



Memoria presentada por

Nieves Santiago Doménech

Para optar al grado de Doctora por la Universidad de Málaga

**Caracterización de la pared celular de frutos de fresa (*Fragaria x
ananassa* Duch.): cambios durante el desarrollo y efectos del
silenciamiento de un gen de pectato liasa**

Directores: Drs. Miguel Ángel Quesada Felice y

Antonio Javier Matas Arroyo

Departamento de Biología Vegetal

Área de Fisiología Vegetal

Universidad de Málaga

Málaga, 2016





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Nieves Santiago Doménech

 <http://orcid.org/0000-0003-2319-1607>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Miguel Ángel Quesada Felice, Catedrático del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga, y Antonio Javier Matas Arroyo, Investigador “Ramón y Cajal” del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga

INFORMAN:

Que, la Licenciada D^a Nieves Santiago Doménech ha realizado bajo nuestra dirección en este Departamento el trabajo titulado “Caracterización de la pared celular de frutos de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.): cambios durante el desarrollo y efectos del silenciamiento de un gen de pectato liasa”. La presente memoria recoge los principales resultados obtenidos y se presenta para su defensa pública para aspirar al grado de Doctora

Para que conste, y tenga los efectos que correspondan, en cumplimiento de la legislación vigente, extendemos el presente informe autorizando la defensa.

En Málaga, a 13 de noviembre de 2015

Dr. Miguel Ángel Quesada Felice

Dr. Antonio Javier Matas Arroyo



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Mucho tiempo ha pasado desde que empecé a trabajar en esta tesis, y por distintas circunstancias se ha ido retrasando, pero al fin está aquí. Son muchas las personas que durante este tiempo he conocido y que de alguna manera me han ayudado y a las que me gustaría agradecer su apoyo y seguramente a alguien se me olvidará nombrar y lo siento.

Para empezar me gustaría agradecer a mis directores el ofrecerme esta oportunidad, especialmente a Miguel Ángel Quesada por contar conmigo y ofrecerme la oportunidad de realizar este trabajo, gracias por tu gran ayuda, tu apoyo, tu respaldo y porque no olvidas nunca ese lado más personal. A Antonio Matas porque siempre está dispuesto a ayudar, por ser un pozo de sabiduría con quien siempre se aprende algo, y por ayudarme y enseñarme tantas cosas en esta última etapa. Y como no a José Ángel Mercado, que es parte de este trabajo y aunque por circunstancias no ha podido ser director yo considero que lo es. Gracias José Ángel siempre se puede contar contigo y siempre con buena condición. Muchas gracias a los tres de corazón.

A Fernando, quiero agradecer el dejarme practicar el cultivo *in vitro* con el stock de fresas, a partir de ahí vinieron muchas más oportunidades. Y por contarnos tantas batallitas y proveernos los desayunos.

Varias "generaciones" de compañeros estupendos han pasado por el laboratorio desde que empecé en este mundillo. Quiero agradecerle a Lara, amiga desde que despistadas buscábamos a alguien más de vegetal, el que me diera el empujoncillo para venir al departamento, a Gema, Maca, Sabri, Belén, Adolfo y Lourdes con quienes tan buenos momentos he pasado, esta etapa empezó con vosotros y fue muy especial para mí.

A Elena, Sara, Sergio, Fatiha, Candelas aunque ya no estáis por aquí, habéis crecido como estupendos científicos y mejores personas, ahí están los resultados;

con todos he aprendido algo, gracias por hacer del laboratorio un lugar estupendo donde trabajar y por darme tantos ánimos con la tesis. A Juan Antonio y Rafa que empezamos en *Genética* y luego coincidimos en *Fisio*, y con quienes tan buenos momentos he pasado. A Carmen, gracias por esas charlitas rápidas haciendo medio, a ver si es verdad que conseguimos quedar por Málaga... o San Pedro.

A las nuevas incorporaciones Isa, Dani, Juan, Pablo y Luis gracias chicos por hacer esto más llevadero y comprenderme estos últimos meses. A José Antonio, M^a Jesús, Bea, Karima, Delia y Caro por compartir el día a día y esos desayunos tan animados.

Quiero agradecer especialmente a Lara, Sara, Antonio y Candelas el que me hayan dejado utilizar algunas de sus fotografías y esquemas para ponerlas en la memoria. También a Dani del SCAI por hacerme un hueco en la cámara fría para poder realizar las cromatografías. Al grupo de Eduardo Rodríguez del Departamento de *Genética*, que me iniciaron en la parte más molecular, especialmente a Gabriel que tanto me enseñó.

A Marta gracias por tu apoyo y tus mensajes los fines de semana preguntando qué tal y haber hecho estos últimos meses más llevaderos, los nervios compartidos son menos, ¿verdad?

A los vecinos de Fisiología animal: Manolo, Juan, Jesús, Pedro, Marga, M^a Dolores, Silvia, Mar, que con sus risas y su buen humor hacen del trabajo un lugar más agradable. A José Esteban que da mucha alegría cuando viene a vernos, a M^a Dolores por compartir tantos momentos en la facultad y fuera de ella, a Silvia todo alegría y positividad, gracias amiga.

