formar una suspensión homogénea.



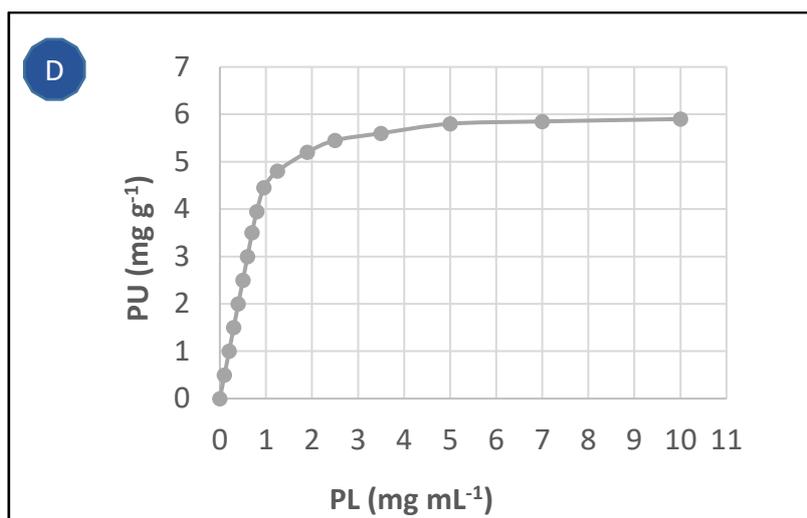


Fig. 4.1.1. Esquema del diseño de un ensayo de unión a carbohidratos.

4.1.6.2. Electroforesis en geles de retardo

Se hizo una estimación de la afinidad de CBM-FaARA1 a carboximetil celulosa, pectina de citrus, xilanos y almidón haciendo uso de la técnica de electroforesis en geles de retardo. El protocolo usado se adaptó del propio descrito por Tomme et al., (2000). Se llevaron a cabo electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% (p/v) en condiciones nativas a pH 8,7 (ver tabla 4.3), en ausencia o presencia de carbohidratos a una concentración final del 0,1% (p/v). La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente a amperaje constante (15 mAmp por gel) por el lapso de 2 h, utilizando 50 mM Tris – 25 mM Ác. Bórico pH 8,7 como buffer de corrida; tres réplicas para cada condición. Se destaca que siempre se corrieron simultáneamente una condición a ensayar y un control sin carbohidratos en el gel.

Se usó anhidrasa carbónica como referencia de una proteína carente de afinidad por carbohidratos. Los geles se tiñeron con nitrato de plata para detectar las bandas de proteína (Blum et al., 1987). Una vez teñidos, se tomaron fotografías digitales de los geles y se midió la migración (distancia recorrida desde la siembra en el gel) del CBM-FaARA1 y de la anhidrasa carbónica haciendo uso del programa *ImageJ* (Schneider et al., 2012), y se calculó la movilidad de la proteína recombinante relativa a la de la proteína de referencia para cada condición.

Tabla 4.3. Composiciones de los geles

<i>Reactivo (mL)</i>	Gel Control	Electroforesis en gel de Afinidad
<i>% Carbohidrato</i>	0,0	0,1
<i>Sc. Carbohidrato 0,5 %</i>	0,0	2,0
<i>H₂O</i>	6,0	4,0
<i>Acril-bis 30-0,8</i>	2,0	2,0
<i>Buffer Corrida 5X</i>	2,0	2,0

4.1.7. Estabilización de la proteína recombinante

4.1.7.1. Hidrólisis térmica de ácido poligalacturónico

La hidrólisis térmica del ácido poligalacturónico (APG) se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito en Diaz et al. (2007), con el objetivo de obtener fracciones hidrolizadas con polímeros de distintos tamaños para ser usados en el ensayo de estabilidad de la proteína recombinante (ver sección 4.1.6.3.). Soluciones de APG al 1% (p/v), pH 4,5 se calentaron a 95 °C durante 1, 2, 3, 4 y 5 h; luego las muestras hidrolizadas (hAPG1 a hAPG5) se enfriaron en hielo y guardaron a 4 °C hasta el momento de su uso.

4.1.7.2. Determinación de extremos reductores

Se usó el contenido en azúcares reductores como una estimación del grado de hidrólisis de cada muestra. La determinación se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito en Diaz et al. (2007); 100 µL de reactivo de cobre (NaCl 23,3 % p/v, acetato de sodio 5,4% p/v, CuSO₄.5H₂O 0,5 % p/v, pH 4,8) se añadieron a 100 µL de cada muestra hidrolizada, como se describió en el punto anterior. Se incubaron las muestras a 100 °C durante 15 min previo al agregado de 0,8 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (dilución en agua destilada 1:40). Se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se midió la absorbancia a 750 nm. Se construyó una curva de calibración usando ácido galacturónico (AG) como patrón de referencia. El contenido de azúcares reductores de cada muestra se expresó como nmol de ácido galacturónico por µL.

4.1.7.3. Replegado por dilución directa en presencia o ausencia de estabilizantes

Un stock de CBM-FaARA1 recombinante, de concentración 920 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y purificada en condiciones desnaturalizantes (ver sección 4.1.3), se sometió a una dilución directa 1:10 en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0 ó buffer acético/acetato 50 mM pH 4,5 en presencia de APG (0,5% p/V, concentración final). Se realizó la misma dilución a pH 4,5 en presencia de distintos hidrolizados de ácido poligalacturónico (hAPG1 to hAPG5, 0,5% p/v concentración final) o de correspondiente monómero (ácido galacturónico 5% p/v concentración final). Las mezclas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente (tiempo necesario para que se de el fenómeno de agregación de la proteína recombinante en ausencia de estabilizantes) y luego se centrifugaron a 15.000 x g durante 2 min para separar posibles agregados proteicos. Finalmente, se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante de cada mezcla por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizó una dilución directa del stock de proteína purificado manteniendo las condiciones desnaturalizantes como un control de no agregación (0% de pérdida de proteína debido a agregación) y se calculó el porcentaje de pérdida de proteína luego del proceso de renaturalización por dilución directa relativo a ese valor de referencia. Se hicieron diluciones directas en ausencia de agentes estabilizantes tanto a pH 8,0 como a pH 4,5 como controles sin estabilización. Cada condición fue analizada por triplicado.

4.1.8. Efecto del CBM-FaARA1 sobre la actividad “in vitro” de enzimas del metabolismo de pectinas

4.1.8.1. Medida de actividad pectinasa

La actividad pectinasa se evaluó usando un extracto comercial realizado a partir de *Aspergillus niger* (PEctinex 3XL[®], Sigma-Aldrich). El extracto comercial se utilizó en una concentración final de 0,0125% (v/v) y se determinó la actividad enzimática usando como sustrato tanto PGA 0,3% (p/v) como pectinas de citrus 0,3% (p/v) disueltas en buffer acético/acetato 0,05 M, pH 6,0. Las mezclas de reacción se incubaron durante 0,

20, 40 y 60 min a 37 °C, midiéndose a cada tiempo la cantidad de ácido galacturónico liberado según el protocolo descrito en la sección 4.1.6.2. Se expresó la actividad pectinasa como nmol de ácido galacturónico liberado por min y por µg de proteína presentes en el extracto.

4.1.8.2. Extracción y medida de actividad de PG de tomate

La metodología utilizada para la estimación de la actividad PG total se adaptó de Nogata y col. (1993). Diez gramos de frutos de tomate congelados (estadio rojo maduro) se homogeneizaron con 30 mL de buffer acetato de sodio/ácido acético 0,05 M, PVPP 1% p/v, pH 6,0. La mezcla se centrifugó a 12.000 x g durante 30 min y se descartó el sobrenadante. El residuo sólido se lavó con 30 mL de acetato de sodio/ácido acético 0,05 M, pH 6,0 y luego se centrifugó a 12.000 x g durante 30 min. Se descartó el sobrenadante y el paso de lavado se repitió una vez más. El residuo sólido resultante del segundo lavado se extrajo con 20 mL de acetato de sodio/ácido acético 0,05 M (pH 6,0), NaCl 1 M con agitación a 4 °C durante 3 h. Se centrifugó a 12.000 x g durante 30 min y se dializó el sobrenadante durante 14 h contra 20 volúmenes de solución de acetato de sodio/ácido acético 0,05 M, pH 6,0. El extracto dializado se utilizó para la determinación de la actividad poligalacturonasa total (tanto endo como exo). Se preparó una mezcla de reacción conteniendo 700 µL de ácido poligalacturónico o pectina de citrus (0,3% p/v) disuelto/a en buffer acetato de sodio/ácido acético 0,05 M (pH 6,0) y 700 µL de extracto. La cinética se llevó a cabo a 37 °C, se tomaron alícuotas a los 0, 20, 40 y 60 min y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido para interrumpir la reacción. Se cuantificó el ácido galacturónico liberado de acuerdo al método descrito en la sección 4.1.6.2. Se realizó una curva de calibración utilizando cantidades variables de ácido galacturónico 1 mM (Fluka). La actividad PG se expresó como nmol de ácido galacturónico liberado por min y por µg de proteína.

4.1.8.3. Extracción y medida de actividad de PME de tomate

Frutos congelados de tomate en estadio rojo maduro (10 g) se homogeneizaron en un Omni-Mixer (OCI Instruments) con 30 mL de NaCl 1 M, PVPP 1% p/v como solución de extracción. La mezcla se incubó durante 4 h a 4 °C con agitación y posteriormente se centrifugó a 12.000 x g durante 30 min. Se descartó el sólido y el pH de la solución se ajustó a 7,5 con NaOH 2 M. El extracto resultante se utilizó para determinar la actividad PME espectrofotométricamente (Hagerman y Austin, 1986). La mezcla de reacción contuvo 600 µL de pectinas de citrus (Sigma) 1% p/v (pH 7,5), 150 µL de azul de bromotimol 0,01% p/v en solución de fosfato de potasio 0,003 M (pH 7,5) y 100 µL de extracto. La cinética se realizó a 37 °C, monitoreando el cambio en la absorbancia a 620 nm cada 30 s durante 5 min. Como consecuencia de la hidrólisis del enlace éster se genera metanol, y el C-6 presente en los residuos de ácido galacturónico de las pectinas se transforma en un grupo carboxilo. La disociación de este grupo carboxilo genera protones que producen un descenso en el pH del medio de reacción, el cual es responsable del viraje del indicador. Por su parte, el viraje del indicador (desde el azul hacia el amarillo) hace que la absorbancia a 620 nm descienda. Se preparó una curva de calibración con cantidades variables de ácido D(+)-galacturónico 1 mM (Fluka). La actividad PME se expresó como nmol de ácido galacturónico liberado por min y por µg de proteína.

El efecto del CBM-FaARA1 sobre las actividades Pectinasa, PG y PME se evaluó agregando 40 µg de la proteína recombinante a la solución de sustrato previo al agregado del extracto enzimático. Se hicieron dos controles: el primero para detectar posibles interferencias producto de la presencia del buffer desnaturizante utilizado en la purificación de la proteína recombinante. En tal caso, se reemplazó un volumen de proteína recombinante por un volumen equivalente de buffer desnaturizante. El segundo control se hizo con el objetivo de determinar posible actividad en la proteína recombinante. En tal caso, para cada medida de actividad se prepararon mezclas de

reacción reemplazando el volumen de extracto enzimático por un volumen equivalente del mismo buffer en el cual se hallaba disuelto el extracto proteico.

4.1.9. Cuantificación de proteínas

Todas las determinaciones de concentración de proteínas se llevaron a cabo por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando albúmina de suero bobino (BSA, bovine serum albumin) como patrón de referencia. Los resultados se expresaron como mg mL^{-1} para el caso particular de los ensayos de unión a carbohidrato y como $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el resto de los ensayos.

4.1.10. Análisis de datos

Los datos correspondientes a los ensayos de unión a carbohidratos se analizaron por ANOVA para evaluar la bondad de ajuste de las regresiones lineales. El test-t se utilizó para determinar la relevancia estadística de las pendientes calculadas para cada caso ($p < 0,05$). Para las electroforesis de afinidad en geles de retardo (ver sección 4.1.5), la estabilización de la proteína recombinante (sección 4.1.6) y el efecto del CBM-FaARA1 sobre la actividad “in vitro” de enzimas del metabolismo de la pared celular (sección 4.1.7) los datos se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon con un test de Tukey ($p < 0,05$).

4.2. Resultados

4.2.1. Análisis in silico de las proteínas FaARA

Se realizó una búsqueda de dominios putativos presentes en las secuencias proteicas de las tres α -L-arabinofuranosidasas descritas en *Fragaria x ananassa* (Rosli y col., 2009), utilizando la base de datos de dominios conservados del sitio NCBI (NCBI-CDD; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, Marchler-Bauer y col., al., 2015). Se encontró que las tres proteínas presentan la arquitectura típica de las α -L-AFasas de la familia de las glicosil hidrolasas GH51, la cual consiste en un péptido tránsito en el extremo N-terminal, seguido por un CBM putativo y finalmente un dominio α -L-AF catalítico en el extremo C-terminal de cada proteína (Fig. 4.2.1). Cabe destacar que el gen codificante para la proteína FaARA3 presenta un codón de finalización de la transcripción prematuro, lo cual daría lugar a una proteína truncada con un dominio α -L-AFasa más corto (Fig. 4.2.1). El alineamiento múltiple de las tres secuencias proteicas muestra un alto porcentaje de similitud entre las tres proteínas, variando entre un 97% y un 98% para las proteínas completas (Fig. 4.2.2).

