

Efecto de la sobreexpresión de CBM-FaEXP2 en frutilla

Sin I. (1), Perini M. (1,2), Rosli H. (1), Nardi C. (3), Folta K. (4), Martínez G. (5), Civello M. (1,2)

(1) Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE, CONICET, UNLP), La Plata, Argentina.

(2) Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

(3) UNTDF, Ushuaia, Argentina.

(4) Horticultural Sciences Department, University of Florida, Gainesville, FL, Estados Unidos.

(5) Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH, UNSAM, Chascomús, Argentina.

Dirección de e-mail: sinignacio@gmail.com

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 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 (carente de actividad hidrolítica) y un módulo de unión a carbohidratos (CBM) con fuerte afinidad por celulosa. En el presente trabajo se analizó el efecto de la sobreexpresión del CBM de la expansina dos de *Fragaria x ananassa* (FaExpa2) sobre el ablandamiento del fruto, usando *Fragaria vesca* cv. Hawaii 4 como sistema modelo, bajo la hipótesis de que la expresión de una proteína con la capacidad de unirse a carbohidratos, pero carente de actividad hidrolítica sobre los mismos genera una competencia por el sustrato con el resto de las enzimas involucradas en el catabolismo de la pared celular, provocando una reducción global de la degradación de la pared celular. Se analizaron distintos parámetros de calidad, la actividad expansina y poligalacturonasa en frutos transgénicos sobreexpresantes de CBM-FaEXP2.

Palabras clave: frutilla, CBM, firmeza

Introducción

Uno de los principales factores determinantes de la calidad y vida poscosecha de un fruto es su firmeza, influyendo tanto en el deterioro asociado a la manipulación como en la susceptibilidad a patógenos. La firmeza de un fruto está condicionada por varios factores, siendo uno de los principales la rigidez mecánica impuesta por la pared



celular (Harker, et al. 2010), constituida por una red de microfibrillas de celulosa inmersas en una compleja matriz de pectinas y hemicelulosas (Brummell y Harpster, 2001). Durante la maduración, la acción combinada de diferentes proteínas y enzimas que actúan sobre los componentes de la pared celular provoca su solubilización, depolimerización y una disminución en su contenido (Brummell, 2006). 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 (Cosgrove et al., 2002). Estas proteínas se caracterizan por presentar un módulo catalítico similar al de las glicosilhidrolasas (carente de actividad hidrolítica) y un módulo de a carbohidratos caracterizado por presentar fuerte afinidad por celulosa.

Se han reportado estrategias en las que se ha intentado controlar el fenómeno de ablandamiento mediante la supresión de la expresión de un único gen, a través de distintas técnicas; sin embargo, si bien se consiguió reducir los niveles de expresión a nivel de ARNm a valores muy bajos, el efecto sobre el ablandamiento del fruto fue escaso (Brummell et al., 1999; Jiménez-Bermúdez et al., 2002; Quesada et al., 2009) o en muchos casos nulo (Brummell y Harpster, 2001; Xiong et al., 2005), probablemente debido el fenómeno de ablandamiento involucra la participación de numerosas enzimas que actúan simultánea o secuencialmente sobre los componentes de la pared celular.

Existen antecedentes en los que la sobreexpresión de un CBM en la pared celular vegetal se tradujo en un metabolismo alterado de la pared celular (Nardi et al., 2015; M. A. Perini et al., 2017). 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 catabolismo de la pared celular, provocando una reducción global de la degradación de la pared celular.

El objetivo del trabajo fue utilizar al módulo de unión a carbohidratos de la expansina de *Fragaria x ananassa* (FaEXPa2) para controlar el fenómeno de ablandamiento usando *Fragaria vesca* cv. Hawaii 4 como sistema modelo. Se analizaron distintos parámetros de calidad, la actividad expansina y poligalacturonasa en frutos transgénicos sobreexpresantes de CBM-FaEXP2.

Materiales y Métodos

Generación de plantas transgénicas

Se siguió el diseño descrito por Nardi et al. (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* H4. 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 FaExpa2 como molde (Figura 1). Se utilizó el 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 respectivamente. El vector binario pK7WG2D tiene un gen de



resistencia al antibiótico kanamicina y el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) como marcadores de selección y, el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (P35S-CaMV) para dirigir la expresión del gen de interés.