A mis compañeros de los laboratorios comunes del Severo Ochoa Emilia, Carlos y Dani y del I+D Ali, Alicia, Carmen, M^a Carmen con quienes tantos ratos he pasado. A Lucía Cruzado, por esas charlas en los pasillos y su ánimo continuado.

A mis amigos del parque, que sois mi familia malagueña Paqui, Belén, Mónica, Jose, Francis y Cándido ¡¡vaya panda de amigos tan apañada!! y como no, a mis niños Paula, Samuel, Pablo y Mario.

A mis amigas de San Pedro, Luz eres todo un ejemplo de superación, sigue así guapa. A M^a Paz, Esther, Silvia y Cristina por no olvidar un cumple y aunque nos veamos poco siempre os llevo conmigo.

Agradecer a mi familia, especialmente a mis padres ya que sin ellos seguramente no me habría dedicado a esto, me han enseñado a no rendirme y a luchar por lo que quiero; gracias por vuestro apoyo incondicional siempre. A mis hermanos Willi, Rocío e Ignacio que sois los mejores y gran apoyo e inspiración, os quiero mucho guapos, a mis sobrinos Isaac, Lola, Mar, Julia y Lorenzo, y a Rafa, Rosa y Sandra. A mi familia ubriqueña Paco, Rocío, Mercedes M^a José y Paco por hacerme sentir parte integrante de esta familia desde el principio y a mis sobrinos Blanca, María, Paco, Cristina, David y Alejandra y a Juan, David y Paco. Por último aunque debería haber empezado por aquí a Irene, mi niña, mi vida y a JoseMa, gracias por estar ahí, comprenderme y quererme.

Gracias a todos aquellos que no habéis permitido que olvidara que tenía la tesis pendiente.

Gracias!!!



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FUENTES DE FINANCIACIÓN:

El presente trabajo fue parcialmente financiado por los proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia y Fondos FEDER EU (AGL2005-08128) y del Ministerio de Economía y Competitividad y Fondos FEDER EU (AGL2014-55784-C2-1-R) además del Plan Propio de la Universidad de Málaga.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

RESUMEN

Los frutos de fresa sufren un rápido reblandecimiento durante su maduración provocando una importante pérdida de producción en el periodo postcosecha. Se ha descrito que durante la maduración las paredes celulares de las células parenquimáticas del fruto sufren modificaciones que alteran su composición y su estructura produciendo el desmantelamiento que lleva al reblandecimiento, por lo que es necesario contar con un buen protocolo de extracción de paredes celulares para poder estudiar estos cambios producidos.

Los resultados de la aplicación de varios protocolos de extracción de paredes celulares descritos en la bibliografía, además de una modificación propia de uno de ellos, indicaron que el protocolo de Redgwell y col. (1992) produce mejores resultados en cuanto a rendimiento, además de provocar una menor degradación en los polímeros pécticos. Asimismo, las mejoras introducidas han permitido medir la fracción de pectinas unidas covalentemente a la pared, la eliminación de interferencias en la fracción de pectinas más solubles de la pared, así como la reducción de la cantidad de muestra necesaria y el tiempo empleado en la realización de las cromatografías, principalmente por la disminución del tamaño de la columna.

Aplicando estos protocolos en distintos estadios durante la maduración del fruto de fresa se observan una serie de cambios importantes. Así, se ha encontrado una disminución drástica de la cantidad de pared a la vez que las fracciones de pectinas incrementan su proporción llegando a superar el 50% en fruto maduro. Durante la maduración se produce, además, una solubilización de las pectinas acompañada de un incremento en ácidos urónicos al pasar de estadio verde a rojo. Se produce simultáneamente una despolimerización de las pectinas más fuertemente unidas a la pared primaria, sobre todo de la fracción unida covalentemente, y también de las hemicelulosas. Todos estos cambios alteran las interacciones físicas entre los componentes poliméricos de la pared, aumentando el tamaño de poro y apoyando la idea de que la pared se degrada durante la maduración.

Por otra parte, el silenciamiento de la pectato liasa produce frutos en estadio rojo más duros que los frutos control, como consecuencia de la alteración de las interacciones y el procesamiento entre los distintos componentes estructurales de la matriz péctica. En este trabajo se muestra una menor solubilización de pectinas de los polímeros pécticos, además de producirse una despolimerización de las fracciones pécticas más fuertemente unidas sobre todo en la fracción unida covalentemente, y de la fracción de la hemicelulosa. Todo esto indicaría que el silenciamiento de la pectato liasa modifica el procesamiento de las pectinas, influyendo en las interacciones de dichos polímeros y en la adhesión entre células parenquimáticas de estos frutos. La pectato liasa se incluiría en el grupo de pectinasas que, junto a la poligalacturonasa y la pectin metilesterasa, estarían implicadas en el desmantelamiento de la pared celular responsables en última instancia del reblandecimiento del fruto.