Existe más de un 99% de identidad entre los tres dominios CBM predichos en las tres proteínas FaARAs. CBM-FaARA1 es 100% idéntico a CBM-FaARA3, mientras que CBM-FaARA2 es un 99,3% idéntico a los otros dos, presentando una mutación en la posición 140 dónde una valina presente en CBM-FaARA1 y CBM-FaARA3 es reemplazada por un residuo de ácido glutámico (Fig. 4.2.1).

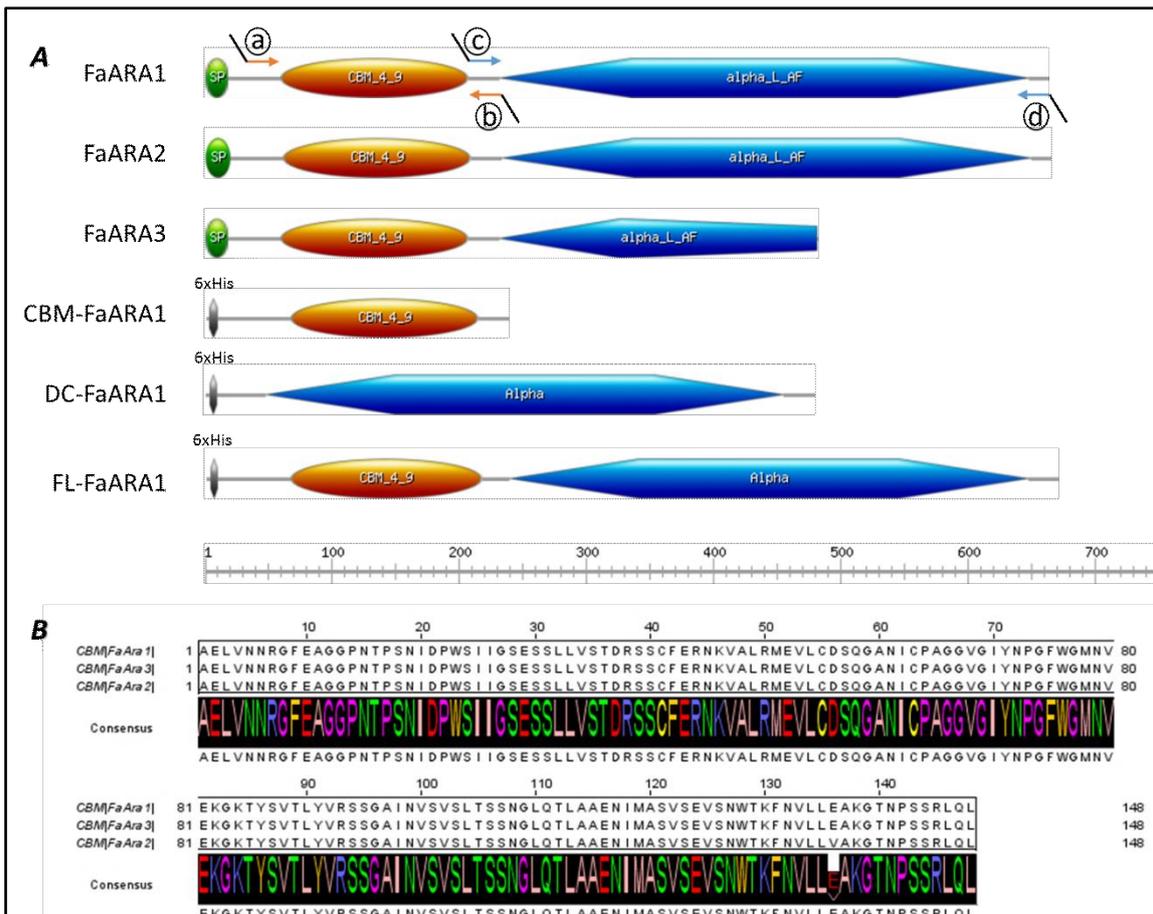


Fig. 4.2.1. A) Representación esquemática de las tres proteínas FaARA y de las proteínas recombinantes CBM-FaARA1; DC-FaARA1 y FL-FaARA1. SP: péptido tránsito (signal peptide); CBM_{4_9}: módulo de unión a carbohidratos PF02018; Alpha-L-AF: dominio α -L-arabinofuranosidasa; 6xHis: cola de histidina para purificación por afinidad al níquel; Escala: longitud de la cadena proteica en amino ácidos. Las flechas (a, b, c y d) indican las regiones sobre las cuales se realizó el diseño de los cebadores utilizados en el clonado de las distintas construcciones: a) *GW-CBM/FL(FaAra1) Fw*; b) *CBM(FaAra1)-GW Rv*; c) *DC(FaAra1) Fw*; d) *GW-DC/FL(FaAra1)-GW Rv*.

Delimitación de las zonas de cada proteína: FaARA1: SP, 1-18; CBM: 60-207; alpha-L-AF: 232-647; *FaARA2*: SP, 1-20; CBM, 62-209; alpha-L-AF, 234-649; *FaARA3*: SP, 1-18; CBM, 60-207; alpha-L-AF 232-481.

B) Alineamiento de las secuencias de los tres dominios CBM predichos en las tres proteínas FaARA. Las secuencias codificantes para el CBM se identificaron usando la base de datos de dominios conservados del sitio NCBI. El alineamiento se realizó usando el programa Clustal omega y se editó con JalView2.

4.2.2. Clonado, expresión y purificación del CBM-FaARA1 recombinante

Dado el alto porcentaje de similitud entre las secuencias aminoacídicas de los CBM putativos de las proteínas FaARA, se decidió clonar sólo el presente en FaARA1. Se generaron dos constructos de acuerdo a lo descrito en la sección 4.1.2; un clon de entrada, pDONR221[CBM-FaARA1] y un clon de expresión pDEST17[CBM-FaARA1], que codifica para una proteína CBM-FaARA1 recombinante con una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal, lo cual permite la purificación de la proteína por medio de una cromatografía de afinidad al níquel (Fig. 4.2.1). El constructo de expresión se transformó en células competentes de *E. coli* BL21(DE3) plysS y luego se llevó a cabo la expresión de la proteína recombinante. La proteína se expresó en las células de *E. coli* como agregados proteicos insolubles también conocidos como cuerpos de inclusión (Fig. 4.2.3). Estos cuerpos insolubles se aislaron de las células bacterianas, se solubilizaron haciendo uso SDS como agente desnaturizante, y luego se sometieron a una cromatografía de afinidad al níquel en presencia de un agente desnaturizante más suave (sarkosyl) para desplazar al SDS. El CBM-FaARA1 recombinante eluyó como un único pico al 40% del gradiente del buffer de elución, correspondiente a una concentración de imidazol de 200 mM (Fig. 4.2.4). A fines de obtener la proteína en forma nativa o replegada, se ensayaron diversas condiciones experimentales. La proteína desnaturizada purificada demostró ser propensa a agregarse durante la eliminación de los agentes desnaturizantes (sarkosyl, restos de SDS) a fines de facilitar el proceso de replegado, haciendo difícil la obtención de proteína nativa soluble. La concentración inicial de proteína, así como el pH del buffer utilizado en su renaturalización fueron factores determinantes del proceso, siendo particularmente difícil la obtención de proteína soluble cuando el proceso de replegado se llevaba a cabo a concentraciones de proteína superiores a los 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y/o pH inferior a 8,0.

Se ensayaron distintas técnicas de replegado, tales como dilución directa de la proteína desnaturizada, replegado en columna haciendo uso de la afinidad de la

proteína recombinante al níquel, así como también el uso de distintos agentes estabilizantes como glicerol, sacarosa y urea con el fin de aumentar los rendimientos en proteína soluble luego del proceso de replegado. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron cuando la proteína purificada en condiciones desnaturizantes primero se diluía a una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ con un buffer tris-HCl 20 mM pH 8,5, urea 8 M y luego se dializaba contra un buffer tris-HCl 20 mM pH 8,0 para eliminar los agentes desnaturizantes. Luego de ese proceso fue posible obtener proteína soluble en una concentración máxima de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

La expresión, purificación y replegado de las proteínas recombinantes se siguió por SDS-PAGE y western blot, utilizando un anticuerpo contra la etiqueta de poli-His (Fig. 4.2.5).

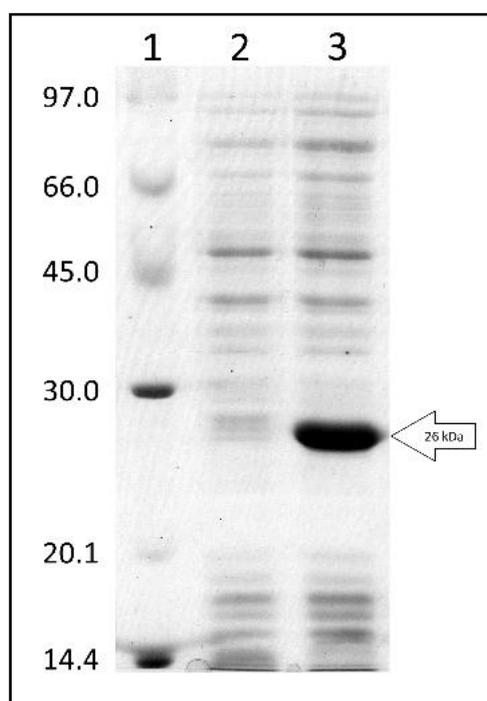


Fig. 4.2.3. Evaluación por SDS-PAGE de la solubilidad de la proteína recombinante luego de su expresión en células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS. 1) Marcador de peso molecular (kDa); 2) proteína soluble de un cultivo inducido de *E. coli* transformadas; 3) proteína total de un cultivo inducido de células de *E. coli* transformadas. La banda correspondiente a la proteína recombinante CBM-FaARA1 se indica con una flecha.

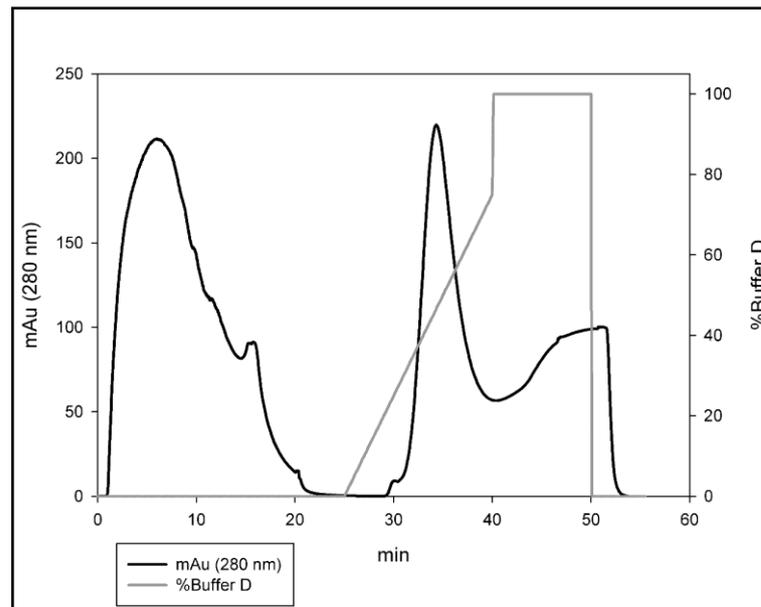


Fig. 4.2.4. Cromatografía de afinidad al níquel (NiAC). Curva negra: absorbancia a 280 nm. Curva gris: gradiente del buffer de elución (% Buffer D). Fracción no retenida: 0-20 min; elución de la proteína recombinante: 32-40 min. Buffer de lavado y equilibrado (buffer C): Na_2HPO_4 8,0 mM; K_2HPO_4 1,4 mM; NaCl 286,0 mM; KCl 2,6 mM, sarkosyl 0,1% p/v, pH 7,4. Buffer de elución (buffer D): buffer C suplementado con 500 mM imidazol.