El constructo pK7WG2D[CBM-FaEXP2], fue utilizado para transformar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101, con las cuales se infectaron explantos de hoja de *F. vesca* H4 (PI551572) mediante co-cultivo y finalmente se regeneraron plantas transformadas por medio del cultivo “in vitro” de los tejidos transformados, siguiendo el protocolo descrito en Zhang et al. (2014).

Cebadores utilizados en la reacción PCR1:

- Cebador 1F: 5'-ggggacaagtttgtaaaaaagcaggcttaatggcttttacttcatgcttg-3';
- Cebador 1R: 5'-tgcccgttgattgtgaatctg atggcataggcctctga-3'.

Cebadores utilizados en la reacción PCR2:

- Cebador 2F: producto de PCR1;
- Cebador 2R: 5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtactagaattgaccgcctgaaaacgt-3'.

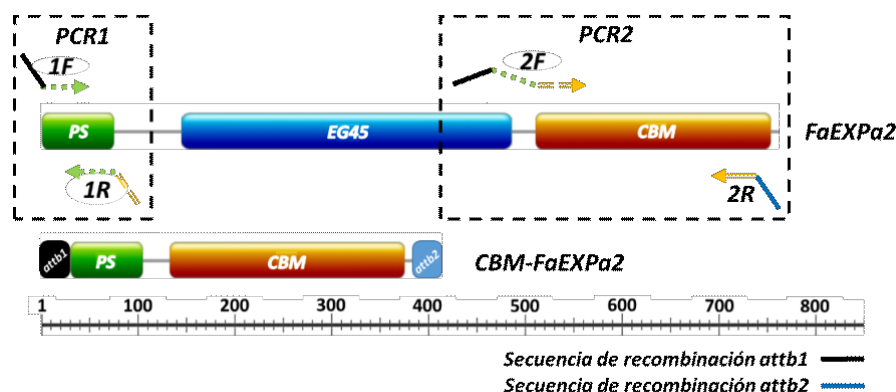


Figura 1. Armado de la construcción

Clasificación de los frutos

El cultivar *F. vesca* H4 presenta frutos que no desarrollan el color rojo característico de la mayoría de las variedades de frutilla durante la maduración, permaneciendo blancos durante el proceso de maduración. Se distinguieron 5 estadios de madurez fisiológica (Figura 2), en función de distintas características morfológicas de los frutos.

Chequeos moleculares

El chequeo de la transgénesis se realizó por medio RT-PCR a punto final. Se extrajo ARNm de frutos de *F. vesca* H4 en E3, tanto tipo salvaje (WT) como de los 7 eventos de transformación, utilizando el protocolo del CTAB modificado (Amaya et al., 2016). El ADNcopia se generó utilizando la transcriptasa reversa MMLV de Promega®, siguiendo las especificaciones del fabricante. Se utilizó un par de cebadores específicos para el gen de endoxilanasas como control endógeno y, cebadores específicos para el transgen para confirmar la transgénesis.



Firmeza del fruto

La firmeza 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: 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. Se midió la firmeza de 10 frutos de cada evento de transformación por estadio de madurez fisiológica.

Contenido de azúcares solubles en alcohol

Se hicieron extractos etanólicos de frutos tipo salvaje y de tres eventos transgénicos (CBM3, CBM4 y CBM5), en tres estadios de madurez (E3, E4 y E5). 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, usando glucosa como patrón de referencia. Las medidas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como g de glucosa por kg de fruto.

Aislamiento de polisacáridos de la pared celular

Se analizó el contenido de pared celular en frutos de *F. vesca* H4 tipo salvaje y de tres eventos transgénicos (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 et al. (1993). Los resultados se expresaron como mg de RIA cada 100 mg de tejido.

Medida de actividad expansina total

Se midió la actividad expansina total en frutos de *F. vesca* H4 tipo salvaje y de tres eventos de transformación (CBM3, CBM4 y CBM5) en tres estadios de madurez (E3, E4 y E5). Los extractos proteicos y la determinación de la actividad expansina se realizaron de acuerdo con lo descrito en Perini et al. (2017).