ABREVIATURAS

Ac Gluc: Ácido glucurónico

AGP: Arabinogalactano

AIS: Sólido Insoluble en Alcohol

Apel: Antisentido pectato liasa

Ara: Arabinofuranosida

Arab: Arabinosa

AU: Ácidos urónicos

AZU: Azúcares

CDTA: Ácido trans-1, 2-diamino Ciclohexano N,N,N',N' tetraacético monohidrato

CWM: Cell Wall Material

DMSO: Dimetil sulfóxido

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético

EGasa: Endoglucanasa

EXP: Expansina

GalA: Ácido galacturónico

Gluc: Glucosa

GRP: Proteína rica en glicina

H: Protocolo de Huber

HCl: Ácido clorhídrico

HGA: Homogalacturonano

HM: Protocolo de Huber modificado

HRGP: Proteína rica en hidroxiprolina

KOH: Hidróxido potásico

NaBH: Sodio borohidrido

O: Oxígeno

PAW: fenol, acético y agua, por las siglas del inglés

PC: Pared Celular

PG: Poligalacturonasa

PL: Pectato Liasa

PME: Pectin metilesterasa

PRP: Proteína rica en prolina

R: Protocolo de Redgwell

Ramn: Ramnosa

RG I: Ramnogalacturonano I

RG II: Ramnogalacturonano II

Xyl: Xilosa



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

CAPÍTULO 1.- Introducción	1
1.1.- Generalidades de la fresa	3
1.2.- Importancia del cultivo de fresa	4
1.3.- Características generales de la planta	5
1.3.1.- Morfología de la planta	5
1.3.2.- Morfología del fruto	8
1.4.- Aspectos generales del crecimiento y maduración del fruto de fresa	9
1.5.- La pared celular	12
1.5.1.- Composición y estructura de la pared celular primaria	13
1.5.1.1.- Fase microfibrilar	15
1.5.1.2.- Matriz de polisacáridos hemicelulósicos	15
1.5.1.3.- Pectinas	16
1.5.1.4.- Proteínas estructurales	20
1.5.1.5.- Componentes fenólicos	21
1.5.2.- Extracción y análisis de la pared celular en fruto	22
1.5.3.- Papel de la pared celular en los cambios de textura de los frutos	23
1.6.- Modificaciones de la pared celular del fruto de fresa durante la maduración	25
1.7.- Enzimas involucradas en los cambios de textura del fruto	28
1.7.1.- Poligalacturonasa (PG)	29
1.7.2.- Pectato liasa (PL)	31
1.7.3.- Pectin metilesterasa (PME)	33
1.7.4.- Endo β 1-4- D glucanasa (EGasa)	34
1.7.5.- Expansinas (EXP)	35
1.7.6.- Otros genes de pared	36
1.8.- Silenciamiento del gen pectato liasa en fresa	37
CAPÍTULO 2.- Objetivos	41

CAPÍTULO 3.- Material y métodos	45
3.1.- Material Vegetal	47
3.2.- Metodología	47
3.2.1.- Extracción de la pared celular	47
3.2.1.1.- Protocolo de extracción de Redgwell	48
3.2.1.2.- Protocolo de Huber	49
3.2.1.3.- Modificación del protocolo de extracción de Huber	51
3.2.2.- Fraccionamiento de la pared celular	53
3.2.3.- Cuantificación de pectinas	55
3.2.4.- Cuantificación de azúcares totales	56
3.2.5.- Cromatografía de filtración en gel	57
3.2.6.- Hinchamiento de la pared celular	58
3.2.7.- Medida de poliurónidos totales de la pared celular	60
3.2.8.- Medida de antocianinas	60
3.2.9.- Análisis de elementos esenciales	61
3.2.10.- Medida de la dureza de los frutos	62
3.2.11.- Caracterización histológica de frutos de fresa	62
3.2.12.- Análisis estadístico de los datos	63

CAPÍTULO 4.- Elección y puesta a punto del protocolo de extracción y fraccionamiento de la pared celular	65
4.1.- Extracción de pared celular y fraccionamiento	67
4.2.- Cantidad de poliurónidos obtenidos	71
4.3.- Contenido de elementos esenciales en las paredes obtenidas	73
4.4.- Cromatografía de filtración en gel de las fracciones de pared celular	75
4.4.1.- Perfiles cromatográficos de las pectinas solubles (fracción PAW y fracción AGUA)	76
4.4.2.- Perfiles de pectinas unidas iónicamente (fracción CDTA)	79

4.5.- Muestras de pectinas unidas covalentemente (fracción CARBONATO)	81
4.6.- Mejoras posteriores del protocolo de extracción	84
4.7.- Discusión	86

CAPÍTULO 5.- Efecto de la maduración en la degradación de las paredes celulares del fruto de fresa