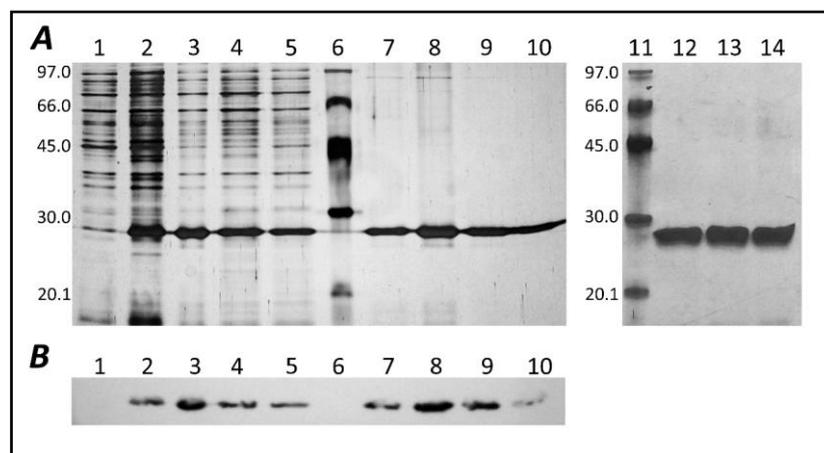


Fig. 4.2.5. A) Análisis de las fracciones obtenidas durante la purificación de CBM-FaARA mediante SDS-PAGE. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 12%, y se hizo una tinción con nitrato de plata. B) Western blot con anticuerpo contra la etiqueta de poli-His (Penta-His™ Antibody, QIAGEN). 1) Células de *E. coli* sin inducir; 2) Células de *E. coli* inducidas; 3) Cuerpos de inclusión pre-aislados y desnaturalizados; 4) NiAC, fracción no retenida 1; 5) NiAC Fracción no retenida 2; 6) y 11) Marcador de masa molecular (20,1-97 kDa); 7) NiAC, fracción eluída (fracción 1); 8) NiAC, fracción eluída (fracción 2); 9) NiAC, fracción eluída (fracción 3); 10) NiAC, fracción eluída (fracción 4); 12-14) Réplicas independientes de proteína recombinante replugada.

Si bien se consiguieron expresar y replegar satisfactoriamente las tres proteínas recombinantes, solo se completó la caracterización de las propiedades de unión de la proteína CBM-FaARA1, quedando aún pendientes la finalización de las caracterizaciones de las proteínas DC-FaARA1 y FL-FaARA1. A continuación se muestran los esquemas de purificación de las tres proteínas recombinantes, seguidos por SDS-PAGE (Figs. 4.2.6 y 4.2.7).

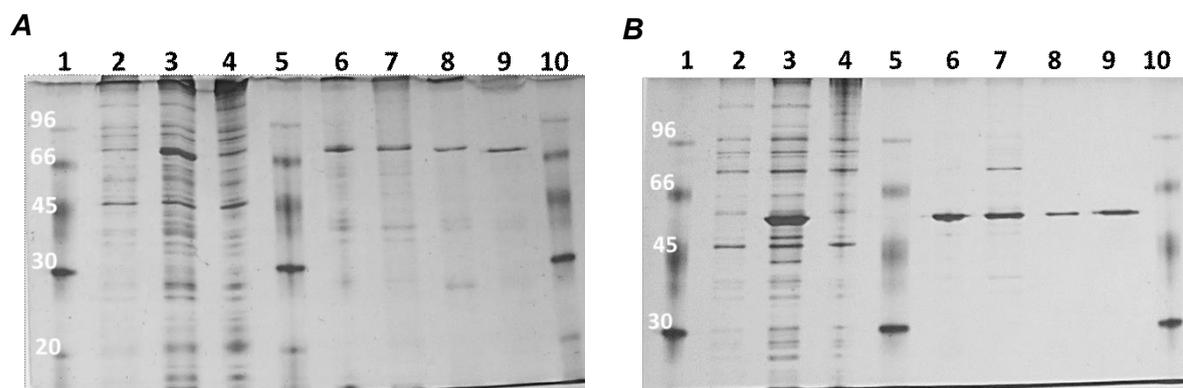


Fig. 4.2.6. A) Análisis de las fracciones obtenidas durante la purificación de FL-FaARA mediante SDS-PAGE. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 12%, y se hizo una tinción con nitrato de plata. B) Análisis de las fracciones obtenidas durante la purificación de DC-FaARA1 mediante SDS-PAGE. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10%, y se hizo una tinción con nitrato de plata. El orden de las muestras sembradas en ambos geles es el mismo: 1, 5 y 10) Marcador de masa molecular (20,1-97 kDa); 2) Células de *E. coli* sin inducir; 3) Células de *E. coli* inducidas; 4) NiAC, fracción no retenida; 6) NiAC, fracción eluida 1; 7) NiAC, fracción eluida 2); 9) NiAC, fracción eluida 3); 10) NiAC, fracción eluida 4.

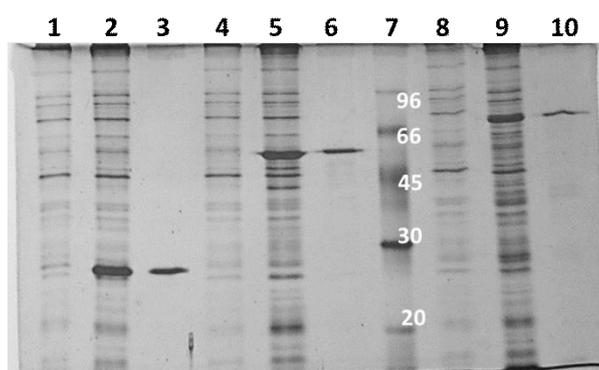


Fig. 4.2.7. Análisis comparativo mediante SDS-PAGE de las tres proteínas recombinantes. Gel de poliacrilamida al 12%; tinción con nitrato de plata. 1, 2 y 3 corresponden a muestras de la construcción CBM-FaARA1; 4, 5 y 6 corresponden a muestras de la construcción DC-FaARA1; 7: marcador de peso molecular (20,1-97 kDa); 8, 9 y 10 corresponden a muestras de la construcción FL-FaARA1. 1, 4 y 8: Células de *E. coli* sin inducir; 2, 5 y 9: Células de *E. coli* inducidas; 3, 6 y 10: replegados purificados de CBM-FaARA1, DC-FaARA1 y FL-FaARA1, respectivamente.

4.2.3. Caracterización de las propiedades de unión del CBM-FaARA1 recombinante

4.2.3.1. Ensayos de unión a carbohidratos

Los ensayos de unión realizados en la presente tesis doctoral se usaron para determinar la afinidad de la proteína CBM-FaARA1 recombinante a diferentes carbohidratos insolubles, a fines de validar la predicción hecha con el servidor NCBI-CDD de la presencia de un módulo de unión a carbohidratos en la proteína FaARA1. Las propiedades de unión de la proteína recombinante se ensayaron frente a tres polisacáridos de la pared celular vegetal (homogalacturonanos [APG], celulosa microcristalina y xilanos de cebada). Se incluyó al almidón en los ensayos como un posible control de no afinidad, teniendo presente su ausencia en la pared celular vegetal. Asimismo, se usó albúmina de suero bobino para cada sustrato ensayado como control de una proteína sin afinidad por carbohidratos (Fig. 4.2.8). Se hicieron regresiones lineales de cada isoterma de adsorción construida para cada combinación proteína/sustrato y se las sometió a un ANOVA para evaluar la bondad del ajuste de cada una de las regresiones.

De todas las condiciones estudiadas sólo las isotermas de absorción para la proteína recombinante CBM-FaARA1 con homogalacturonano y celulosa microcristalina mostraron regresiones lineales simples con relevancia estadística. La diferencia entre las pendientes calculadas para cada una de ellas también resultó ser estadísticamente significativa, mostrando una afinidad mayor de la proteína recombinante por homogalacturonanos ($K_{ad} = 795,41 \text{ mL g}^{-1}$) que a celulosa microcristalina ($K_{ad} = 17,93 \text{ mL g}^{-1}$). Los diagramas de dispersión correspondientes a las isotermas de adsorción de la proteína recombinante frente a xilanos de avena y almidón presentaron un comportamiento errático centrado en el 0 mg de proteína unida por g de sustrato, interpretándose que la unión de la proteína recombinante por estos sustratos es demasiado baja como para ser medida con precisión. Tampoco se obtuvo relevancia estadística en el ajuste de este comportamiento por medio de regresiones lineales.

Para todas las isotermas de adsorción de BSA, los datos presentaron un comportamiento errático centrado en el valor cero de proteína unida (datos no mostrados), comportamiento que no puede ser ajustado mediante una regresión lineal simple. Para estos casos también se interpreta que la afinidad de la BSA por los distintos sustratos es demasiado baja como para ser medida por el método empleado.

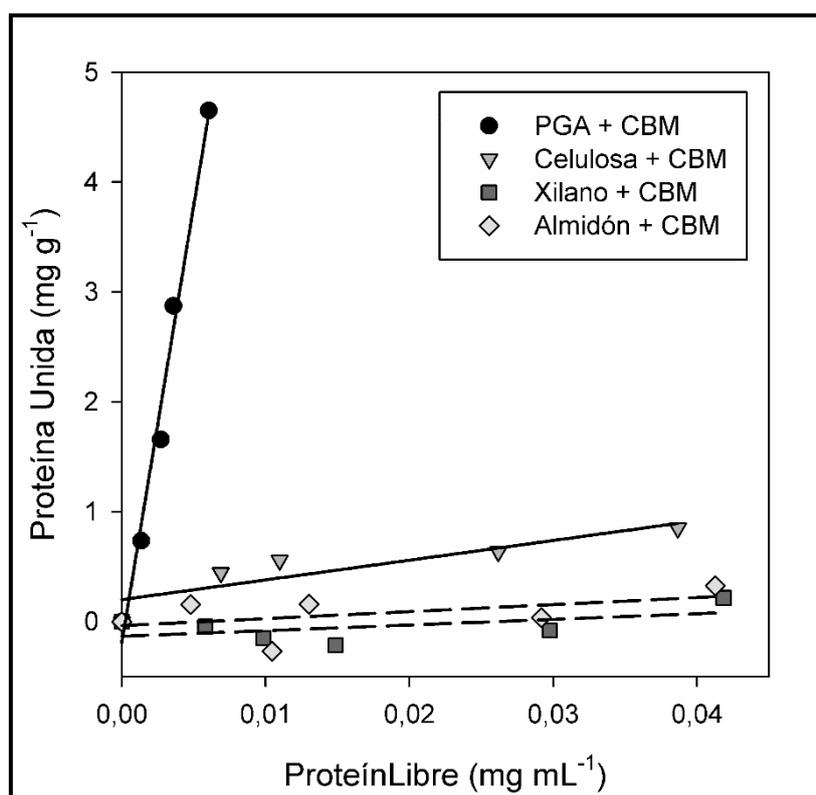


Fig. 4.2.8. Isotermas de adsorción de CBM-FaARA1 purificada a almidón, xilanos de cebada, homogalacturonano y celulosa microcristalina. Las isotermas de adsorción con comportamiento lineal (líneas llenas) indican un equilibrio en la distribución entre fase sólida (proteína unida) y la fase líquida (proteína libre) a distintas concentraciones de proteína; la pendiente de cada isoterma representa un valor de K_{ad} . PGA + CBM: $y = 795.41x - 0.19$, $R^2 = 0,9854$; Celulosa + CBM: $y = 17.93 + 0.20x$, $R^2 = 0,7906$.

4.2.3.2. Electroforesis en geles de retardo

La electroforesis en geles de retardo se usa comúnmente para evaluar la afinidad de una proteína a un sustrato soluble. En este caso se empleó la técnica para evaluar la capacidad de unión de la proteína CBM-FaARA1 recombinante a carboximetil celulosa, xilano de cebada, pectina de citrus y almidón soluble. Se usó anhidrasa

carbónica como referencia, siendo ésta una proteína cuya movilidad no se ve afectada por la presencia de carbohidratos en el gel. CBM-FaARA1 mostró una movilidad relativa significativamente menor en los casos en los que el gel contenía carboximetil celulosa o pectina de citrus, mientras que la movilidad relativa de la proteína no se vio afectada por la presencia de xilano de cebada o almidón (Fig. 4.2.9). No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó la movilidad relativa de la proteína recombinante en geles sin carbohidratos (controles) o geles en los cuales se embebió xilanos de avena o almidón (Fig. 4.2.9).

