

La sobreexpresión del CBM de la expansina 1 de tomate modifica la firmeza y la susceptibilidad a *Botrytis cinerea*

Perini M. ^(1,2), Sin I. ⁽¹⁾, Villarreal N. ⁽⁴⁾, María M. ⁽⁴⁾, Powell A. ⁽³⁾, Martínez G. ⁽⁴⁾, Civello M. ^(1,2)

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

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

(3) Plant Sciences Department, University of California, Davis. CA 95616. USA.

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

Dirección de e-mail: perini1987@gmail.com

Resumen

La firmeza es uno de los principales determinantes de la calidad poscosecha y está determinada por la resistencia mecánica impuesta por la pared celular. Las expansinas (proteínas sin actividad hidrolítica conocida) están implicadas en el desmantelamiento, no hidrolítico, de las paredes celulares vegetales. Dichas proteínas poseen una organización modular compuesta por un dominio catalítico putativo y un módulo de unión a carbohidratos (CBM). El CBM actuaría anclando a la expansina a la superficie de la celulosa, mientras que el dominio catalítico putativo interactuaría con las hemicelulosas en la superficie de las microfibrillas provocando la ruptura de los enlaces no covalentes, principalmente puentes de hidrógeno, existentes entre la celulosa y las hemicelulosas de la matriz. En el presente trabajo, se sobreexpresó de manera constitutiva el CBM de la expansina 1 de tomate (CBM-SIEXPA1), en la pared celular de plantas de tomate, siendo ésta la primera vez que un CBM se sobreexpresa en un fruto destinado a controlar la degradación de la pared celular y el ablandamiento del fruto. Los frutos de las plantas transgénicas presentaron un aumento en el contenido de pared celular y un aumento del contenido de acidez titulable en estadios intermedios de madurez fisiológica. Asimismo, fueron menos susceptibles a la infección por *B. cinerea*, y el crecimiento "in vitro" del hongo en medios suplementados con residuos insolubles en alcohol de pared celular del pericarpio de los frutos transgénicos fue menor que los controles (WT y acigotas). Se concluye que la sobreexpresión de un CBM en la pared celular sería una estrategia factible de utilizar para aumentar la vida poscosecha de frutos carnosos, como lo es el tomate, sin alterar el crecimiento de la planta.

Palabras Claves: tomate, CBM, poscosecha, expansinas, firmeza



Introducción

En Argentina, el tomate (*Solanum lycopersicum*) es la quinta hortaliza a nivel de producción, siendo el cinturón hortícola de la ciudad de La Plata uno de los principales productores de tomate fresco para consumo de la Pcia. de Buenos Aires. Un aspecto clave para optimizar el aprovechamiento de la producción es mejorar los aspectos ligados a la conservación poscosecha. El ablandamiento que se produce durante la maduración de los frutos carnosos es uno de los principales actores determinantes de su calidad y vida poscosecha. La firmeza del fruto depende de varios factores, incluyendo la rigidez mecánica determinada por la pared celular vegetal (Harker et al., 1997). La misma es una red de microfibrillas de celulosa incrustadas en una matriz compleja de pectinas y hemicelulosas. Durante la maduración del fruto, la acción combinada de proteínas y enzimas hidrolíticas producen la reducción, solubilización y la despolimerización de los componentes polisacáridos del pericarpio de la pared celular (Brummell, 2006). Se ha postulado que las expansinas causan la relajación de la estructura de la pared celular (debilitando las interacciones no covalentes entre la celulosa y las hemicelulosas) y de ese modo facilitan el acceso de otras enzimas a sus sustratos (Cosgrove, 2000).