Medida de actividad poligalacturonasa (PG)

Se midió la actividad PG en frutos de *F. vesca* 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 se adaptó a la descrita por Nogata et al. (1993). 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 proteico. La cinética se llevó a cabo a 37 °C, tomándose alícuotas a las 0, 6, 12 y 24 h. El contenido de ácido galacturónico liberado se determinó siguiendo el protocolo descrito en Diaz et al.



(2007). 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.

Análisis Estadístico

Todos los resultados se analizaron mediante ANOVA por estadio de madurez fisiológica. En todos los casos las medias de los eventos transformados se compararon contra la media de frutos tipo salvaje mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$).

Resultados y Discusión

Generación de Plantas Transgénicas y chequeos moleculares

Se consiguió regenerar siete eventos de transformación independientes a partir del cultivo *in-vitro* de tejidos, nombrados arbitrariamente CBM1 a CBM7. De acuerdo con los chequeos moleculares, todos los eventos resultaron ser transgénicos (Figura 2). Los mismos se propagaron por clonación mediante repique de estolones. Se eligieron los eventos CBM3, CBM4 y CBM5 para realizar las caracterizaciones de los frutos.

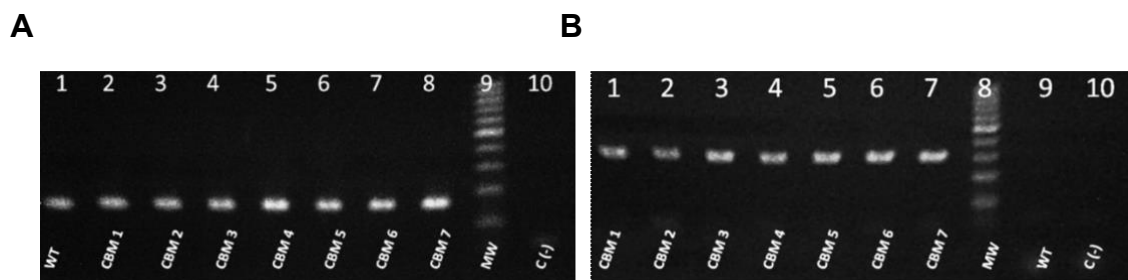


Figura 2. Chequeos Moleculares por RT-PCR. **A)** Gen FvXyn (control endógeno). **B)** Transgen. WT: frutos tipo salvaje; CBM1-CBM7: frutos de eventos transformados; C(-): control de PCR.

Estadios de Madurez Fisiológica

No se observaron diferencias morfológicas entre frutos transgénicos y tipo salvaje. Los frutos se clasificaron en 5 estadios de madurez, numerados en forma arbitraria del 1 al 5 (E1 a E5) siguiendo el desarrollo del fruto (Figura 3). E1 se caracterizó por un fruto pequeño aún verde con los achenios en contacto entre sí. En E2 comienza a perderse el color verde y se distingue una pequeña separación entre los achenios. En E3 se denota un incremento en el tamaño del fruto, no se aprecia color verde, los achenios se encuentran separados, pero aún no toman el color pardo característico de los estadios sucesivos. En E4 el fruto adquiere el tamaño final, al igual que el color de los achenios. E5 se caracteriza por el color pardo de los frutos, indicio del comienzo de su descomposición.



Figura 3. Estadios de madurez fisiológica.

Firmeza

El cultivar se caracterizó por presentar frutos blandos. Comparados con frutos de *Fragaria x ananassa* la firmeza medida en *F. vesca* H4 se encuentra casi un orden de magnitud por debajo de los valores esperados para la variedad comercial. Se observó una disminución progresiva en la firmeza con el avance de la maduración, siendo la disminución entre E2 y E3 la de mayor relevancia (Figura 4). 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 ni E2 ni en E5, pero sí se encontraron diferencias significativas en E3 y E4 (Figura 4). Para el E3, los tres eventos analizados presentan una firmeza mayor a la de los frutos tipo salvaje, mientras que en E4 la diferencia se mantiene para los eventos CBM3 y CBM4, pero deja de observarse en el evento CBM5. Resultados similares se obtuvieron en tomates transgénicos (*S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig) sobreexpresantes del CBM de la expansina 1 de tomate (SIEXPa1; Perini et al., 2017).