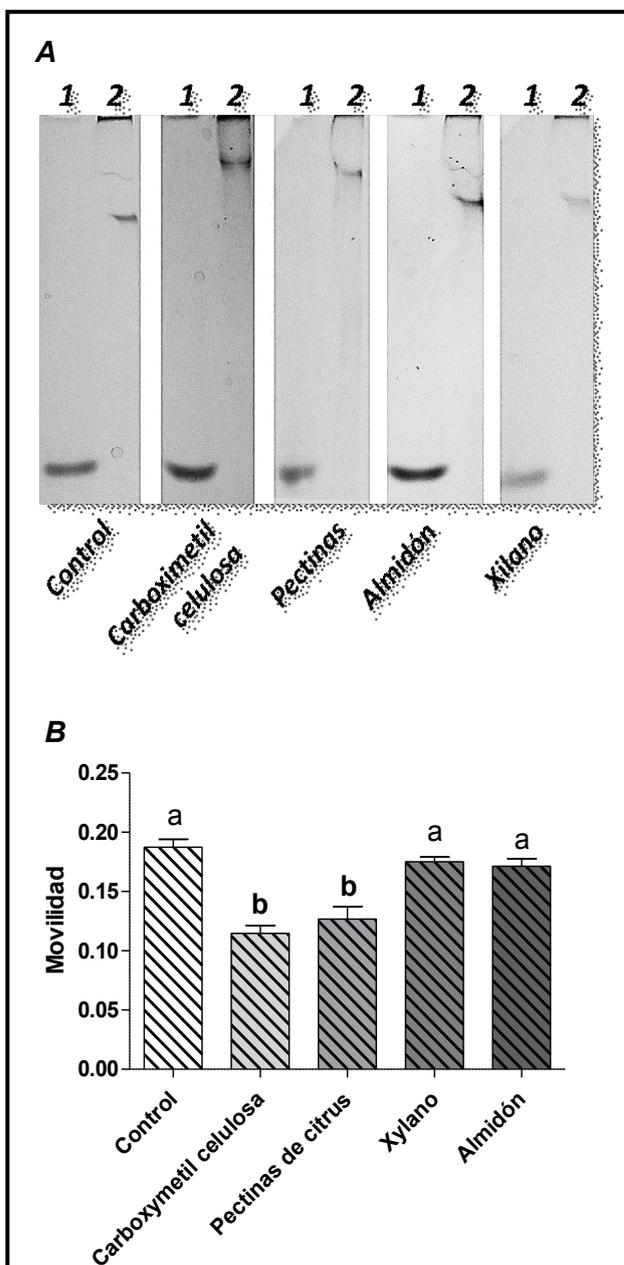


Fig. 4.2.9. A) Ejemplos de geles de retardo en los que se muestra al CBM-FaARA1 frente a distintos polisacáridos. 1. Anhidrasa carbónica; 2. CBM-FaARA1. B) Movilidad del CBM-FaARA1 relativa a la correspondiente de la anhidrasa carbónica. Los resultados fueron sometidos a ANOVA y las medias se compararon con el test de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias significativas.

4.2.4. Estabilización de la proteína recombinante

Como se mencionó anteriormente, la proteína recombinante CBM-FaARA1 demostró ser propensa a la agregación durante el proceso de renaturalización, dificultando la obtención de proteína soluble en concentraciones superiores a los 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a pH 8,0. El fenómeno de agregación incluso se observó al cambiar mediante diálisis el pH del medio de la solución de la proteína replegada y estable de pH 8,0 a pH 4,5.

Dada la afinidad de la proteína recombinante por APG, se ensayó a este carbohidrato como posible agente estabilizante en el proceso de renaturalización de la proteína recombinante. Se eligió la dilución directa como técnica de replegado de proteínas para este ensayo por su simpleza y por ser un método rápido para replegar proteínas (Eiberle y Jungbauer, 2010; Gautam, 2012).

Para determinar si el tamaño del PGA estaba involucrado en el fenómeno de estabilización, se sometió al polímero a una hidrólisis térmica por 5 h previo a su uso como agente estabilizante, tomando muestras del hidrolizado cada hora del proceso (fracciones hAPG1 a hAPG5). Se siguió el proceso de hidrólisis midiendo el contenido de azúcares reductores en cada muestra hidrolizada, graficando los valores expresados como nmol de AG por microlitro ($\text{nmol } \mu\text{L}^{-1}$) versus el tiempo de hidrólisis (Fig. 4.2.10). El proceso mostró una respuesta lineal, con casi la ruptura de un enlace por hora ($y = 0,9018 x + 0,2290$).

No se observó una pérdida de proteína significativa a pH 8,0 o 4,5 cuando APG 0,5% (p/v) estaba presente en el buffer de replegado, comparando con el control de no agregación (proteína diluida en condiciones desnaturalizantes; Fig. 4.2.11).

Las 5 fracciones hidrolizadas de APG se analizaron como agentes estabilizantes a pH 4,5, así como también ácido galacturónico, representante de una muestra completamente hidrolizada del polímero. No se observaron pérdidas significativas de proteína recombinante cuando los tres primeros hidrolizados de APG (hAPG1 a hAPG3) estaban presentes en el buffer de replegado. La pérdida de proteína debido a

agregación aumentó significativamente cuando APG se hidrolizó por más de tres horas (hAPG4, pérdida de un 33%; hAPG5, pérdida de un 64%), siendo la pérdida de proteína observada para el caso de hAPG5 como estabilizante comparable a la observada con el control de sin estabilizantes a pH 8,0. La mayor pérdida de proteína se observó para el caso en el que AG se usó como agente estabilizante, obteniéndose los mismos resultados que para el control sin estabilizantes a pH 4,5 (Fig. 4.2.11).

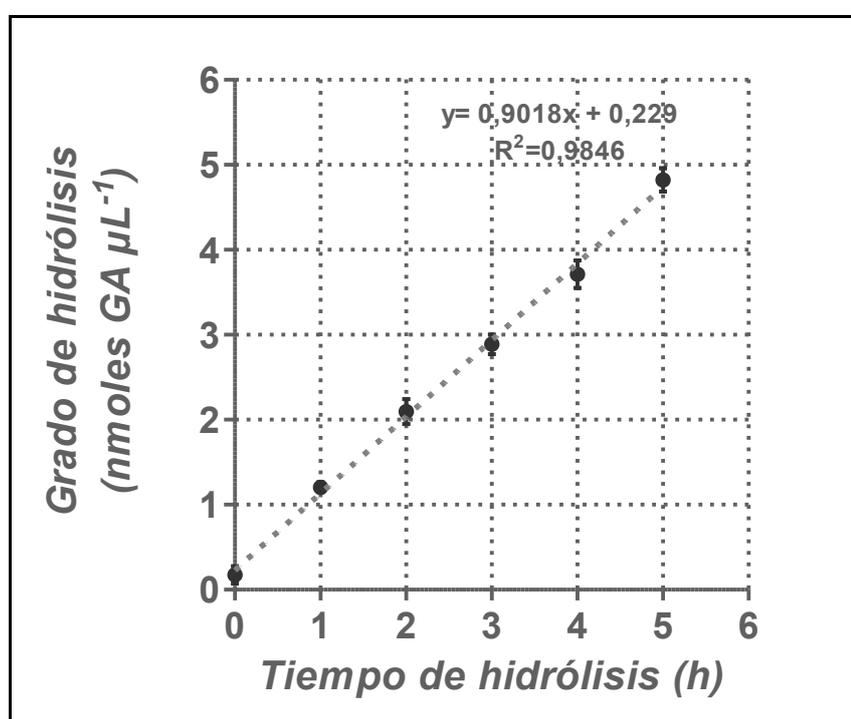


Fig. 4.2.10. Contenido de azúcares reductores. Se realizó una hidrólisis térmica de PGA en condiciones ácidas. Se tomaron muestras del hidrolizado a cada hora por un tiempo total de 5 h (fracciones hPGA1 a hPGA5). El contenido de azúcares reductores, expresado como nmol de ácido galacturónico (GA, galacturonic acid) por micro litro ($\text{nmol } \mu\text{L}^{-1}$), se midió en cada muestra y se graficó vs el tiempo de hidrólisis. Los resultados se ajustaron a una regresión lineal simple ($y = 0,9018 x + 0,2290$; $R^2 = 0,9846$)

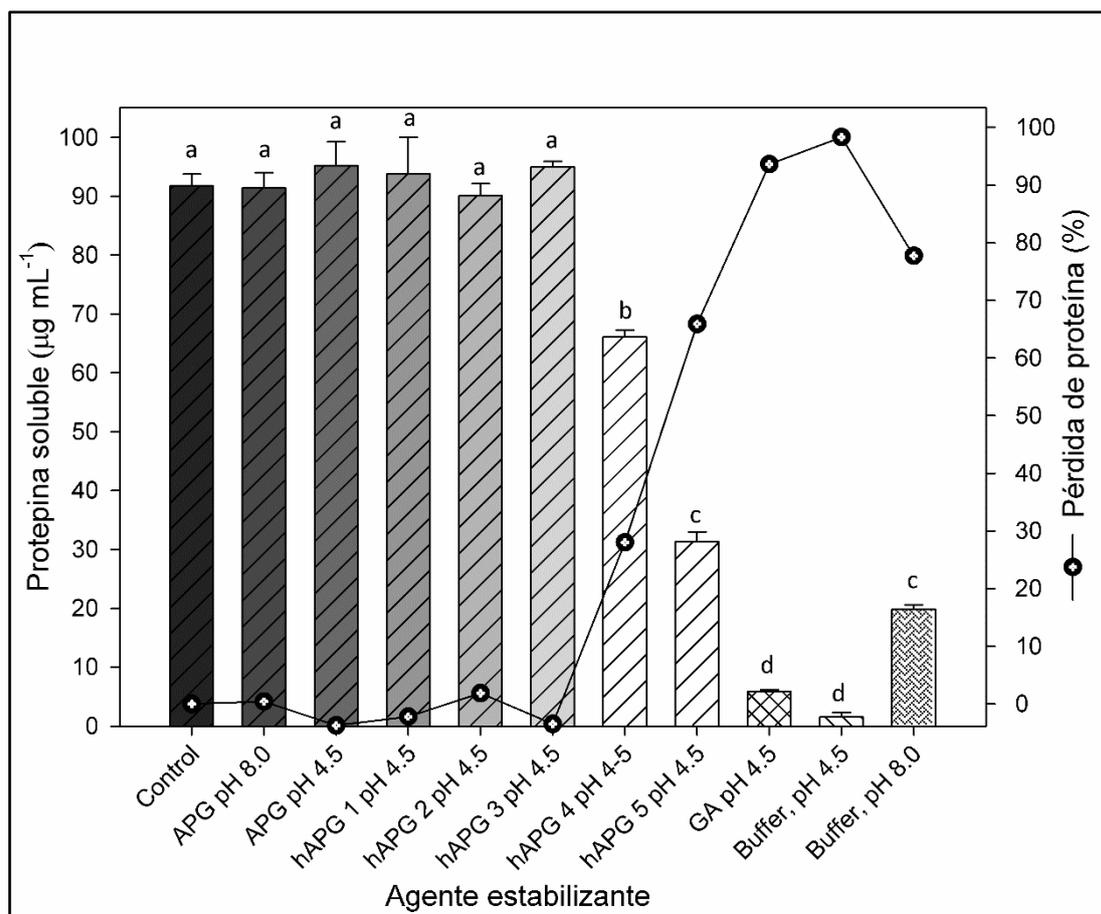


Fig. 4.2.11. Estabilización de la proteína recombinante en el proceso de plegado en presencia de distintos agentes estabilizantes. APG y sus fracciones hidrolizadas (hAPG1 a hAPG5) se ensayaron como agentes estabilizantes, así como también ácido galacturónico. Las barras corresponden las medias de concentración de proteína soluble ($\mu\text{g mL}^{-1}$) luego del proceso de plegado de la proteína recombinante. Las barras de error representan el error estándar. Los círculos representan la pérdida de proteína (%) para cada condición ensayada luego del plegado. Los datos se sometieron a ANOVA y las medias se compararon con el test de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias significativas.

4.2.5. Efecto del CBM-FaARA1 sobre enzimas del metabolismo de pectinas

Se evaluó el efecto del CBM-FaARA1 recombinante sobre la actividad de enzimas asociadas al metabolismo de pectinas: una pectinasa comercial (Pectinex, SigmaAldrich), poligalacturonasa (PG) y pectina metil-esterasa (PME), donde estas últimas dos enzimas fueron extraídas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig, estadio maduro). Las actividades pectinasa y PG se evaluaron utilizando tanto pectinas de citrus como APG como sustratos, mientras que para la actividad PME se utilizaron únicamente pectinas de citrus. En el caso de PG, con ambos sustratos se observaron

diferencias significativas en la actividad enzimática cuando el CBM-FaARA1 estaba presente en la mezcla de reacción. Independientemente del sustrato, la actividad PG se incrementó aproximadamente 4 veces en presencia de CBM-FaARA1 (Fig. 4.2.12). Asimismo, no se detectó actividad PG en el CBM-FaARA1 (Fig. 4.2.12).

En el caso de pectinasa, la presencia del CBM-FaARA1 en la mezcla de reacción también incrementó significativamente la actividad, aproximadamente 2,9 y 0,3 veces cuando se utilizó pectina de citrus y APG, respectivamente, como sustratos (Fig. 4.2.13).

Finalmente, se analizó el efecto de CBM-FaARA1 sobre la actividad PME de tomate, utilizando pectina de citrus como sustrato. No se observaron diferencias significativas en la actividad PME en presencia del CBM-FaARA1, en comparación con la actividad de la enzima en ausencia de la proteína recombinante. Asimismo, no se detectó actividad PME en el CBM-FaARA1 (Fig. 4.2.14).