5.1.- Extracción de pared celular y fraccionamiento	92
5.2.- Cantidad de poliuronidos obtenidos	95
5.2.1.- Medidas de ácidos urónicos	95
5.2.2.- Medidas de azúcares	97
5.3.- Elementos esenciales rojo/verde	99
5.4.- Hinchamiento <i>in vitro</i> de la pared celular	100
5.4.1.- Hinchamiento de la pared durante la maduración	101
5.4.2.- Tratamientos con carbonato, CDTA y calcio	102
5.5.- Cromatografía de filtración en gel de las fracciones de pared celular	104
5.5.1.- Perfiles cromatográficos de las pectinas solubles (fracción PAW y fracción AGUA)	104
5.5.2.- Perfiles de pectinas unidas iónicamente (fracción CDTA)	108
5.5.3.- Perfiles de pectinas unidas covalentemente (fracción CARBONATO)	110
5.5.4.- Perfiles de hemicelulosa (fracción KOH 4M)	112
5.6.- Discusión	114

CAPÍTULO 6.- Efecto de la inhibición por tecnología antisentido de un gen de pectato liasa en la despolimerización de las pectinas y el reblandecimiento del fruto de fresa

6.1.- Introducción	121
--------------------	-----



6.2.- Resultados	124
6.2.1.- Estabilidad temporal del fenotipo transgénico “más duro” y comparación del estado de maduración de los distintos genotipos estudiados	124
6.2.2.- Extracción y fraccionamiento de la pared celular	126
6.2.3.- Contenido de pectinas y solubilización	128
6.2.4.- Análisis de las fracciones solubles mediante cromatografía de filtración en gel	130
6.2.5.- Análisis de las fracciones unidas a pared celular por cromatografía de filtración en gel	132
6.2.6.- Discusión	139
CAPÍTULO 7.- Conclusiones	153
CAPÍTULO 8.- Bibliografía	157
CAPÍTULO 9.- Anexos	179



CAPÍTULO 1.
Introducción



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1.- Introducción

1.1.- Generalidades de la fresa

Tanto la fresa cultivada como la silvestre pertenecen al género *Fragaria* de la familia *Rosaceae* y son cultivadas por su fruto comestible. El género *Fragaria* comprende al menos 23 especies (Folta y Davis, 2006), y su número básico de cromosomas es $x=7$.

La fresa cultivada comercialmente o fresón, *Fragaria x ananassa* Duch. es, en realidad, un híbrido estable octoploide ($2n=8x=56$) y ha reemplazado a nivel de producción a la especie silvestre, *Fragaria vesca*, por el mayor tamaño de sus frutos. Las especies de fresa de las que deriva, fueron introducidas en Europa en el siglo XVIII. Este híbrido se produjo por un cruzamiento espontáneo en jardín entre dos especies silvestres, también octoploides, de origen americano: *Fragaria virginiana* y *Fragaria chiloensis*. Con la llegada a Europa de la fresa de Virginia se obtuvieron nuevas variedades que ganaron en tamaño pero perdieron en sabor. Más tarde la hibridación entre ésta y la variedad chilena produjo plantas con frutos más grandes y sabrosos.

El híbrido *Fragaria x ananassa* Duch. es hermafrodita y presenta un alto grado de heterocigocidad. Estas características, junto a la posibilidad de cruzamiento entre sus distintas variedades, han facilitado la mejora de caracteres de interés agronómico tales como la productividad, precocidad y el tamaño de fruto (Senanayake y Bringurst, 1967), permitiendo mediante mejora genética tradicional la aparición de numerosos cultivares adaptados a un amplio rango de condiciones ambientales posibilitando que la fresa se cultive a nivel mundial.

El fruto de fresa se consume como fruto fresco o como producto procesado en mermeladas y zumos. Las fresas y los fresones no son un elemento esencial de la dieta. Son frutas que aportan pocas calorías y cuyo componente más abundante, después del agua, son los hidratos de carbono (fructosa, glucosa y xilitol), destacando también por el aporte de fibra, como fuente de vitamina C, mayor que la de los cítricos,

ácido elágico y flavonoides, compuestos de gran interés por sus propiedades anticarcinogénicas y preventivas de enfermedades cardiovasculares (Hannum, 2004). Al ser un fruto estacional que marca el comienzo de la primavera y con una disponibilidad limitada, su consumo es más deseable que el de otros frutos a los que se tiene acceso todo el año. Es un fruto muy delicado y con marcado carácter perecedero y hay que cuidar la calidad, aspecto y textura para evitar su depreciación, siendo éste el principal reto para productores y distribuidores. Estas características se encuentran entre los objetivos prioritarios de los programas de mejora de este cultivo (Faedi y col., 2002).

1.2.- Importancia del cultivo de fresa

La producción mundial de fresa se ha incrementado constantemente desde mediados del siglo pasado. Así, en el periodo 1980-2004, el área cultivada se incrementó un 25% y la producción un 73% (Mercado y col., 2007), y desde esa fecha hasta 2013 la producción ha aumentado un 32%, alcanzando en el año 2013 una producción total de 4,9 millones de toneladas (FAOSTAT, 2013). España, en el año 2013, con un 4% de la producción mundial, es el quinto país productor de fresa tras China (38%), Estados Unidos (17,5%), México (4,9%) y Turquía (4,8%).