A través de diversos estudios de los patrones de expresión y acumulación, a nivel de ARNm, se ha propuesto que las expansinas participan en modificaciones de la pared celular vegetal en diferentes momentos del crecimiento y desarrollo de una planta y durante el ablandamiento de un fruto (Cosgrove, 2000). En tomate se han reportado 38 genes de expansinas de los cuales seis de ellos se expresan en el fruto, siendo SIEXPA1 el que se destaca por sus características particulares asociadas a la maduración del fruto (Lu et al., 2015). Rose et al., (1997) identificaron a esta α -expansina específica del fruto en tomate, la cual se acumula durante la maduración a partir del estadio pintón (aparición de color anaranjado). Se ha informado que la supresión de la expresión de SIEXPA1 en tomate provocó la generación de frutos más firmes en relación a los controles acigotas a lo largo de la maduración, mientras que la sobreexpresión de dicho gen dio origen a frutos significativamente más blandos (Brummell et al., 1999). Asimismo, la supresión conjunta de SIEXPA1 y poligalacturonasa de *S. lycopersicum* en frutos de tomate permitió obtener frutos con menor susceptibilidad a *B. cinerea* (Cantu et al., 2008).

La estructura de la mayoría de las proteínas implicadas en el metabolismo de la pared celular posee una organización modular; incluyen un dominio catalítico putativo y uno o más módulos de unión a carbohidratos (CBM), unidos por una cadena no estructurada (Shoseyov et al., 2006). Un CBM se define como una secuencia de aminoácidos contigua dentro de una enzima con actividad sobre carbohidratos, con plegamiento predicho y capacidad de unirse a carbohidratos (Coutinho y Henrissat, 1999). En plantas, la presencia de CBMs putativos ha sido descrita en endoglucanasas (Levy and Shoseyov, 2002), α -L-arabinofuranosidasas (Sin et al., 2016) y expansinas (Nardi et al., 2015; Yennawar et al., 2006). La sobreexpresión de CBMs en diversos sistemas vegetales, provocan cambios en los fenotipos de estas plantas (Nardi et al., 2015; Safra-Dassa et al., 2006).

Por ello, se decidió sobreexpresar, de forma constitutiva, el CBM correspondiente a la expansina 1 de tomate, SIEXPA1, en la pared celular vegetal, teniendo como hipótesis que esto reduciría el acceso de expansinas endógenas y de otras enzimas a sus



sustratos, causando una reducción general en la degradación de la pared celular, y por lo tanto en el ablandamiento.

Materiales y Métodos

Transformación, generación y caracterización genotípica de las plantas

Para la generación del vector de interés con el inserto correspondiente, se empleó la tecnología de recombinación Gateway. Se empleó el vector binario, pK7WG2D.1, que conduce la expresión constitutiva del gen de interés bajo el promotor del virus del mosaico del coliflor (CaMV-P35S). Las especificaciones de la obtención de las plantas sobreexpresantes del CBM-SIEXPA1 en la pared celular de tomate que se emplearon para la realización del siguiente trabajo, se describen en Perini et al. (2017).

Para la caracterización genotípica de las plantas se emplearon frutos en el estadio de madurez pintón (Pi). Como gen de referencia se usó el gen del factor de elongación α 1 (SIEf1 α , Solyc06g005060) descrito en Pombo et al. (2014). Para el gen de interés (P35S-CBM-SIEXPA1) los cebadores específicos usados fueron: P35S-CBM-SIEXPA1 (directo): 5'-GCGGCCG CACTAGTGATA-3' (este cebador se diseñó sobre el 5'UTR de la secuencia de ADNc del promotor P35S) y P35S-CBM-SIEXPA1 (reverso): 5'TGCACCTGCTACATTCGTGA-3'. Estos cebadores se emplearon para verificar la integridad del ADNc obtenido (SIEf1 α) y luego determinar la presencia del transgen, de modo de poder clasificar las plantas como acigotas o sobreexpresantes del gen de interés (CBM-SIEXPA1).

Material vegetal y condiciones de cultivo

Las plantas de tomate fueron cultivadas en un invernadero bajo condiciones de luz natural y temperatura controlada (16-27 °C) en la ciudad de La Plata (Buenos Aires, Argentina) en macetas de 10 L en tierra:perlita (3:1) como sustrato. Para la clasificación de los estadios de madurez de los frutos se siguieron los siguientes criterios: Verde Maduro (VM), fruto desarrollado con piel completamente verde con tonalidades claras u oscuras; Pintón (Pi), hasta 20% de la superficie del fruto con colores amarillos y anaranjados a rojos; Rojizo (R), hasta 60% de la superficie del fruto con colores amarillo, anaranjado a rojos; Maduro (M), hasta 90% de la superficie del tomate con colores rosados o rojo.

