

## **SOBREEXPRESIÓN DEL MÓDULO DE UNIÓN A CARBOHIDRATOS DE LA EXPANSINA 2 DE FRAGARIA ANANASSA DUCH. EN *Fragaria vesca* L. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD EXPANSINA EN FRUTILLA.**

**Ignacio N. Sin<sup>1,3</sup>, Mauro A. Perini<sup>1,3</sup>, Gustavo Martínez<sup>2,3</sup>, Pedro M. Civello<sup>1,3</sup>**

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

<sup>2</sup> IIB-INTECH (CONICET-UNSAM), Av. Intendente Marino Km 8,200 CC 164 (7130) Chascomús, Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Exactas UNLP, Calle 115 y 47, CC 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

sinignacio@gmail.com

**PALABRAS CLAVE:** Frutilla, Expansina, CBM.

La tasa de ablandamiento de un fruto es uno de los factores determinantes de su calidad y vida poscosecha, fenómeno íntimamente relacionado con la firmeza del fruto y condicionado en mayor medida por la rigidez mecánica impuesta por la pared celular [1]. Los intentos realizados hasta el momento para controlar el ablandamiento de frutos se han centrado en la supresión, en forma aislada, de la expresión de genes involucrados en la degradación de la pared [2, 3]. Si bien se consigue reducir la expresión de los genes elegidos a niveles muy bajos, la firmeza del fruto no se modifica de manera sustancial [4, 5], lo que demuestra que el ablandamiento del fruto es un proceso complejo que involucra la acción coordinada y secuencial de un gran número de enzimas y otras proteínas presentes en la pared. Un aspecto común de la estructura de la mayoría de estas especies es su organización modular, que generalmente comprende un módulo catalítico (característico de cada enzima) y uno de unión a carbohidratos (CBM; carbohydrate binding module; [6]). Un CBM carente de actividad enzimática tendría la capacidad de unirse de modo específico o promiscuo a diferentes polisacáridos presentes en la pared celular [7], dificultando de ese modo el acceso de las enzimas activas a sus sustratos y produciendo una reducción global de la degradación de la pared.

En el laboratorio se cuenta con líneas transgénicas de *Fragaria vesca* Hawaii 4, generadas en colaboración con el laboratorio del Dr. Kevin Folta en la Universidad de Florida, USA. Las plantas se transformaron con una construcción diseñada para expresar constitutivamente en pared celular el CBM de la Expansina 2 de *Fragaria ananassa* (CBM[FaExp2]) bajo el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor. De la primera generación de plantas se hizo extracciones de RNA, se sintetizó DNA copia (cDNA) y se corroboró la transgénesis por medio de PCR utilizando primers específicos tanto para el transgen como para los marcadores de selección (proteína fluorescente verde [GFP] y gen de resistencia a kanamicina). Se seleccionaron 7 líneas transgénicas, actualmente en etapa de propagación para dar comienzo a la caracterización fenotípica, centrada principalmente en el ablandamiento del fruto, la composición de la pared celular, la actividad de enzimas de pared y la expresión de genes de interés.

Una de las caracterizaciones propuestas es la medida de la actividad Expansina de los frutos, para lo cual se puso a punto un protocolo para la medición de dicha actividad a partir de extractos proteicos de frutos de frutilla. Se adaptó el protocolo descrito por McQueen-Mason [8] para su

uso con un texturómetro comercial (Texture Analyser TA.XT plus), para realizar el bioensayo de reconstitución del crecimiento ácido de un hipocótilo de pepino inactivado térmicamente con el extracto de proteína de interés. Se ensayaron dos cultivares de *Fragaria ananassa* (cvs. Sweet Charlie y Camarosa) en frutos de distinta madurez fisiológica (blanco, 50% rojo y 100% rojo), observándose un aumento progresivo de la actividad Expansina conforme al avance de la maduración del fruto.

### REFERENCIAS

- [1] F.R Harker, R.J Redgwell, I.C Hallett, S.H Murray, "Texture of fresh fruit". *Horticultural Reviews* 20, **1997**, 121-224.
- [2] D.A Brummell, M.H Harpster, "Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants", *Plant Mol. Biol* 47, **2001**, 311-340.
- [3] A. Xiong, Q Yao, R Peng, X. Li, P. Han, H. Fan "Different effects on ACC oxidase gene silencing triggered by RNA interference in transgenic tomato", *Plant Cell Rep* 23, **2005**, 639-646.
- [4] S. Jiménez-Bermúdez, J. Redondo-Nevaldo, J. Muñoz-Blanco, J.L Caballero, J.M López-Aranda, V. Valpuesta, F. Pliego-Alfaro, M.A Quesada, J.A Mercado, "Manipulation of Strawberry Fruit Softening by Antisense Expression of a Pectate Lyase Gene", *Plant Physiol* 128, **2002**, 751-759.
- [5] M.A Quesada, R. Blanco-Portales, S. Pose, J.A García-Gago, S. Jiménez-Bermúdez, A. Muñoz-Serrano, J. L Caballero, F. Pliego-Alfaro, J.A Mercado, J. Muñoz-Blanco, "Antisense Down-Regulation of the FaPG1 gene Reveals an Unexpected Central Role for Polygalacturonase in Strawberry Fruit Softening", *Plant Physiology* 150, **2009**, 1022-1032.
- [6] O. Shoseyov, Z. Shani, I. Levy, "Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications", *Microbiol Mol Biol Rev* 70, **2006**, 283-295.
- [7] C. Nardi, C. Escudero, N. Villarreal, G. Martínez, P.M Civello, "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, **2013**, 151-159.
- [8] S. McQueen-Mason, D.M Durachko, and D.J Cosgrove, "Two Endogenous Proteins That Induce Cell Wall Extension in Plants", *The Plant Cell* 4, **1992**, 1435-1433.