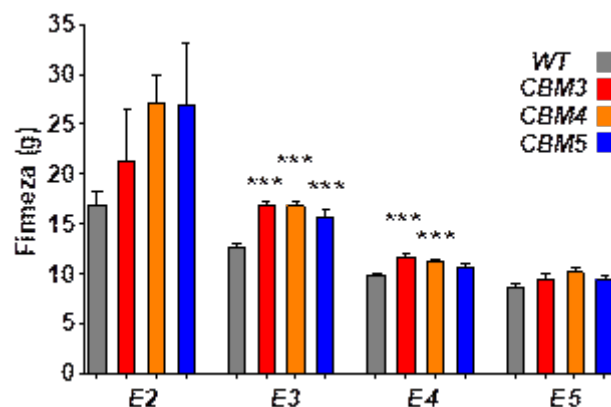


Figura 4. Firmeza en g de frutos en distintos estadios de madurez fisiológica en planta. WT: frutos tipo salvaje; CBM3 a CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. Asteriscos (*) indican diferencias significativas con el tipo salvaje.

Contenido de pared como residuo insoluble en alcohol

No se observaron diferencias en los perfiles de RIA de los distintos eventos analizados. Hay una caída pronunciada en el contenido de RIA entre 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 (Figura



5A). Para la mayoría de los eventos, no se observan diferencias en el contenido de RIA correspondiente a los tres últimos estadios de madurez (E3, E4 y E5). En lo que respecta a la comparación del contenido de RIA de los eventos transgénicos con el tipo salvaje por estadio, sólo se observaron diferencias significativas en frutos del evento CBM5 en E3, siendo el contenido de RIA mayor que el de los frutos tipo salvaje (Figura 5A). Si bien no se observaron diferencias significativas en el contenido de RIA en E2, E4 y E5 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 la mayoría de los eventos transformados (Figura 5A).

Azúcares totales

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 (Figura 5B). En E3 todos los eventos transgénicos presentaron un menor contenido de azúcares totales que los frutos tipo salvaje (Figura 5B). En 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. En E5, sólo se observaron diferencias significativas en el evento CBM5, con un contenido de azúcares mayor al de los frutos tipo salvaje.

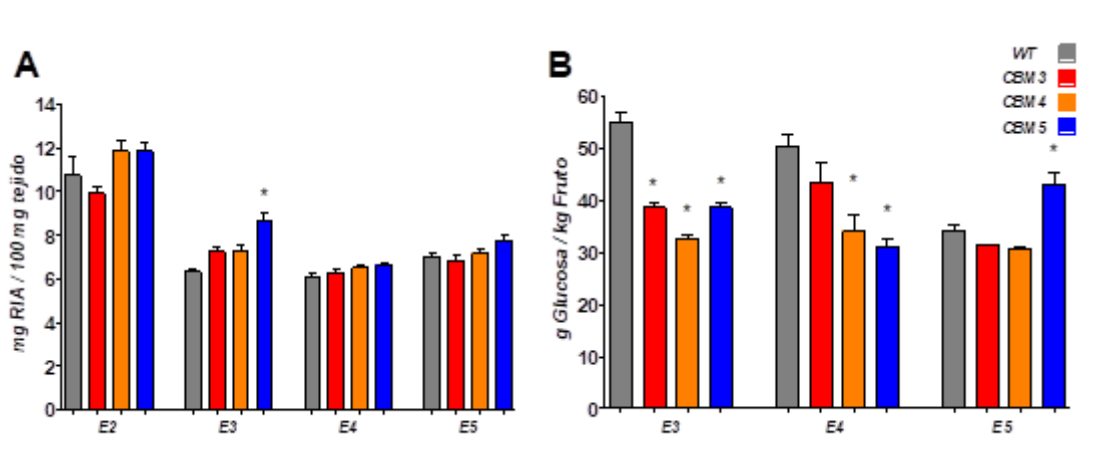


Figura 5. A) Residuos insolubles en alcohol (mg RIA /100 mg tejido). B) Azúcares totales (g Glucosa/kg Fruto). WT: Frutos tipo salvaje; CBM3, CBM4 y CBM5 eventos transformados; E3, E4 y E5: estadios de madurez. Asteriscos (*) indican diferencias significativas con el WT.