Acidez titulable y pH

Frutos de tomate en cuatro diferentes estadios de madurez: (VM, Pi, R y M) con un peso comprendido entre 25 y 35 g, de plantas WT, acigotas y sobreexpresantes, se diseccionaron, trozaron y congelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Cinco gramos de frutos pulverizados se resuspendieron en 50 mL de agua destilada. El pH del homogeneizado se midió y el contenido de ácidos se determinó por titulación con NaOH 0,05 M hasta pH 8,2 (AOAC 981.12, 1998) utilizando un pHmetro Oakton (pH serie 1100). Las mediciones se realizaron por triplicado y la acidez titulable se expresó como mili-moles de H⁺ kg⁻¹ de fruto fresco.



Aislamiento de polisacáridos de la pared celular

Los polisacáridos totales de la pared celular se obtuvieron como residuo insoluble en alcohol (RIA) de acuerdo con Rosli et al., (2004) con algunas modificaciones. Aproximadamente 2,5 g de frutos (exocarpio y mesocarpio) en diferentes estadios de madurez (VM, Pi, R y M), previamente pulverizados con nitrógeno líquido, se homogeneizaron con 10 mL de etanol absoluto y la mezcla se hirvió (85 °C) a reflujo durante 30 min. Los homogeneizados se filtraron y los residuos sólidos se lavaron tres veces con 5 mL de etanol absoluto. Posteriormente, se secaron durante toda la noche a 37 °C y se pesaron con una balanza analítica de precisión. El RIA total se expresó como mg RIA por cada 100 mg de tejido (mg RIA 100 mg⁻¹fruto). Los RIA se obtuvieron a partir de tres tandas de frutos independientes.

Análisis de infección de B. cinerea y su tasa de crecimiento en placa

El estudio se realizó en frutos de plantas WT, acigotas (C22-P4) y transgénicas (C22-P2; C22-P5; C73-P4; C93-P3; C103-P2; C103-P3). Se usó la cepa B05.10 de *Botrytis cinerea* (Colección de cultivos fúngicos IIB-INTECH IFCC 458/02) en todos los experimentos.

Ensayos in vivo: Antes de la inoculación, se cultivó el micelio en medio Czapek-Dox sólido (50 g de glucosa, 2 g de NaNO₃, 1 g de KH₂PO₄, 0,5 g de MgSO₄.7H₂O, 0,5 g de KCl, 0,05 g de FeSO₄.7H₂O, 20 g de agar, pH = 5,5- 6.0) a 24 °C. Las placas se mantuvieron de 7 a 10 d en la oscuridad a temperatura ambiente para la esporulación. Para los ensayos de susceptibilidad, los conidios se cosecharon con agua estéril que contenía Tween-20 al 0,02% (v/v) y luego se filtraron y los conidios se contaron con un hemocitómetro. La concentración de inóculo se ajustó a 2 x 10⁴ conidios por mL con medio PDB, suplementado con 10 mM de sacarosa y 10 mM de KH₂PO₄. Los conidios se incubaron durante 2-3 horas a temperatura ambiente sin agitación antes de las inoculaciones (Flors et al., 2007). Para la inoculación, se colocaron cuatro gotas de 10 µL sobre la superficie superior no dañada de cada fruto. Se usaron de 3-6 frutos VM, R y M, de plantas WT, acigota y transgénicas. Los frutos se colocaron en una cámara de crecimiento a 22 °C en la oscuridad, y después de 1, 2, 4 y 7 d post inoculación se fotografiaron con una cámara digital y se evaluaron las lesiones.