Según los últimos datos conocidos de 2013, España es el segundo productor europeo de fresa con 312.500 toneladas tras Turquía con 372.498 toneladas, seguido de Polonia con 192.647 y Alemania con casi 155.000 toneladas. Debido a la aparición de nuevos competidores en el cultivo de la fresa, nuestro país está experimentando un retroceso de la superficie cultivada en los últimos años. En el año 2000 había 11.000 hectáreas de fresa cultivadas y en 2014 se han reducido a 8.000 hectáreas (Datos de FAOSTAT consultados en octubre de 2015). Aun así, nuestro país muestra una gran expansión de este cultivo no tanto en términos de superficie como de rendimiento, encontrándose como el tercer país a nivel mundial, después de EEUU y México.

La provincia de Huelva aporta más del 90% de la producción nacional. Desde un punto de vista agronómico, se importó inicialmente tanto la tecnología de cultivo como las variedades desarrolladas en California, principal zona productora de fresa a nivel mundial y también la más activa en cuanto a los programas de mejora para este cultivo (Sjulin, 2003). Esta tecnología se ha ido adaptando a las condiciones bioclimáticas de la zona de Huelva, dando lugar a un sistema de cultivo característico y a un tipo de fruto de gran tamaño que es emblemático en el mercado europeo.

La producción de fresa en España se encuentra, como hemos mencionado, principalmente en los campos de la provincia de Huelva, donde ocupa unas 7.000 hectáreas en régimen de monocultivo. Menor importancia, pese a su mayor tradición, tienen los cultivos de la Comunidad Valenciana y otros dispersos por España (Castilla y León, Galicia y Cataluña) (Tello-Marquina, 1996; Bartual y col., 2006). El 80% de la producción española se dedica a exportación, siendo nuestro país el principal abastecedor de fresa en el mercado Europeo durante los meses de invierno. Solamente el 17% de la producción nacional es destinada a su transformación y procesado (Olías y col., 1995).

Aunque se carece de estudios detallados, se estima que entre el 5-30% de la producción de fresa para consumo se pierde debido a contaminación fúngica y/o deterioro del producto durante la postcosecha. El rápido deterioro y putrefacción que sufren los frutos es debido, en buena medida, al proceso de reblandecimiento asociado a la maduración. Por ello, la búsqueda de métodos para alargar la vida postcosecha y mejorar la textura del fruto es prioritaria en este cultivo (Faedi y col., 2002; Mercado y col., 2007).

1.3.- Características generales de la planta

1.3.1.- Morfología de la planta

La planta de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) es una planta perenne que produce brotes nuevos cada año. Aunque de aspecto herbáceo, es en realidad una

especie leñosa (Figura 1.1). El tallo está comprimido en una roseta de aproximadamente 2,5 cm de longitud de donde surgen las hojas y los tallos florales, ambos de la misma longitud. El tallo, también denominado “corona”, produce hojas en muy estrechos intervalos, flores en posición terminal y raíces en su base; además produce en la axila de la hoja yemas o meristemos axiales, que pueden transformarse en ramas, flores o estolones, dependiendo de las condiciones ambientales. Las hojas aparecen en roseta y son largamente pecioladas y provistas de dos estípulas rojizas. Su limbo está dividido en tres folíolos, con bordes aserrados. Sus folíolos tienen un gran número de estomas (300-400/mm²). El sistema radicular es fasciculado o fibroso (con aspecto de cabellera) (Figura 1.1) y se origina también en la corona. Las raíces son responsables del soporte de la planta y de la absorción de nutrientes. Estas pueden penetrar en el suelo hasta 80 cm pero, generalmente, se encuentran ubicadas en los 40 primeros cm.