Actividades expansina y poligalacturonasa (PG) totales

En lo que respecta a la actividad expansina específica total, en todos los casos analizados se observó un aumento de la actividad con la maduración del fruto. Al comparar por estadio la actividad expansina determinada en los frutos transgénicos con la propia de los frutos tipo salvaje, en E3 sólo se observaron diferencias



significativas en la actividad determinada en el evento CBM5, siendo esta menor a la observada en frutos tipo salvaje (Figura 6A). En E4 y E5, en cambio, todos los frutos provenientes de eventos transgénicos presentaron una menor actividad expansina específica que en los frutos tipo salvaje, siendo la diferencia en todos los casos estadísticamente significativa (Figura 6A).

En cuanto a la actividad PG total, se observó un aumento de la actividad entre los últimos estadios de madurez (E4-E5) en frutos tipo salvaje (Figura 6B). Ninguno de los perfiles observados en los eventos transgénicos coincidió con el observado en los frutos tipo salvaje. 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 en la actividad PG en ninguno de los estadios de madurez en estudio. 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 (Figura 6B).

Para ambas enzimas se observó una menor actividad frutos de los eventos transgénicos que en los frutos tipo salvaje. Los resultados concuerdan con lo descrito en Nardi et al., 2015, donde la sobreexpresión de un CBM de expansina en la pared celular de *Arabidopsis thaliana* se tradujo en una menor actividad de algunas de las enzimas del catabolismo de la pared celular vegetal.

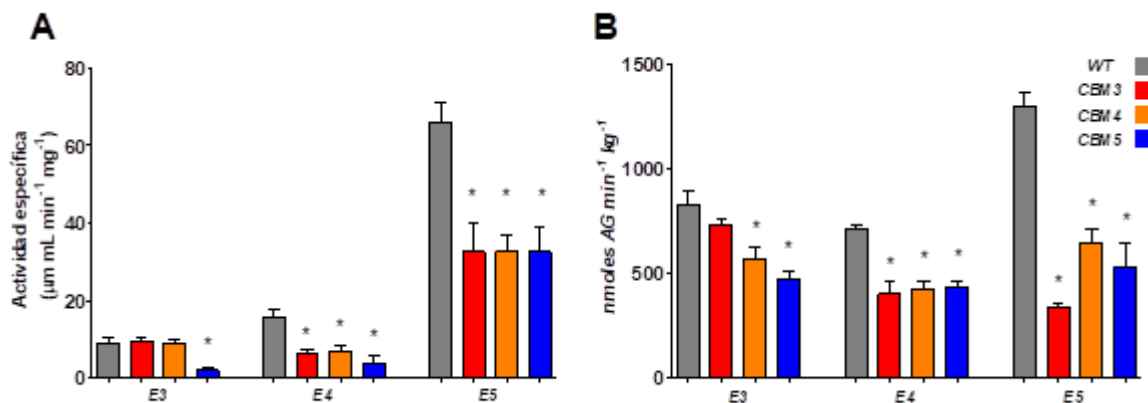


Figura 6. A) Actividad expansina específica ($\mu\text{m}\cdot\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). **B)** Actividad PG ($\text{nmol}\cdot\text{AG}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$). WT: frutos tipo salvaje; CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E3, E4 y E5: estadios de madurez. Asteriscos (*) indican diferencia estadística al tipo salvaje.

Conclusiones

No se observaron cambios macroscópicos en el fenotipo de los frutos transgénicos al compararlos con los frutos tipo salvaje, pero si se observó una mayor firmeza, una leve tendencia hacia un mayor contenido en pared celular, menor contenido de azúcares solubles en alcohol y menor actividad tanto expansina como poligalacturonasa, dando indicios de un metabolismo alterado de la pared celular vegetal. En su conjunto los resultados indican que la sobreexpresión en la pared



celular de un CBM carente de actividad hidrolítica sobre carbohidratos, tiene potencial como estrategia para controlar el ablandamiento en frutilla.