Ensayo in vitro: Los polisacáridos de pared celular fueron extraídos como residuos insolubles en alcohol (RIA) tal como se explicó anteriormente. Para ello, se usó únicamente el mesocarpio del fruto, el cual se cortó, congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Se usaron 5 gramos de fruto R congelado para realizar la extracción. Una vez culminada la extracción, el residuo se secó y se pesó para evaluar la cantidad de RIA resultante. Para el ensayo, se transfirió un tapón de agar de 4 mm² de un cultivo activo de 5 d de edad de *B. cinerea* a las placas solidificadas con agar al 0,8% (p/v), 0,1mg mL⁻¹ de RIA de fruto. Las placas se cultivaron a 24 °C y se midió el área superficial de crecimiento de hongos en la placa después de 24, 48 y 72 h. Se utilizaron 3 extracciones de RIA independientes para cada genotipo de planta y se realizaron 3 réplicas técnicas. Las áreas superficiales del crecimiento del micelio de *B. cinerea* en las placas se midieron usando el software Image-Pro®Plus (Media Cybernetics Inc., San Diego, CA).



Resultados y Discusión

Con el fin de evaluar en detalle todos los efectos de la sobreexpresión del *CBM-SIEXPA1* las plantas transformadas se cultivaron durante dos generaciones, y la presencia de la expresión, a nivel de ARNm, de *CBM-SIEXPA1* se identificó en frutos en estadio Pintón (Figura 1). De las 24 plantas analizadas de la segunda generación, 17 resultaron ser positivas para la expresión del mismo (C22-P1, P2, -P3, -P5; C52-P4, -P5; C73-P3, -P4, -P5; C93- P1, -P2, -P3, -P4, -P5; C103-P2, -P3 y -P4), y éstas fueron identificadas como plantas transgénicas.

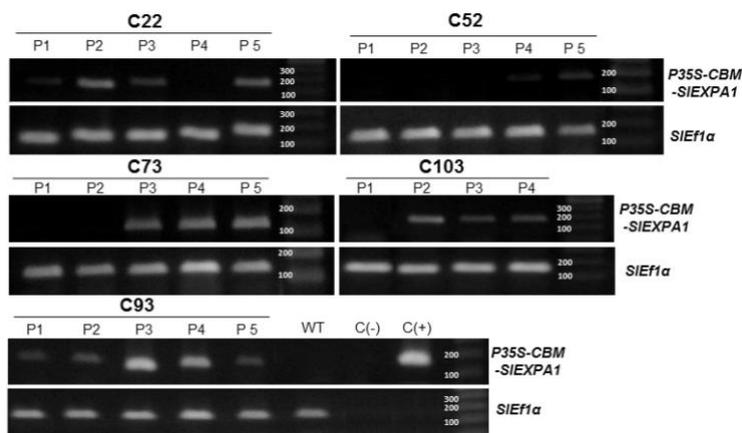


Figura 1. Expresión del gen de interés por RT-PCR en líneas transgénicas seleccionadas.

C22, C52, C73, C93 y C103 indican diferentes eventos de transformación y P1 a P5 indican diferentes plantas por evento. Tipo salvaje (WT); control negativo de RT-PCR (C (-)); control positivo de RT-PCR (C (+)). La RT-PCR generó un amplicón de 182 pb para el gen de interés y de 110 pb para el gen control de referencia.

Efecto de la sobreexpresión del CBM-EXPA1 sobre la acidez titulable

Los cambios de la calidad organoléptica de un fruto a medida que progresa la maduración pueden ser evaluados a través de la medida de una serie de parámetros fisicoquímicos. En tomate, algunos de esos parámetros son el pH, la acidez titulable, el contenido de sólidos solubles, entre otros (Klee y Giovannoni, 2011).

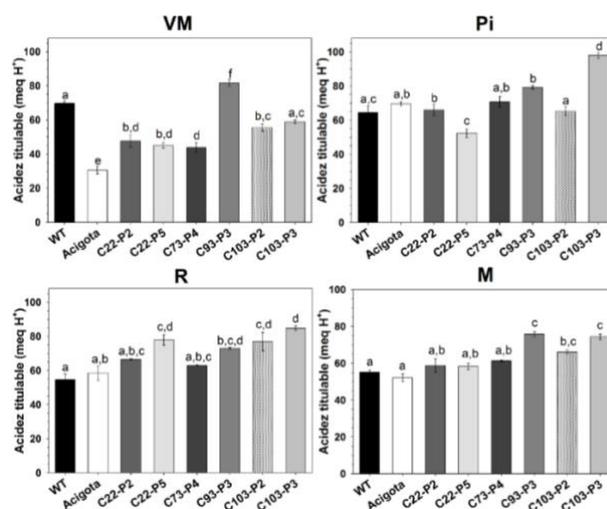


Figura 2. Cambios en la acidez titulable de frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del CBM-SIEXPA1 durante la maduración.