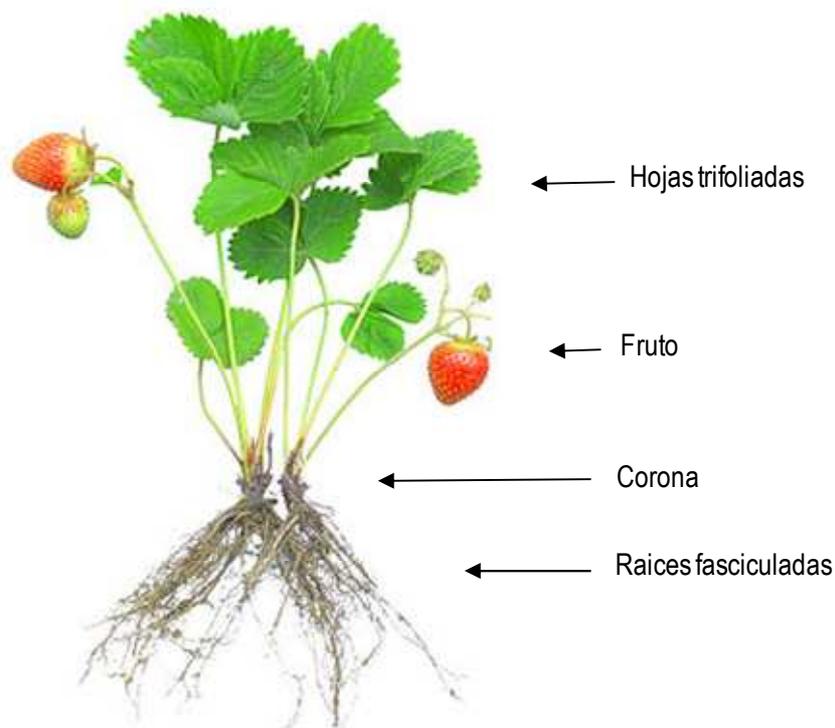


Figura 1.1: Características generales de una planta de fresa. Presenta raíces fasciculadas, un tallo corto que forma la corona y hojas trifoliadas. Autor: Mark Hofstetter. Fuente Wikimedia commons. Distribuido bajo una licencia CC-BY-SA 2.5.

Las flores se ubican en inflorescencias o ramilletes florales. Las inflorescencias son largas y se pueden desarrollar a partir de una yema terminal de la corona o de yemas axilares de las hojas. La flor tiene 5 sépalos, normalmente 5 pétalos de color blanco rosado, numerosos estambres y varios cientos de pistilos sobre un receptáculo carnoso (Figura 1.2 A). Las flores son polinizadas por insectos, especialmente abejas y por el viento (Branzanti, 1989; Chagnon y col., 1993). Cada óvulo fecundado da lugar a un fruto tipo aquenio (Perkins-Veazie, 1995).

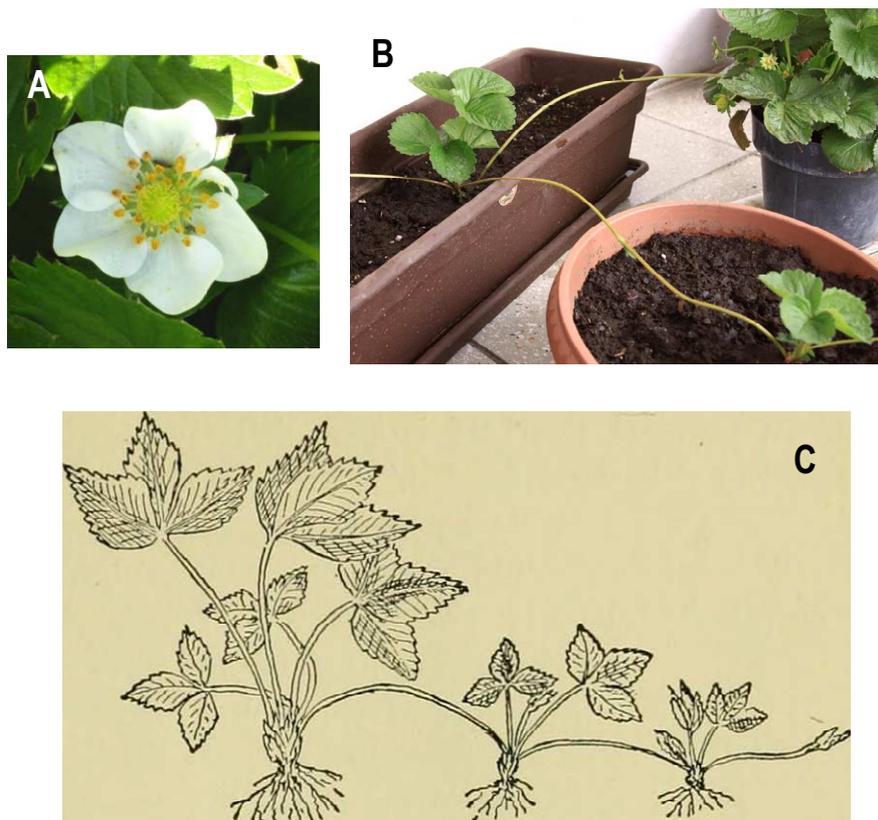


Figura 1.2: Detalles vegetativos de la planta de fresa. **A:** Detalle de una flor de fresa. **B:** Fotografía de una planta de fresa estolonando en maceta (Imagen de Gabriela Hernández Paulín, se encuentra bajo una Licencia Creative Commons. Atribución-CompartirIgual 3.0 Unported). **C:** Esquema de una planta de fresa con los estolones (Imagen de dominio público).

Los estolones son unos brotes delgados, largos y rastreros que se forman a partir de las yemas axilares de las hojas situadas en la base de la corona (Figura 1.2 C). Son la base de la multiplicación vegetativa de la fresa (Figura 1.2 B) y se desarrollan en gran cantidad en épocas de alta temperatura y fotoperiodos largos. En el extremo

del estolón se forma una roseta de hojas que en contacto con el suelo emite raíces, originando una nueva planta con caracteres idénticos a los de la madre.