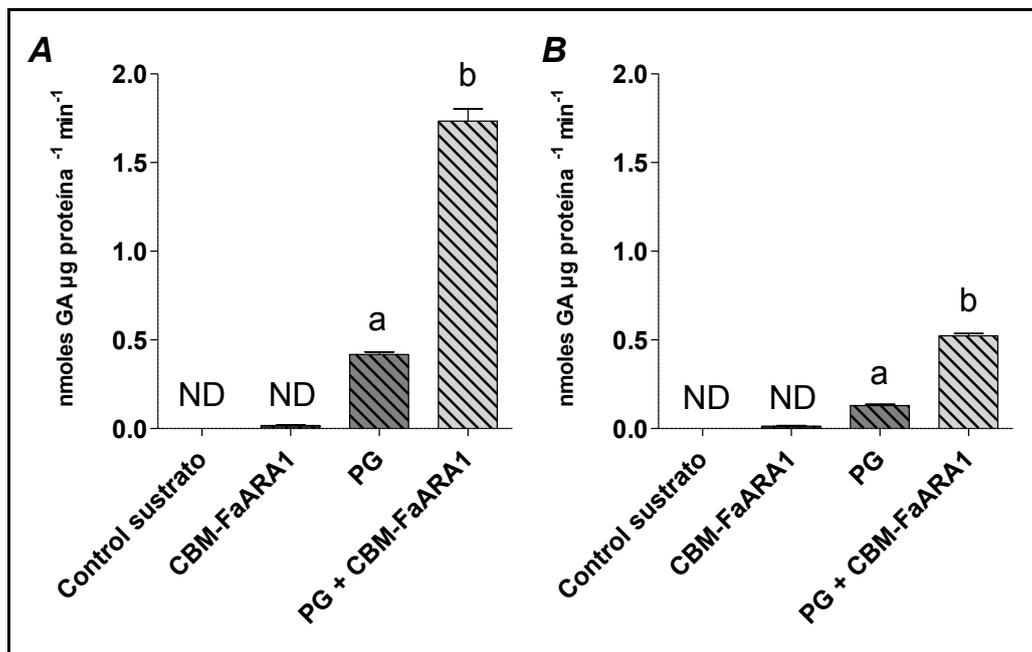


Fig. 4.2.12. A) Actividad PG usando pectina de citrus como sustrato. B) Actividad PG usando PGA como sustrato. Los resultados corresponden a las medias \pm error estándar de tres determinaciones independientes. Los mismos se analizaron por ANOVA y las medias se compararon con el test de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias significativas. ND: no detectado.

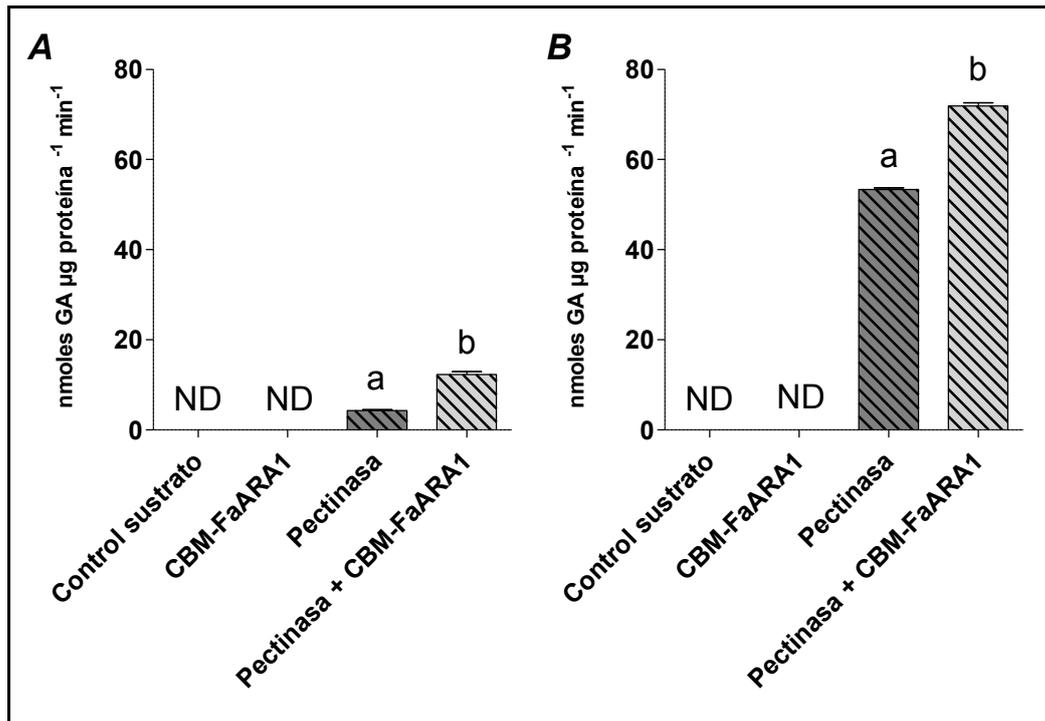


Fig. 4.2.13. A) Actividad pectinasa usando pectina de citrus como sustrato. B) Actividad pectinasa usando PGA como sustrato. Los resultados corresponden a las medias \pm error estándar de tres determinaciones independientes. Los mismos se analizaron por ANOVA y las medias se compararon con el test de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias significativas. ND: no detectado.

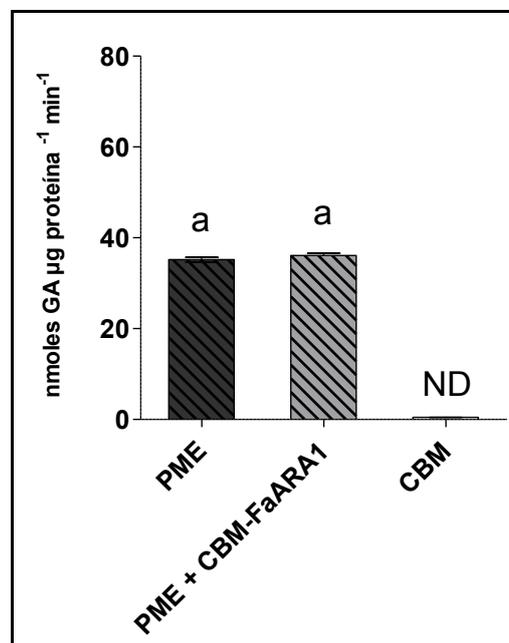


Fig. 4.2.14. Efecto de CBM-FaARA1 sobre la actividad PME de tomate. El sustrato utilizado fue pectina de citrus. Los resultados corresponden a las medias \pm error estándar de tres determinaciones independientes. Los mismos se analizaron por ANOVA y las medias se compararon con el test de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias significativas. ND: no detectado.

4.3. Discusión

Se ha reportado que las α -L-arabinofuranosidasas (α -L-AFasas; EC 3.2.1.55) tienen roles de importancia en el desarrollo de plantas (Fulton y Cobbett, 2003) y en la ontogenia y ablandamiento de frutos (Sozzi et al., 2002; Tateishi, 2008). Se las encuentra en varias familias de glicosil hidrolasas (GH2, 3, 43, 51, 54, 62) y se las ha incluido en diferentes familias de módulos de unión a carbohidratos (1, 2, 3, 6, 13, 22, 35, 42 y aún no clasificados {NC}) de acuerdo a la base de datos CAZy (Lombard et al., 2014). Dentro de esta diversidad de familias puede encontrarse un amplio espectro de afinidades a carbohidratos (celulosa, xilanos, arabinoxilanos, arabinosa, arabinanos) (Ichinose et al., 2008; Miyanaga et al., 2006, 2004; Ribeiro et al., 2010).

En el caso de frutilla (*Fragaria x ananassa*), se han reportado tres genes de α -L-arabinofuranosidasas, y se han caracterizado sus perfiles de expresión y la actividad enzimática total durante la maduración del fruto (Rosli et al., 2009). Este es el primer reporte que describe las propiedades de un CBM proveniente de una α -L-AFasa de una planta, así como también el primero en describir el comportamiento de un CBM perteneciente a una proteína de la familia GH51. Se predijo que la proteína recombinante codifica un CBM de la familia CBM_4_9 (PF02018). A la fecha, hay 93 secuencias listadas en la familia PF02018 que corresponden a la arquitectura de α -L-AFasas de la familia GH51, de las cuales el 5,4% (5 secuencias) provienen de Eucariotas, mientras que el otro 94,6% (88 secuencias) provienen de proteínas de bacterias. Independientemente de su origen, la identificación de la mayoría de los CBM en estas proteínas se ha llevado a cabo por medio de análisis bioinformáticos basados en la similitud secuencial, más que en determinaciones experimentales de la capacidad de unión a carbohidratos de las proteínas.

Se logró clonar y expresar satisfactoriamente la proteína recombinante CBM-FaARA1 en células de *E. coli*. Como se mencionó anteriormente, la proteína

recombinante se expresó en las células bacterianas en la forma de agregados proteicos insolubles, mejor conocidos como cuerpos de inclusión, siendo necesario un paso de desnaturalización previo a la purificación y replegado de la proteína de interés. Se adaptó el protocolo descrito por Schlager et al. (2012) para la purificación de la proteína recombinante, con la diferencia de que se agregó un paso de aislamiento de los cuerpos de inclusión previo a la cromatografía de afinidad. El agregado de este paso permitió mejorar el rendimiento y la pureza del producto final. La proteína purificada en condiciones desnaturalizantes presentó una alta tendencia a agregarse, un fenómeno frecuente cuando se trabaja con proteínas recombinantes obtenidas en células de *E. coli* en la forma de cuerpos de inclusión (Gautam, 2012; Yamaguchi et al., 2013). La obtención de la proteína soluble, en ausencia de agentes estabilizantes, fue muy difícil cuando el proceso de replegado se hacía a concentraciones de proteína superiores a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ a pH 8,0. El mismo fenómeno se observó cuando la proteína replegada en esas condiciones se dializaba para cambiar el pH del medio de 8,0 a 4,5. Los mejores resultados con respecto a la renaturalización de la proteína recombinante se obtuvieron usando diálisis como técnica de replegado. Sin embargo, fue necesario acondicionar la proteína purificada de modo de obtener un proceso de replegado exitoso. Las condiciones desnaturalizantes (SDS, Sarkosyl) utilizadas en la cromatografía se modificaron primero por el pasaje a un buffer del mismo pH conteniendo urea 8 M, de modo tal de inducir la disociación de las moléculas de detergente de la proteína recombinante, así como también ajustar la concentración de la proteína a un valor que permitiera su posterior renaturalización por diálisis. Esta inestabilidad de la proteína recombinante fue el principal motivo por el cual los ensayos de unión a carbohidratos se hicieron a pH 8,0 y con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ como la concentración máxima de proteína.

El punto isoeléctrico (PI) calculado para la proteína FaARA1 es de 5,0, y se predice que la proteína es secretada al apoplasto, dónde el pH fisiológico es 4,5. En esta condición, tanto FaARA1 como la recombinante CBM-FaARA1 (PI 6,52) estarían

cargadas positivamente. La situación opuesta se tiene a pH 8,0, correspondiente al pH en el que se llevaron a cabo los ensayos de unión a carbohidratos. Por lo tanto, en las condiciones del ensayo, tanto el CBM-FaARA1 como el homogalacturonano estarían cargados negativamente, por lo cual la interacción entre ambos no sería de naturaleza electrostática, lo que sugiere que otro tipo de fuerzas intermoleculares estarían involucradas. Lo mismo podría aplicarse a la interacción de la proteína con un sustrato sin carga como la celulosa. Existen reportes de ensayos de unión llevados a cabo a pHs alcalinos (Georgelis et al., 2011). Se ha sugerido también que la capacidad de unión de un CBM a su sustrato puede atribuirse, al menos en parte, a diversos residuos aromáticos que constituyen la superficie hidrofóbica del módulo (Shoseyov et al., 2006), siendo entonces las interacciones hidrofóbicas una de las fuerzas responsables de la asociación de un CBM a su sustrato.

Los resultados de los ensayos de unión a carbohidratos muestran que la proteína recombinante CBM-FaARA1 posee alta afinidad por homogalacturonanos, sin embargo, se observó que la proteína también es capaz de asociarse a celulosa microcristalina, aunque con una afinidad significativamente menor (Fig. 4.2.5). Este fenómeno sugiere que el CBM presente en la proteína FaARA1 sería en cierta medida promiscuo, siendo capaz de reconocer más de un sustrato. La promiscuidad de sustrato por parte de un CBM ha sido reportada para otros CBM (Nardi et al., 2013; Obembe et al., 2007).

Existe evidencia experimental que sugiere que las pectinas se encuentran asociadas en una mezcla compleja de homogalacturonanos, rhamnogalacturonanos de tipo I y rhamnogalacturonanos de tipo II (Vincken et al., 2003). El polisacárido rhamnogalacturonano II, particularmente, es una cadena carbonada de homogalacturonano con diversos grupos laterales, algunos de los cuales presentan residuos de arabinofuranosa. Es posible entonces que la asociación de una α -L-AFasa con homogalacturonano a través de su CBM, provea acceso a residuos terminales de arabinofuranosa asociados a otros polisacáridos o glicoproteínas de la pared celular vegetal.

Así como para cualquier fenómeno de adsorción, para un CBM una isoterma de adsorción típica presenta un comportamiento lineal a bajas concentraciones de proteína y una meseta o plateau una vez que el sustrato se satura. En nuestro caso, la concentración máxima de proteína empleada en los ensayos de unión probablemente haya sido demasiado baja como para alcanzar el punto de saturación de los sustratos.