Los datos corresponden a la media \pm ES de 3 determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre frutos en un mismo estadio de madurez.

Los frutos sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1* presentaron un aumento de acidez titulable hacia los últimos estadios de madurez (Pi-M) en comparación con los frutos control (WT y acigota) mientras que no se observaron cambios en pH ni en el contenido de azúcares totales (datos no mostrados). Los perfiles de variación de los mismos fueron coincidentes con los que ya han sido descritos en tomate (la acidez titulable disminuye a medida que progresa la maduración, Heyes y Lugasi, 2006), El retraso en la caída de acidez podría deberse a un retraso madurativo de los frutos en planta para un mismo estadio de madurez fisiológico (figura 2).

Efecto de la sobreexpresión del CBM-SIEXPA1 en el contenido de pared celular

La arquitectura de la pared celular y los polímeros que la componen, se modifican progresivamente durante la maduración, variando la naturaleza o extensión de los mismos (solubilización y depolimerización) (Jarvis, 1984). En el caso de frutos carnosos, como el tomate, el contenido de RIA disminuye a medida que los frutos maduran. Este comportamiento fue observado para los frutos de todas las plantas ensayadas (Figura 3). Para el caso de los frutos controles, se observó que el contenido de RIA disminuyó del estadio VM a Pi para luego mantenerse constante en los siguientes estadios de madurez. En el caso de las plantas transgénicas, a excepción de los frutos de la planta C93-P3 la cual presentó un descenso muy leve, se observó que el descenso en el contenido de RIA fue más escalonado e incluso en algunos casos el descenso se observó a partir del estadio Pi (C22-P2, C103-P2, C103-P3). Del análisis del contenido de RIA por estadio de madurez (análisis estadístico no mostrado), se observa que, hacia los estadios de madurez más avanzados (R, M) el contenido de pared celular de los frutos transgénicos es mayor que en los controles



(WT y acigota). Resultados similares se obtuvieron del análisis del contenido de pared celular de hojas y tallos de plantas de *A. thaliana* sobreexpresantes del *CBM-FaEXPA2*, siendo el contenido de RIA de las plantas sobreexpresantes mayor respecto a plantas WT (Nardi et al., 2015). Esto indica que la sobreexpresión de CBMs provocaría un retardo en la degradación de los componentes de la pared celular.

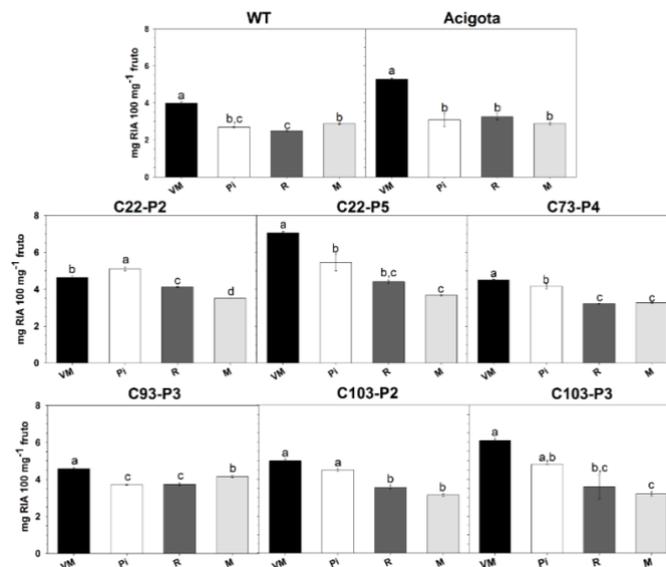


Figura 3. RIA en frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del CBM-SIEXPA1.

Los datos corresponden al contenido medio de RIA \pm ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de una misma planta.