1.3.2.- Morfología del fruto

Botánicamente, una fresa es un falso fruto agregado, originado a partir del tejido del receptáculo floral engrosado y transformado (Coombe, 1976). Desde el punto de vista hortícola, el receptáculo con los aquenios se considera el fruto, y a los aquenios (verdaderos frutos) se los considera las semillas y así lo consideraremos en esta memoria. Es un fruto de pulpa blanda incluido dentro del grupo denominado “frutos blandos” junto a la grosella, arándanos, etc. Está cubierto de una piel fina y delicada que se rompe con cierta facilidad. En general, los frutos blandos se magullan y aplastan bajo el efecto de presiones relativamente pequeñas que no provocarían daños en otros frutos.

Los aquenios están constituidos por la combinación de semilla y tejido del ovario que se origina en la base de cada pistilo (Darrow, 1966). Los aquenios se encuentran en el tejido epidérmico superficial del receptáculo (Figura 1.3 A) y están conectados con el interior del mismo mediante haces vasculares (Lis y Antoszewski, 1979). Esta red vascular supe los nutrientes necesarios para el desarrollo de los aquenios y de las células del tejido cortical que los rodea. Cada fresa puede tener entre 20 y 500 aquenios, dependiendo del cultivar y las condiciones ambientales (Darrow, 1966). El desarrollo de los aquenios se completa antes de que el receptáculo alcance su tamaño de cosecha (Perkins-Veazie, 1995).

El receptáculo es la parte comestible de la fresa y se desarrolla en la base de la flor. Está formado por tres tipos de tejidos: tejido medular, cortical y epidérmico (Figura 1.3 B). El tejido medular forma el cilindro central, rodeado de tejido cortical conteniendo las células parenquimáticas y epidérmicas (Havis, 1943). El haz vascular se extiende desde el pedicelo, atravesando la médula y el córtex y alcanza los aquenios que se encuentran en la superficie del córtex (Lis y Antoszewski, 1979). La epidermis está ligeramente encerada, es pubescente, posee estomas protuberantes y

abiertos para la transpiración y respiración. El tamaño final de la fresa depende de su posición en el ramillete floral, del número de achenios polinizados y de factores ambientales entre los que destacan la temperatura y las condiciones nutricionales (Darrow, 1966; Dana, 1980; Albrechts y Howard, 1982). Si la polinización no ha sido completa y quedan pistilos sin polinizar, el fruto resulta deformado. El desarrollo de los achenios distribuidos por la superficie del receptáculo carnoso estimula el crecimiento y la coloración de este, dando lugar al “fruto” que consumimos.

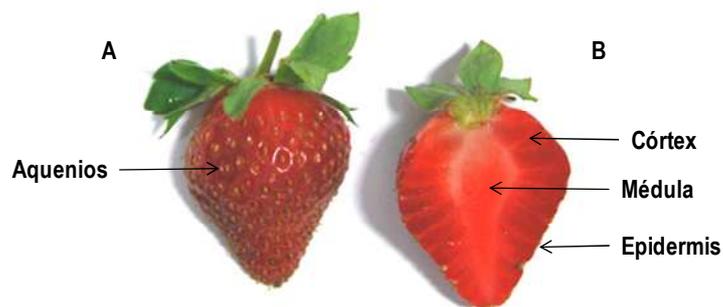


Figura 1.3: Imagen de un fruto de fresa. **A:** Superficie del fruto con achenios. **B:** Corte longitudinal del fruto en el que se puede observar las diferentes partes del receptáculo.

1.4.- Aspectos generales del crecimiento y maduración del fruto de fresa

La fresa es un fruto de desarrollo y maduración rápida aunque dependiente de la temperatura. El tiempo que transcurre desde la floración hasta la maduración puede variar entre los 30 y 60 días, dependiendo del cultivar (Perkins-Veazie y Huber, 1987).

Perkins-Veazie y Huber (1983) sugirieron que el receptáculo presenta un crecimiento bimodal. El crecimiento del receptáculo es una combinación de división y expansión celular (Knee y col., 1977). La proliferación celular se completa a los siete días y posteriormente el incremento de volumen celular es el responsable del tamaño final del fruto y depende de factores fisiológicos, tanto de carácter hormonal como de carácter nutricional. El número de haces vasculares y, por tanto, el número de achenios funcionales determina la exportación de auxinas hacia el receptáculo (Lis y Antoszewski, 1979). De este modo, el tamaño final del fruto se correlaciona con el

número de aquenios desarrollados, aunque otros aspectos como la posición en la inflorescencia y la sensibilidad del tejido del receptáculo a las hormonas son también importantes en este proceso (Moore y col., 1970). La maduración del fruto de fresa, como en la mayoría de los frutos carnosos, es la suma de una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren principalmente durante los estadios finales de su desarrollo y que afectan al aroma, el sabor, el color y a la textura preparándolo para la diseminación de sus semillas (Brummell, 2006).