El análisis de la movilidad relativa realizado por medio de electroforesis en geles de retardo, conteniendo diferentes polisacáridos embebidos en la matriz de acrilamida, contribuyó a la caracterización de las propiedades de unión de la proteína recombinante. Los resultados se condicen con las conclusiones obtenidas a raíz de los ensayos de unión a carbohidratos.

Dada la alta afinidad de la proteína recombinante por homogalacturonano, se decidió evaluar si este carbohidrato podía ser usado como un agente estabilizante en el proceso del replegado de la proteína. El agregado de compuestos que estabilicen a la forma nativa de una proteína al buffer de replegado, tal como cofactores o incluso sustratos, suele usarse con frecuencia como estrategia para sobrellevar las dificultades inherentes al proceso, disminuyendo en forma considerable el agregado de la proteína de interés (Eiberle y Jungbauer, 2010; Gautam, 2012). El polisacárido homogalacturonano demostró ser un buen agente estabilizante, permitiendo realizar el replegado de la proteína recombinante incluso a pH 4,5 y a concentraciones de proteína tan altas como $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, sin pérdidas significativas en la concentración de proteína soluble debido a la agregación. A este pH se tuvo un incremento de 60 veces en la concentración de proteína soluble comparado a la misma condición, pero sin el agente estabilizante. El pH ácido o alcalino (pH 4,5 – pH 8,0) no pareciera interferir en la estabilización de la proteína en presencia del carbohidrato, lo cual sugiere que la carga de la proteína no sería relevante en este proceso. Esto mismo también podría indicar que la capacidad de unión del CBM al homogalacturonano no está sujeta a la carga de la proteína. El APG tiene un $\text{pKa} \sim 3$, por lo que en todas las condiciones ensayadas presentó carga negativa, mientras que la proteína recombinante ($\text{PI}=6.52$) presentó

carga negativa a pH 8,0 y carga positiva a pH 4,5. Las tres primeras fracciones del hidrolizado del homogalacturonano (hAPG1 a hAPG3) también probaron ser buenos agentes estabilizantes en el proceso de replegado, sin embargo, el efecto estabilizante se pierde gradualmente cuando la hidrólisis del polímero supera las 3 h (hAPG4 y hAPG5), perdiéndose por completo en el caso extremo en el que se usó el monómero (ácido galacturónico) en el buffer de replegado. El hecho de que el fenómeno se pierda con el avance de la hidrólisis del polímero indica que el tamaño del mismo es relevante, existiendo un mínimo de estructura necesario para que el CBM reconozca y se una a este carbohidrato.

Teniendo en cuenta la capacidad del homogalacturonano de unir y estabilizar a la proteína recombinante “*in vitro*”, sería interesante analizar el posible rol “*in vivo*” de estos polisacáridos en la estabilización de α -L-AFasas en la pared celular vegetal.

Respecto a la influencia de CBM-FaARA1 sobre la actividad de enzimas intervinientes en el metabolismo de pectinas, se analizó su influencia sobre PG, PME, y una pectinasa comercial. La caracterización de CBM presentes en enzimas del metabolismo de la pared celular ha estado centrada, en general, al análisis de sus propiedades de unión, y existen escasos antecedentes respecto a la influencia sobre la actividad enzimática. Se presenta una diferencia marcada al efecto del otro CBM que se ha estudiado en el grupo. A diferencia del CBM-FaEXP2, que disminuía la actividad “*in vitro*” de las enzimas, en este caso el CBM-FaARA1 tiende a aumentar la actividad de PG y pectinasa, mientras que no afectó la actividad PME. La presencia del CBM, probablemente a través de la unión CBM-sustrato, facilita el accionar de PG y pectinasa, pero no el de PME. Sin embargo, es necesario profundizar el estudio del fenómeno para intentar dilucidar en que forma el CBM está ejerciendo su efecto sobre la actividad enzimática.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5. Conclusiones y Perspectivas

5.1 Conclusiones

Se logró adoptar la técnica de medida de crecimiento ácido y actividad expansina al uso de un texturómetro comercial, aumentando la posibilidad de que más grupos de investigación alrededor del mundo puedan estudiar estos fenómenos. La técnica adaptada demostró ser lo suficientemente precisa como para analizar el proceso de ablandamiento en frutilla, y probablemente en otros frutos. Asimismo, permitió caracterizar el efecto de la sobreexpresión del CBM-FaEXP2 en la pared celular sobre la actividad expansina de frutos transformados de *F. vesca* cv H4, en distintos estadios de maduración.

En lo que respecta a la sobreexpresión del CBM-FaEXP2 en la pared celular del fruto de *F. vesca* cv H4, se concluye que la expresión de la proteína recombinante fue capaz de modificar el metabolismo de la pared, reduciendo la actividad de expansina y poligalacturonasa durante la maduración, lo cual redundó en una mayor firmeza de los frutos transgénicos. La estrategia de sobreexpresar un CBM de expansina en la pared celular se constituye, entonces, en otra herramienta posible para ser utilizada a fines de retrasar el ablandamiento y extender la vida poscosecha de un fruto. Los resultados correspondientes a la expresión a nivel de ARNm y actividades enzimáticas, sugieren la existencia de un mecanismo de compensación para mantener la homeostasis del metabolismo de la pared, ante la menor actividad de enzimas clave de su metabolismo.

En cuanto al análisis del CBM putativo proveniente de la enzima FaARA1, se comprobó la capacidad de unión a carbohidratos del módulo predicho bioinformáticamente, presentando la proteína recombinante una alta afinidad por homogalacturonano. La proteína también probó ser capaz de modificar, al menos *in-vitro*, la actividad de enzimas de pared, observándose un aumento en la actividad de enzimas asociadas al metabolismo de pectinas, fenómeno inverso al observado en trabajos previos del grupo con el CBM-FaEXP2.

5.2. Perspectivas

Si bien el protocolo de medición de actividad expansina adaptado al texturómetro comercial nos permitió analizar la maduración de frutos desde el punto de vista de esta actividad, queda pendiente evaluar la posibilidad de aumentar la sensibilidad de la técnica, ya sea tanto modificando la capacidad de carga del instrumento, como utilizando matrices sintéticas de carbohidratos (mayor homogeneidad en el sustrato).

En lo que respecta a la sobreexpresión del CBM-FaEXP2 en *F. vesca* cv H4, el material vegetal disponible podría ser utilizado para extender el análisis de expresión y actividades enzimáticas a otros genes relacionados al metabolismo de la pared celular, que no fueron incluidos en este estudio. Desde un punto de vista de aplicación, el próximo paso sería conducir dicha sobreexpresión con un promotor específico del fruto y dependiente del grado de madurez, preferentemente en un cultivo de relevancia comercial como *Fragaria x ananassa*.

En cuanto al CBM-FaARA1, sus propiedades de unión y efecto sobre enzimas del metabolismo de pectinas, muy distintas a las descritas para el CBM-FaEXP2, hacen de este CBM un candidato atractivo a ser evaluado *in-vivo*, analizando cómo afectaría al metabolismo de la pared celular su sobreexpresión en la pared, pudiendo usar como modelos tanto *A. thaliana* como *F. vesca*. También sería interesante lograr dilucidar el mecanismo mediante el cual este módulo es capaz de aumentar la actividad de las enzimas PG y pectinasa en la hidrólisis de pectinas y homogalacturonano.

REFERENCIAS

6. Referencias

- Abeles, F.B., Takeda, F., 1990. Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 42, 269-275. doi:10.1016/0304-4238(90)90050-O
- Adams-Phillips, L., Barry, C., Giovannoni, J., 2004. Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends Plant Sci.* 9, 331-338. doi:10.1016/j.tplants.2004.05.004
- Alsheikh, M., Suso, H.P., Robson, M., Battey, N., Wetten, A., 2002. Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic-sensitive *Fragaria vesca* and *F. v. semperflorans*. *Plant Cell Rep.* 20, 1173-1180. doi:10.1007/s00299-002-0453-0
- Amaya I., Pilet J., Folta K., 2016. *Methods and Protocols: Plant Signal Transduction*, Chapter 4 (Editors: Botella J.R. and Botella M.A.; Humana Press).
- Balasubramaniam, S., Lee, H.C., Lazan, H., Othman, R., Ali, Z.M., 2005. Purification and properties of a β -galactosidase from carambola fruit with significant activity towards cell wall polysaccharides. *Phytochemistry* 66, 153-163. doi:10.1016/j.phytochem.2004.11.005
- Barry, C.S., McQuinn, R.P., Thompson, A.J., Seymour, G.B., Grierson, D., J., G.J., 2005. Ethylene Insensitivity Conferred by the Green-ripe and Never-ripe 2 Ripening Mutants of Tomato. *Plant Physiol.* 138, 267-275. doi:10.1104/pp.104.057745
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99. doi:10.1002/elps.1150080203
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J., 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* 382, 769-781. doi:10.1042/BJ20040892
- Boraston, A.B., Kwan, E., Chiu, P., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., 2003. Recognition and hydrolysis of noncrystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* 278, 6120-6127. doi:10.1074/jbc.M209554200
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brummell, D.A., 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct. Plant Biol.* 33, 103-119. doi:10.1071/FP05234
- Brummell, D. a., Harpster, M.H., 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47, 311-340. doi:10.1023/A:1010656104304
- Brummell, D., Harpster, M., Civello, P., Palys, J., Bennett, A., Dunsmuir, P., 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* 11, 2203-2216. doi:10.1105/tpc.11.11.2203
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1-30. doi:10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x
- Carvalho, C.C., Phan, N.N., Chen, Y., Reilly, P.J., 2015. Carbohydrate-binding module tribes. *Biopolymers* 103, 203-214. doi:10.1002/bip.22584

- Castillejo, C., De La Fuente, J.I., Iannetta, P., Botella, M. Ángel, Valpuesta, V., 2004. Pectin esterase gene family in strawberry fruit: Study of FaPE1, a ripening-specific isoform. *J. Exp. Bot.* 55, 909-918. doi:10.1093/jxb/erh102
- Chavez Montes, R.A., Ranocha, P., Martinez, Y., Minic, Z., Jouanin, L., Marquis, M., Saulnier, L., Fulton, L.M., Cobbett, C.S., Bitton, F., Renou, J.-P., Jauneau, A., Goffner, D., 2008. Cell Wall Modifications in Arabidopsis Plants with Altered α -L-Arabinofuranosidase Activity. *Plant Physiol.* 147, 63-77. doi:10.1104/pp.107.110023
- Civello, P.M., 1999. An Expansin Gene Expressed in Ripening Strawberry Fruit. *Plant Physiol.* 121, 1273-1279. doi:10.1104/pp.121.4.1273
- Cosgrove, D.J., 2015. Plant expansins: Diversity and interactions with plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.* 25, 162-172. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.014
- Cosgrove, D.J., 2011. Measuring In Vitro Extensibility of Growing Plant Cell Walls, en: *The Plant Cell Wall: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* pp. 291-303. doi:10.1007/978-1-61779-008-9
- Cosgrove, D.J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 850-861. doi:10.1038/nrm1746
- Cosgrove, D.J., 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407, 321-326. doi:10.1038/35030000
- Cosgrove, D.J., 1989. Characterization on long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta* 177, 121-130.
- Cosgrove, D.J., Li, L.C., Cho, H.T., Hoffmann-Benning, S., Moore, R.C., Blecker, D., 2002. The growing world of expansins. *Plant Cell Physiol.* 43, 1436-1444. doi:10.1093/pcp/pcf180
- d'Amour, J., Gosselin, C., Arul, J., Castaigne, F., Willemot, C., 1993. Gamma-Radiation Affects Cell Wall Composition of Strawberries. *J. Food Sci.* 58, 182-185. doi:10.1111/j.1365-2621.1993.tb03239.x
- da Silva, F.L., Escribano-Bailón, M.T., Pérez Alonso, J.J., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C., 2007. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Sci. Technol.* 40, 374-382. doi:10.1016/j.lwt.2005.09.018
- Darvill, A.G., McNeil, M., Albersheim, P., 1978. Structure of Plant Cell Walls: VIII. A New Pectic Polysaccharide. *Plant Physiol.* 62, 418-422.
- Diaz, J. V., Anthon, G.E., Barrett, D.M., 2007. Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: Effects of pH, temperature, and degree of methyl esterification. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5131-5136. doi:10.1021/jf0701483
- Dirinck, P.J., De Pooter, H.L., Willaert, G.A., Schamp, N.M., 1981. Flavor quality of cultivated strawberries: the role of the sulfur compounds. *J. Agric. Food Chem.* 29, 316-321. doi:10.1021/jf00104a024
- Dotto, M.C., Martínez, G.A., Civello, P.M., 2006. Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 301-307. doi:10.1016/j.plaphy.2006.06.008
- Eiberle, M.K., Jungbauer, A., 2010. Technical refolding of proteins: Do we have freedom to operate? *Biotechnol. J.* 5, 547-559. doi:10.1002/biot.201000001