Efecto de la sobreexpresión de CBM-SIEXPA1 sobre la susceptibilidad a la infección por B. cinerea

B. cinerea es uno de los hongos patógenos de tipo necrófago más estudiado, responsable de la enfermedad del moho gris y un contribuyente significativo a la descomposición poscosecha de los frutos carnosos. La infección de frutos frescos con conidios del hongo indicó que los frutos sobreexpresantes son menos susceptibles al crecimiento del patógeno (Tabla 1).



Tabla 1. Síntomas de infección sobre frutos sanos inoculados.

Frutos	Tiempo (DPI)			
	1	2	4	7
WT	+/-	+	++	++
Acigota	+/-	+	++	++
C73-P4	-	-	+/-	+
C93-P3	+/-	+/-	+	+
C103-P3	-	+/-	+	+

Diferentes grados de daño: (-), sin síntomas de infección; (+/-), insipiente lesión sobre zona de infección; (+), lesión húmeda sobre zona de inoculación; (++) , lesión húmeda sobre zona de inoculación y síntomas de putrefacción.

Por su parte, el cultivo "in vitro" de *B. cinerea* sobre medios conteniendo la misma cantidad de RIA de plantas controles y transgénicas, como única fuente de carbono, indicó que el hongo crecía menos con RIAs de plantas transgénicas como sustrato (Figura 4). De este modo, el menor crecimiento del hongo sobre RIAs provenientes de frutos transgénicos puede atribuirse a la presencia de una pared celular más íntegra. Un resultado similar fue descrito en hojas de *A. thaliana* sobreexpresantes del *CBM-FaEXPA2*, las cuales eran menos susceptibles al crecimiento de dicho hongo con relación a hojas WT. Un resultado contradictorio fue descrito en el caso de frutos de tomate que tenían suprimido el gen de *SIEXPA1*. Brummell, et al., (2002) determinaron la presencia de lesiones más grandes de la enfermedad en frutos que poseían a *SIEXPA1* suprimida cuando fueron expuestos a *B. cinerea* y a *A. alternata*. De otro modo, frutos de tomate con supresión simultánea de *SIEXPA1* y *SIPG*, el gen de la poligalacturonasa asociada a la maduración, fueron menos susceptibles a la infección por *B. cinerea* que los controles (Cantu et al., 2008).

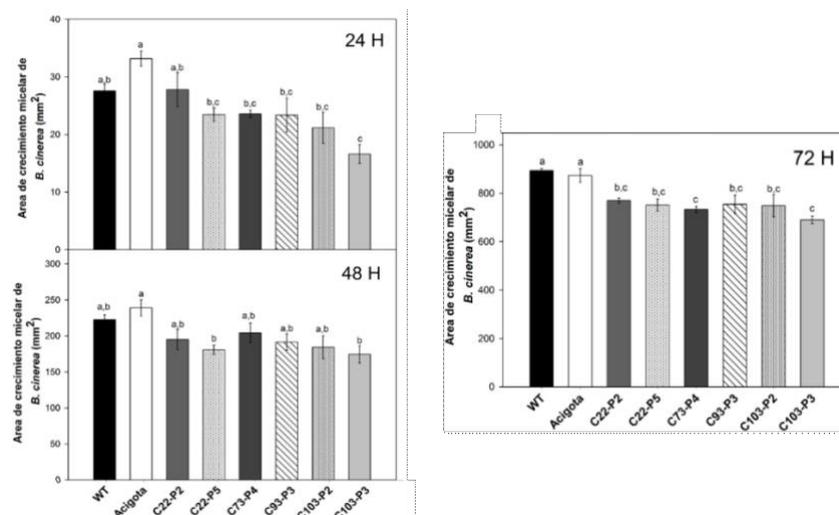


Figura 4. Crecimiento de *B. cinerea* en placas



Los datos corresponden al área de crecimiento del micelio de *B. cinérea* +/- ES de tres determinaciones independientes. Los resultados se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Las letras indican diferencias estadísticas significativas.

Conclusiones

La sobreexpresión de un CBM de expansina en la pared celular sería una estrategia factible de utilizar para retrasar el ablandamiento y aumentar la vida poscosecha del tomate, y posiblemente de otros frutos carnosos.