Referencias

AMAYA I., PLETT J., FOLTA K. (2016). Methods and Protocols: Plant Signal Transduction, Chapter 4 (Editors: Botella J.R. and Botella M.A.; Humana Press).

BRUMMELL, D. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit, en: *Functional Plant Biology*. 33:103-119.

BRUMMELL, D., HARPSTER, M. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants, en: *Plant Molecular Biology*. 47:311-340.

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, en: *Plant Cell*. 11:2203-2216.

COSGROVE, D., LI, L., CHO, H., HOFFMANN-BENNING, S., MOORE, R. BLECKER, D. (2002). The growing world of expansins, en: *Plant Cell Physiology*. 43: 1436-1444.

d'AMOUR, J., GOSSELIN, C., ARUL, J., CASTAIGNE, F., WILLEMOT, C. (1993). Gamma-Radiation Affects Cell Wall Composition of Strawberries, en: *Journal of Food Science*. 58:182-185.

DIAZ, J., ANTHON, G., BARRETT, D. (2007). Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: Effects of pH, temperature, and degree of methyl esterification, en: *J. Agric. Food Chem*. 55:5131-5136.

HARKER, F., REDGWELL, R., HALLETT, I., MURRAY S., CARTER, G. (2010). Texture of Fresh Fruit, en *Horticultural Reviews*, John Wiley & Sons, Inc., 121-224.

JIMÉNEZ-BERMÚDEZ, S., REDONDO-NEVADO, J., MUÑOZ-BLANCO, J., CABALLERO, J., LÓPEZ-ARANDA, J., VALPUESTA, V., PLIEGO-ALFARO, F., QUESADA, M., MERCADO J. (2002). Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene, en: *Plant Physiology*. 128:751-759.

NARDI, C., VILLARREAL, N., ROSSI, F., MARTÍNEZ, S., MARTÍNEZ, G., CIVELLO P. (2015). Overexpression of the carbohydrate binding module of strawberry expansin2 in Arabidopsis thaliana modifies plant growth and cell wall metabolism, en: *Plant Molecular Biology*. 88:101-117.

NOGATA, Y., OHTA, H., VORAGEN, A. (1993). Polygalacturonase in strawberry fruit, en: *Phytochemistry*. 34:617-620.

PERINI, M., SIN, I. MARTÍNEZ, G., CIVELLO, P. (2017). Measurement of expansin activity and plant cell wall creep by using a commercial texture analyzer, en: *Electronic Journal of Biotechnology*. 26:12-19.

PERINI, M., SIN, I., VILLARREAL, N., MARINA, M., POWELL, A., MARTÍNEZ, G., CIVELLO, P. (2017). Overexpression of the carbohydrate binding module from Solanum lycopersicum expansin 1 (SI-EXP1) modifies tomato fruit firmness and Botrytis cinerea susceptibility, en: *Plant Physiology and Biochemistry*. 113:122-132.



QUEDASA, M., BLANCO-PORTALES, R., POSE, S., GARCIA-GAGO, J., JIMÉNEZ-BERMUDEZ, S., MUÑOZ-SERRANO, A., CABALLERO, J., PLIEGO-ALFARO, F., MECADO, J., MUÑOZ-BLANCO, J. (2009). Antisense Down-Regulation of the FaPG1 Gene Reveals an Unexpected Central Role for Polygalacturonase in Strawberry Fruit Softening, en: *Plant Physiology*. 150:1022-1032.

XIONG, A., YAO, Q., PENG, R., LI, X., HAN, P., FAN, H. (2005). Different effects on ACC oxidase gene silencing triggered by RNA interference in transgenic tomato, en: *Plant Cell Reports*. 23:639-646.

ZHANG, Q., FOLTA, K., DAVIS, T. (2014). Somatic embryogenesis, tetraploidy, and variant leaf morphology in transgenic diploid strawberry (*Fragaria vesca* subspecies *vesca* 'Hawaii 4'), en: *BMC Plant Biology*. 14:23.