- Figueroa, C.R., Pimentel, P., Dotto, M.C., Civello, P.M., Martínez, G.A., Herrera, R., Moya-León, M.A., 2009. Expression of five expansin genes during softening of *Fragaria chiloensis* fruit: Effect of auxin treatment. *Postharvest Biol. Technol.* 53, 51-57. doi:10.1016/j.postharvbio.2009.02.005
- Folta, K.M., Davis, T.M., 2006. Strawberry genes and genomics. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 25, 399-415. doi:10.1080/07352680600824831
- Fry, S.C., 1988. *The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis*. Longman, Harlow, UK.
- Fry, S.C., 1989. The Structure and Functions of Xyloglucan. *J. Exp. Bot.* 40, 1-11.
- Fry, S.C., Smith, R.C., Renwick, K.F., Martin, D.J., Hodge, S.K., Matthews, K.J., 1992. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J.* 282, 821-828.
- Fulton, L.M., Cobbett, C.S., 2003. Two alpha-L-arabinofuranosidase genes in *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during vegetative growth and flower development. *J. Exp. Bot.* 54, 2467-2477. doi:10.1093/jxb/erg269
- Gautam, 2012. Non-Chromatographic Strategies for Protein Refolding. *Recent Pat. Biotechnol.* 6, 57-68. doi:10.2174/187220812799789172
- Georgelis, N., Tabuchi, A., Nikolaidis, N., Cosgrove, D.J., 2011. Structure-function analysis of the bacterial expansin EXLX1. *J. Biol. Chem.* 286, 16814-16823. doi:10.1074/jbc.M111.225037
- Giovannoni, J., 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell Online* 16, 170-181. doi:10.1105/tpc.019158.Fruit
- Given, N.K., Venis, M.A., Gierson, D., 1988. Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta* 174, 402-406. doi:10.1007/BF00959527
- Goulao, L.F., Santos, J., de Sousa, I., Oliveira, C.M., 2007. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 307-318. doi:10.1016/j.postharvbio.2006.10.002
- Green A. (1971) *Soft fruits: The biochemistry of Fruits and their Products*. Capítulo 11. (Editor: Hulme, A.C.; Academic Press). DOI 10.1007/978-1-4939-3115-6 Library
- Harrison, E.P., McQueen-Mason, S.J., Manning, K., 2001. Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *J. Exp. Bot.* 52, 1437-1446.
- Heng Koh, T., Melton, L.D., 2002. Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biol. Technol.* 26, 23-33. doi:10.1016/S0925-5214(02)00003-0
- Höfte, H., 2015. The Yin and Yang of cell wall integrity control: Brassinosteroid and FERONIA signaling. *Plant Cell Physiol.* 56, 224-231. doi:10.1093/pcp/pcu182
- Hwang, S., Ahn, J., Lee, S., Lee, T.G., Haam, S., Lee, K., Ahn, I.-S., Jung, J.-K., 2004. Evaluation of cellulose-binding domain fused to a lipase for the lipase immobilization. *Biotechnol. Lett.* 26, 603-605.
- Iannetta, P.P.M., Laarhoven, L.-J., Medina-Escobar, N., James, E.K., McManus, M.T., Davies, H. V., Harren, F.J.M., 2006. Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiol. Plant.* 127, 247-259. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00656.x

- Ichinose, H., Yoshida, M., Fujimoto, Z., Kaneko, S., 2008. Characterization of a modular enzyme of exo-1,5- α -L-arabinofuranosidase and arabinan binding module from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 399-408. doi:10.1007/s00253-008-1551-x
- Ito, J., Fujita, Y., Ueda, M., Fukuda, H., Kondo, A., 2004. Improvement of cellulose-degrading ability of a yeast strain displaying *Trichoderma reesei* endoglucanase II by recombination of cellulose-binding domains. *Biotechnol. Prog.* 20, 688-691. doi:10.1021/bp034332u
- Jarvis, M.C., 1984. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant. Cell Environ.* 7, 153-164. doi:10.1111/1365-3040.ep11614586
- Jiang, M., Radford, A., 2000. Exploitation of a cellulose-binding domain from *Neurospora crassa*. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 434-442. doi:10.1016/S0141-0229(00)00228-3
- Jiménez-Bermúdez, S., Redondo-Nevado, J., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J.L., López-Aranda, J.M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M. a, Mercado, J. a, 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol.* 128, 751-759. doi:10.1104/pp.010671
- Kavoosi, M., Meijer, J., Kwan, E., Creagh, A.L., Kilburn, D.G., Haynes, C.A., 2004. Inexpensive one-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with the family 9 carbohydrate-binding module of xylanase 10A from *T. maritima*. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 807, 87-94. doi:10.1016/j.jchromb.2004.03.031
- Knee, M., Sargent, J.A., Osborne, D.J., 1977. Cell Wall Metabolism in Developing Strawberry Fruits. *J. Exp. Bot.* 28, 377-396.
- Knee M and Bartley IM (1981). Composition and metabolism of cell wall polysaccharides in ripening fruits. In: *Advances in the Biochemistry of Fruit and Vegetables* (Eds. Friend J and Rhodes MJC), Academic Press, London, pp. 133-148.
- Kotake, T., Tsuchiya, K., Aohara, T., Konishi, T., Kaneko, S., Igarashi, K., Samejima, M., Tsumuraya, Y., 2006. An α -L-arabinofuranosidase β -D-xylosidase from immature seeds of radish (*Raphanus sativus* L.). *J. Exp. Bot.* 57, 2353-2362. doi:10.1093/jxb/erj206
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685. doi:10.1038/227680a0
- Latorre-García, L., Adam, A.C., Manzanares, P., Polaina, J., 2005. Improving the amylolytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* glucoamylase by the addition of a starch binding domain. *J. Biotechnol.* 118, 167-176. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.03.019
- Lehtiö, J., Wernérus, H., Samuelson, P., Teeri, T.T., Ståhl, S., 2001. Directed immobilization of recombinant staphylococci on cotton fibers by functional display of a fungal cellulose-binding domain. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 197-204. doi:10.1016/S0378-1097(00)00562-0
- Leshem Y, Havelly AH, Frenkel C (1986) *Fruit Ripening, Development in Crop Science: Processes and Control of Plant Senescence*, vol. 8. Elsevier, Amsterdam pp. 162-210
- Levy, I., Shani, Z., Shoseyov, O., 2002. Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4- β -glucanase and cellulose-binding domains. *Biomol. Eng.* 19, 17-30. doi:10.1016/S1389-0344(02)00007-2
- Levy, I., Ward, G., Hadar, Y., Shoseyov, O., Dosoretz, C.G., 2003. Oxidation of 4-bromophenol by the recombinant fused protein cellulose-binding domain-horseradish peroxidase immobilized on cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 82, 223-231. doi:10.1002/bit.10562

- Li, X., Xu, C., Korban, S., Chen, K., 2010. Regulatory Mechanisms of Textural Changes in Ripening Fruits. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 29, 222-243. doi:10.1080/07352689.2010.487776
- Limón, M.C., Margolles-Clark, E., Benítez, T., Penttilä, M., 2001. Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 198, 57-63. doi:10.1016/S0378-1097(01)00124-0
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42, 490-495. doi:10.1093/nar/gkt1178
- Manning K (1993) Soft fruit. En: *Biochemistry of Fruit Ripening*. Capítulo 12. (Editors: Seymour, G.B., Taylor, J.E. and Tucker, G.A.; Chapman & Hall).
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zheng, C., Bryant, S.H., 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.* 43, D222-D226. doi:10.1093/nar/gku1221
- McDonald, J.K., Taylor, C.M., Rafferty, S., 2003. Design, preparation, and characterization of mixed dimers of inducible nitric oxide synthase oxygenase domains. *Protein Expr. Purif.* 27, 115-127. doi:10.1016/S1046-5928(02)00588-0
- McQueen-Mason, S., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J., 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4, 1425-1433. doi:10.2307/3869513
- McQueen-Mason, S.J., Cosgrove, D.J., 1995. Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* 107, 87-100. doi:10.1104/pp.107.1.87
- Menager, I., Jost, M., Aubert, C., 2004. Changes in physicochemical characteristics and volatile constituents of strawberry (Cv. Cigaline) during maturation. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1248-1254. doi:10.1021/jf0350919
- Minic, Z., Jouanin, L., 2006. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 435-449. doi:10.1016/j.plaphy.2006.08.001
- Miyanaga, A., Koseki, T., Matsuzawa, H., Wakagi, T., Shoun, H., Fushinobu, S., 2004. Crystal structure of a family 54 α -L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate-binding module that can bind arabinose. *J. Biol. Chem.* 279, 44907-44914. doi:10.1074/jbc.M405390200
- Miyanaga, A., Koseki, T., Miwa, Y., Mese, Y., Nakamura, S., Kuno, A., Hirabayashi, J., Matsuzawa, H., Wakagi, T., Shoun, H., Fushinobu, S., 2006. The family 42 carbohydrate-binding module of family 54 α -L-arabinofuranosidase specifically binds the arabinofuranose side chain of hemicellulose. *Biochem. J.* 399, 503-11. doi:10.1042/BJ20060567
- Mo, B., Bewley, J.D., 2003. The relationship between β -mannosidase and endo- β -mannanase activities in tomato seeds during and following germination: A comparison of seed populations and individual seeds. *J. Exp. Bot.* 54, 2503-2510. doi:10.1093/jxb/erg274
- Molina-Hidalgo, F.J., Franco, A.R., Villatoro, C., Medina-Puche, L., Mercado, J. a., Hidalgo, M. a., Monfort, A., Caballero, J.L., Muñoz-Blanco, J., Blanco-Portales, R., 2013. The strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. *J. Exp. Bot.* 64, 1471-1483. doi:10.1093/jxb/ers386

- Nam, J.M., Fujita, Y., Arai, T., Kondo, A., Morikawa, Y., Okada, H., Ueda, M., Tanaka, A., 2002. Construction of engineered yeast with the ability of binding to cellulose. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* 17, 197-202. doi:10.1016/S1381-1177(02)00028-0
- Nardi, C., Escudero, C., Villarreal, N., Martínez, G., Civello, P.M., 2013. The carbohydrate-binding module of *Fragaria × ananassa* expansin 2 (CBM-FaExp2) binds to cell wall polysaccharides and decreases cell wall enzyme activities «in vitro». *J. Plant Res.* 126, 151-159. doi:10.1007/s10265-012-0504-8
- Nardi, C.F., Villarreal, N.M., Rossi, F.R., Martínez, S., Martínez, G. a., Civello, P.M., 2015. Overexpression of the carbohydrate binding module of strawberry expansin2 in *Arabidopsis thaliana* modifies plant growth and cell wall metabolism. *Plant Mol. Biol.* 88, 101-117. doi:10.1007/s11103-015-0311-4
- Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H., Höfte, H., 1998. A plasma membrane-bound putative endo-1,4- β -D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 17, 5563-5576. doi:10.1093/emboj/17.19.5563
- Nishiyama, K., Guis, M., Rose, J.K.C., Kubo, Y., Bennett, K.A., Wangjin, L., Kato, K., Ushijima, K., Nakano, R., Inaba, A., Bouzayen, M., Latche, A., Pech, J.C., Bennett, A.B., 2007. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *J. Exp. Bot.* 58, 1281-1290. doi:10.1093/jxb/erl283
- Nogata, Y., Ohta, H., Voragen, A.G.J., 1993. Polygalacturonase in strawberry fruit. *Phytochemistry* 34, 617-620. doi:10.1016/0031-9422(93)85327-N
- Obembe, O.O., Jacobsen, E., Timmers, J., Gilbert, H., Blake, A.W., Knox, J.P., Visser, R.G.F., Vincken, J.P., 2007. Promiscuous, non-catalytic, tandem carbohydrate-binding modules modulate the cell-wall structure and development of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *J. Plant Res.* 120, 605-617. doi:10.1007/s10265-007-0099-7
- Obenland, D.M., Crisosto, C.H., Rose, J.K.C., 2003. Expansin protein levels decline with the development of mealiness in peaches. *Postharvest Biol. Technol.* 29, 11-18. doi:10.1016/S0925-5214(02)00245-4
- Ontivero, M., Arias, W., Ricci, J.D., Babot, J., Albornoz, P., Castagnaro, A., 2000. Analysis of genetic similarities among species of *Fragaria*, *Potentilla*, and *Duchesnea* found in northwest Argentina by using morphological, anatomical, and molecular characters. *Can. J. Bot. Can. Bot.* 78, 547-556. doi:10.1139/b00-026
- Oosumi, T., Gruszewski, H. a., Blischak, L. a., Baxter, A.J., Wadl, P. a., Shuman, J.L., Veilleux, R.E., Shulaev, V., 2006. High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta* 223, 1219-1230. doi:10.1007/s00425-005-0170-3
- Oosumi, T., Ruiz-Rojas, J.J., Veilleux, R.E., Dickerman, A., Shulaev, V., 2010. Implementing reverse genetics in Rosaceae: analysis of T-DNA flanking sequences of insertional mutant lines in the diploid strawberry, *Fragaria vesca*. *Physiol. Plant.* 140, 1-9. doi:10.1111/j.1399-3054.2010.01378.x
- Palonen, H., Tjerneld, F., Zacchi, G., Tenkanen, M., 2004. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *J. Biotechnol.* 107, 65-72. doi:10.1016/j.jbiotec.2003.09.011
- Payasi, A., Mishra, N.N., Chaves, A.L.S., Singh, R., 2009. Biochemistry of fruit softening: An overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 15, 103-113. doi:10.1007/s12298-009-0012-z