Referencias

- AOAC. (1998). Official Methods of Analysis, 16thed. AOAC International. Gaithersburg, USA.
- BRUMMELL, D., 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit, en: *Functional Plant Biology*. 33:103–119.
- BRUMMELL, D., HOWIE, W., MA, C., DUNSMUIR, P., 2002. Postharvest fruit quality of transgenic tomatoes suppressed in expression of a ripening-related expansin. , en: *Postharvest Biology and Technology*. 25:209–220.
- 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.
- CANTU, D., VICENTE, A., LABAVITCH, J., BENNETT, A., POWELL, A., 2008. Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends Plant Science*. 13:610–617.
- COSGROVE, D., 2000. Loosening of plant cell walls by expansins, en: *Nature*. 407:321–326.
- COUTINHO, P., HENRISSAT, B. (1999). In Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach, en: *The Royal Society of Chemistry*. 3–12.
- FLORS, V., LEYVA, M., VICEDO, B., FINITI, I., REAL, M., GARCÍA-AGUSTÍN, P., BENNETT, A., GONZÁLEZ-BOSCH, C., 2007. Absence of the endo- β -1,4-glucanases Cel1 and Cel2 reduces susceptibility to Botrytis cinerea in tomato, en: *Plant Journal*. 52:1027–1040.
- HARKER, F., REDGWELL, R., HALLETT, I., MURRAY, S., CARTER, G., 1997. Texture of fresh fruit, en: *Horticultural Review (Am. Soc. Hortic. Sci)*. 20:121–224.
- HELYES, L., LUGASI, A. (2006). Formation of certain compounds having technological and nutritional importance in tomato fruits during maturation, en: *Acta Alimentaria*. 35:183–193.
- JARVIS, M.C., 1984. Structure and properties of pectin gels in plant-cell walls, en:



Plant Cell and Environment. 7:153–164.

KLEE, H.J., GIOVANNONI, J.J., 2011. Genetics and Control of Tomato Fruit Ripening and Quality Attributes, en: *Annual Review of Genetics*. 45:41–59.

LEVY, I., SHOSEYOV, O., 2002. Cellulose-binding domains: Biotechnological applications, en: *Biotechnology Advances*. 20:191–213.

LU, Y., LIU, L., WANG, X., HAN, Z., OUYANG, B., ZHANG, J., LI, H., 2015. Genome-wide identification and expression analysis of the expansin gene family in tomato, en: *Molecular Genetics and Genomics*. 291:597–608.

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.

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 (Sl-EXP1) modifies tomato fruit firmness and *Botrytis cinerea* susceptibility, en: *Plant Physiology and Biochemistry*. 113:122–132.

POMBO, M., ZHENG, Y., FERNANDEZ-POZO, N., DUNHAM, D., FEI, Z., MARTIN, G., 2014. Transcriptomic analysis reveals tomato genes whose expression is induced specifically during effector-triggered immunity and identifies the Epk1 protein kinase which is required for the host response to three bacterial effector proteins, en: *Genome Biology*. 15:492.

ROSE, J., LEE, H., BENNETT, A. (1997). Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated, en: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:5955–5960.

ROSLI, H., CIVELLO, P., MARTÍNEZ, G., 2004. Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening, en: *Plant Physiology and Biochemistry*. 42:823–831.

SAFRA-DASSA, L., SHANI, Z., DANIN, A., ROIZ, L., SHOSEYOV, O., WOLF, S., 2006. Growth modulation of transgenic potato plants by heterologous expression of bacterial carbohydrate-binding module, en: *Molecular Breeding*. 17:355–364.

SHOSEYOV, O., SHANI, Z., LEVY, I., 2006. Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications, en: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70:283–95.

SIN, I., PERINI, M., MARTÍNEZ, G., CIVELLO, P., 2016. Analysis of the carbohydrate-binding-module from *Fragaria x ananassa* α -L-arabinofuranosidase 1, en: *Plant Physiology and Biochemistry*. 107:96–103.

YENNAWAR, N., LI, L., DUDZINSKI, D., TABUCHI, A., COSGROVE, D., 2006. Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a beta-expansin and group-1 pollen allergen from maize, en: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103:14664–14671.