- Peaucelle, A., Braybrook, S., Höfte, H., 2012. Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited. *Front. Plant Sci.* 3, 121. doi:10.3389/fpls.2012.00121
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785-786. doi:10.1038/nmeth.1701
- Pfeifer, T.A., Guarna, M.M., Kwan, E.M., Lesnicki, G., Theilmann, D.A., Grigliatti, T.A., Kilburn, D.G., 2001. Expression analysis of a modified Factor X in stably transformed insect cell lines. *Protein Expr. Purif.* 23, 233-241. doi:10.1006/prep.2001.1503
- Posé, S., Nieves, J. a G., Quesada, F.P.M. a, Mercado, J. a, 2011. Strawberry Fruit Softening : Role of Cell Wall Disassembly and its Manipulation in Transgenic Plants. *Genes, Genomes and Genomics* 5, 40-48.
- Potter, D., Luby, J.J., Harrison, R.E., 2000. Phylogenetic Relationships among Species of *Fragaria* (Rosaceae) Inferred from Non-Coding Nuclear and Chloroplast DNA Sequences. *Syst. Bot.* 25, 337. doi:10.2307/2666646
- Pressey, R., Avants, J.K., 1982. Solubilization of Cell Walls By Tomato Polygalacturonases: Effects of Pectinesterases. *J. Food Biochem.* 6, 57-74. doi:10.1111/j.1745-4514.1982.tb00296.x
- Redgwell, R.J., Fischer, M., Kendal, E., MacRae, E.A., 1997. Galactose loss and fruit ripening: High-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* 203, 174-181. doi:10.1007/s004250050179
- Redgwell, R.J., Fry, S.C., 1993. Xyloglucan Endotransglycosylase Activity Increases during Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) Ripening (Implications for Fruit Softening). *Plant Physiol.* 103, 1399-1406. doi:103/4/1399 [pii]
- Ribeiro, T., Santos-Silva, T., Alves, V.D., Dias, F.M. V, Luís, A.S., Prates, J. a M., Ferreira, L.M. a, Romão, M.J., Fontes, C.M.G. a, 2010. Family 42 carbohydrate-binding modules display multiple arabinoxylan-binding interfaces presenting different ligand affinities. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1804, 2054-2062. doi:10.1016/j.bbapap.2010.07.006
- Rodriguez, B., Kavoosi, M., Koska, J., Creagh, a L., Kilburn, D.G., Haynes, C. a, 2004. Inexpensive and generic affinity purification of recombinant proteins using a family 2a CBM fusion tag. *Biotechnol. Prog.* 20, 1479-89. doi:10.1021/bp0341904
- Ronen, R., Zauberman, G., Akerman, M., Weksler, A., Rot, I., Fuchs, Y., 1991. Xylanase and Xylosidase Activities in Avocado Fruit. *Plant Physiol.* 95, 961-964. doi:10.1104/pp.95.3.961
- Rose, J.K., Lee, H.H., Bennett, a B., 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5955-5960. doi:10.1073/pnas.94.11.5955
- Rose, J.K.C., Cosgrove, D.J., Albersheim, P., Darvill, a G., Bennett, a B., 2000. Detection of expansin proteins and activity during tomato fruit ontogeny. *Plant Physiol.* 123, 1583-1592. doi:10.1104/pp.123.4.1583
- Rosli, H.G., Civello, P.M., Martínez, G. a., 2009. α -L-Arabinofuranosidase from strawberry fruit: Cloning of three cDNAs, characterization of their expression and analysis of enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 272-281. doi:10.1016/j.plaphy.2008.12.009
- Rosli, H.G., Civello, P.M., Martínez, G. a., 2004. Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 823-831. doi:10.1016/j.plaphy.2004.10.002

- Rotticci-Mulder, J.C., Gustavsson, M., Holmquist, M., Hult, K., Martinelle, M., 2001. Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain. *Protein Expr. Purif.* 21, 386-392. doi:10.1006/prev.2000.1387
- Ruiz-Rojas, J.J., Sargent, D.J., Shulaev, V., Dickerman, A.W., Pattison, J., Holt, S.H., Ciordia, A., Veilleux, R.E., 2010. SNP discovery and genetic mapping of T-DNA insertional mutants in *Fragaria vesca* L. *Theor. Appl. Genet.* 121, 449-463. doi:10.1007/s00122-010-1322-9
- Schlager, B., Straessle, A., Hafen, E., 2012. Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression. *BMC Biotechnol.* 12, 95. doi:10.1186/1472-6750-12-95
- Schneider, C. a, Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671-675. doi:10.1038/nmeth.2089
- Schröder, R., Wegrzyn, T.F., Bolitho, K.M., Redgwell, R.J., 2004. Mannan transglycosylase: a novel enzyme activity in cell walls of higher plants. *Planta* 219, 590-600. doi:10.1007/s00425-004-1274-x
- Seymour G.B., Taylor J.E., Tucker G.A., 1993. *Biochemistry of fruit ripening*. London: Chapman and Hall.
- Shoseyov, O., Shani, Z., Levy, I., 2006. Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 283-295. doi:10.1128/MMBR.00028-05
- Shpigel, E., Goldlust, A., Eshel, A., Ber, I.K., Efroni, G., Singer, Y., Levy, I., Dekel, M., Shoseyov, O., 2000. Expression, purification and applications of staphylococcal Protein A fused to cellulose-binding domain. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 197-203. doi:10.1042/BA20000002
- Shulaev, V., Korban, S.S., Sosinski, B., Abbott, A.G., Aldwinckle, H.S., Folta, K.M., Iezzoni, A., Main, D., Arús, P., Dandekar, A.M., Lewers, K., Brown, S.K., Davis, T.M., Gardiner, S.E., Potter, D., Veilleux, R.E., 2008. Multiple Models for Rosaceae Genomics. *Plant Physiol* 147, 985-1003. doi:10.1104/pp.107.115618
- Shulaev, V., Sargent, D.J., Crowhurst, R.N., Mockler, T.C., Folkerts, O., Delcher, A.L., Jaiswal, P., Mockaitis, K., Liston, A., Mane, S.P., Burns, P., Davis, T.M., Slovin, J.P., Bassil, N., Hellens, R.P., Evans, C., Harkins, T., Kodira, C., Desany, B., Crasta, O.R., Jensen, R. V., Allan, A.C., Michael, T.P., Setubal, J.C., Celton, J.-M., Rees, D.J.G., Williams, K.P., Holt, S.H., Ruiz Rojas, J.J., Chatterjee, M., Liu, B., Silva, H., Meisel, L., Adato, A., Filichkin, S. a, Troglio, M., Viola, R., Ashman, T.-L., Wang, H., Dharmawardhana, P., Elser, J., Raja, R., Priest, H.D., Bryant, D.W., Fox, S.E., Givan, S. a, Wilhelm, L.J., Naithani, S., Christoffels, A., Salama, D.Y., Carter, J., Lopez Girona, E., Zdepski, A., Wang, W., Kerstetter, R. a, Schwab, W., Korban, S.S., Davik, J., Monfort, A., Denoyes-Rothan, B., Arus, P., Mittler, R., Flinn, B., Aharoni, A., Bennetzen, J.L., Salzberg, S.L., Dickerman, A.W., Velasco, R., Borodovsky, M., Veilleux, R.E., Folta, K.M., 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nat. Genet.* 43, 109-116. doi:10.1038/ng.740
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539. doi:10.1038/msb.2011.75
- Sigrist, C.J.A., De Castro, E., Cerutti, L., Cucho, B.A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., Xenarios, I., 2013. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* 41, 1-4. doi:10.1093/nar/gks1067

- Slovin, J.P., Schmitt, K., Folta, K.M., 2009. An inbred line of the diploid strawberry *Fragaria vesca* f. *semperflorens* for genomic and molecular genetic studies in the Rosaceae. *Plant Methods* 5, 15. doi:10.1186/1746-4811-5-15
- Sozzi, G.O., Frascina, A.A., Navarro, A.A., Cascone, O., Greve, L.C., Labavitch, J.M., 2002. α -L-Arabinofuranosidase activity during development and ripening of normal and ACC synthase antisense tomato fruit. *HortScience* 37, 564-566.
- Tateishi, A., 2008. β -Galactosidase and α -L-Arabinofuranosidase in Cell Wall Modification Related with Fruit Development and Softening. *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.* 77, 329-340. doi:10.2503/jjshs1.77.329
- Tomme, P., Boraston, A., Kormos, J.M., Warren, R. a J., Kilburn, D.G., 2000. Affinity electrophoresis for the identification and characterization of soluble sugar binding by carbohydrate-binding modules. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 453-458. doi:10.1016/S0141-0229(00)00246-5
- Trainotti, L., Pavanello, A., Casadoro, G., 2005. Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits? *J. Exp. Bot.* 56, 2037-2046. doi:10.1093/jxb/eri202
- Trivedi, P.K., Nath, P., 2004. MaExp1, an ethylene-induced expansin from ripening banana fruit. *Plant Sci.* 167, 1351-1358. doi:10.1016/j.plantsci.2004.07.005
- Tucker GA. 1993. Introduction. In: Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA, eds. *Biochemistry of fruit ripening*. London: Chapman and Hall, 1-52
- Van Buren J (1970) Fruits phenolics. En: *The Biochemistry of Fruits and their Products*. Capítulo 11. (Editor: Hulme, A.C.; Academic Press).
- Vicente, A.R., Saladié, M., Rose, J.K., Labavitch, J.M., 2007. Review The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *J. Sci. Food Agric.* 87, 1435-1448. doi:10.1002/jsfa.2837
- Villarreal, N.M., Marina, M., Nardi, C.F., Civello, P.M., Martínez, G.A., 2016. Plant Science Novel insights of ethylene role in strawberry cell wall metabolism. *Plant Sci.* 252, 1-11. doi:10.1016/j.plantsci.2016.06.018
- Villarreal, N.M., Rosli, H.G., Martínez, G.A., Civello, P.M., 2008a. Polygalacturonase activity and expression of related genes during ripening of strawberry cultivars with contrasting fruit firmness. *Postharvest Biol. Technol.* 47, 141-150. doi:10.1016/j.postharvbio.2007.06.011
- Villarreal, N.M., Rosli, H.G., Martínez, G.A., Civello, P.M., 2008b. Polygalacturonase activity and expression of related genes during ripening of strawberry cultivars with contrasting fruit firmness. *Postharvest Biol. Technol.* 47, 141-150. doi:10.1016/j.postharvbio.2007.06.011
- Vincken, J.-P., Schols, H. a, Oomen, R.J.F.J., McCann, M.C., Ulvskov, P., Voragen, A.G.J., Visser, R.G.F., 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.* 132, 1781-1789. doi:10.1104/pp.103.022350
- Wan, C.Y., Wilkins, T.A., 1994. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal. Biochem.* 223, 7-12. doi:10.1006/abio.1994.1538
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2- A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189-1191. doi:10.1093/bioinformatics/btp033

- Wolf, S., Mravec, J., Greiner, S., Mouille, G., Höfte, H., 2012. Plant cell wall homeostasis is mediated by brassinosteroid feedback signaling. *Curr. Biol.* 22, 1732-1737. doi:10.1016/j.cub.2012.07.036
- Wolf, S., van der Does, D., Ladwig, F., Sticht, C., Kolbeck, A., Schürholz, A.-K., Augustin, S., Keinath, N., Rausch, T., Greiner, S., Schumacher, K., Harter, K., Zipfel, C., Höfte, H., 2014. A receptor-like protein mediates the response to pectin modification by activating brassinosteroid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 15261-15266. doi:10.1073/pnas.1322979111
- Woodward, J.R., 1972. Physical and chemical changes in developing strawberry fruits. *J. Sci. Food Agric.* 23, 465-473. doi:10.1002/jsfa.2740230406
- Yamaguchi, S., Yamamoto, E., Mannen, T., Nagamune, T., 2013. Protein refolding using chemical refolding additives. *Biotechnol. J.* 8, 17-31. doi:10.1002/biot.201200025
- Zaharah, S.S., Singh, Z., Symons, G.M., Reid, J.B., 2012. Role of Brassinosteroids, Ethylene, Abscisic Acid, and Indole-3-Acetic Acid in Mango Fruit Ripening. *J. Plant Growth Regul.* 31, 363-372. doi:10.1007/s00344-011-9245-5
- Zhou, H.C., Li, G., Zhao, X., Li, L.J., 2015. Comparative analysis of polygalacturonase in the fruit of strawberry cultivars. *Genet. Mol. Res.* 14, 12776-12787. doi:10.4238/2015.October.19.21