Uno de los cambios más llamativos durante la maduración, es el cambio de color. Este proceso es debido tanto a la degradación de pigmentos como a la biosíntesis de otros nuevos que colorean intensamente los frutos. Aprovechando los cambios de coloración del fruto se suelen distinguir cuatro fases en el desarrollo y maduración del mismo: fruto verde (distinguiendo entre verde pequeño y verde grande), blanco, rosa (o intermedio) y rojo (Figura 1.4). Los frutos alcanzan el estadio blanco unos 21 días postanthesis y están totalmente maduros transcurridos unos 30-40 días desde la anthesis (Dennis, 1984). En ese periodo, en paralelo a los cambios de color, ocurren cambios importantes en la producción de compuestos volátiles responsables del aroma, y la producción y acumulación de azúcares que mejoran el sabor (Rhodes, 1980). Todos estos cambios están encaminados para hacer la ingestión de los frutos más apetecible y conseguir con ellos dispersar las semillas, haciéndolo también muypreciado en el mercado (Kader, 1991), pero hacen los frutos más susceptibles a los patógenos (Pearkins-Veazie, 1995).

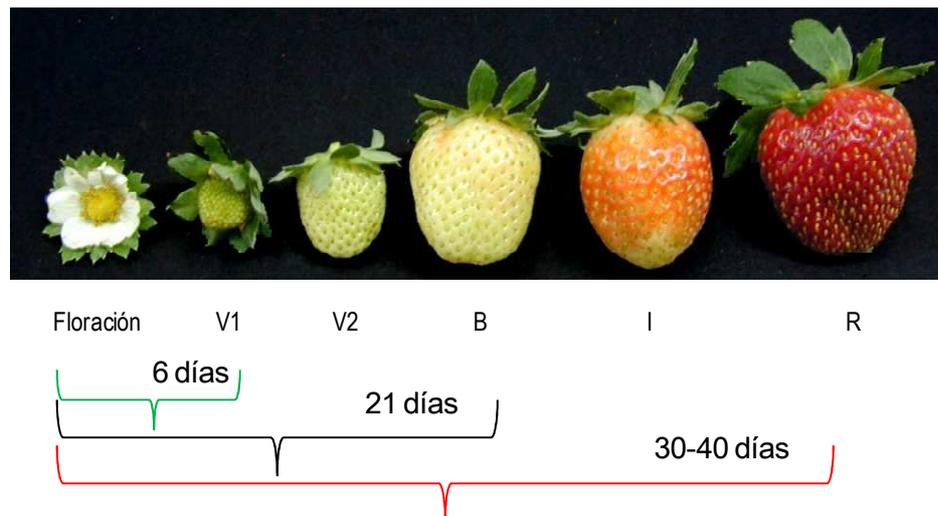


Figura 1.4: Estadios de desarrollo y maduración del fruto de fresa: V1, verde; V2, verde grande; B, blanco; I, intermedio; R, rojo. Imagen cedida por Sara Posé.

Este fruto se considera no climatérico ya que no presenta los picos característicos de respiración y etileno del proceso conocido como climaterio, que se da en frutos como el tomate (Perkins-Veazie, 1995). Este carácter no climatérico se considera de tipo intermedio debido a que, en términos generales, no se observa un declive de la respiración sino que ésta se mantiene durante la maduración.

El fruto de fresa es extremadamente perecedero y se incluye dentro de los frutos blandos ya que sufre un importante reblandecimiento en las fases finales de su maduración, llegando a adquirir una textura semilíquida muy pocos días después de su cosecha. Esta pérdida de firmeza se inicia en estadio verde y continúa durante las fases finales de la maduración, hasta alcanzar la textura semilíquida (Manning, 1993). Se considera que la disminución de la firmeza del fruto de fresa es la principal causa de la pérdida de calidad de los frutos maduros y supone una importante limitación del periodo postcosecha. Por este motivo, la manipulación comercial de la fresa durante su recolección se debe reducir al mínimo para evitar el posible daño físico a los frutos, siendo aconsejable usar condiciones de refrigeración durante el transporte y el almacenamiento para disminuir el reblandecimiento del fruto (Kader, 1992).

Uno de los factores principales que determinan la calidad de los frutos y, especialmente, la vida media de éstos tras su recolección, es la extensión y rapidez con la que tiene lugar la pérdida de firmeza durante el proceso de maduración. Aunque los cambios de textura mencionados ocurren gradualmente en muchos frutos, el proceso de reblandecimiento tiene lugar muy rápidamente en el caso de la fresa. Está ampliamente aceptado que estos cambios de textura están relacionados principalmente con modificaciones en las características y/o composición de las paredes celulares de los tejidos que componen los frutos (Brummell, 2006; Posé y col., 2012). A continuación se describen la estructura de la pared celular así como su posible relación con los cambios de textura de los frutos.

1.5.- La pared celular

La pared celular es un componente celular complejo que, además de ser parte responsable de dar soporte y estructura a los tejidos vegetales, condiciona el crecimiento y desarrollo celular. En general, la forma de las células vegetales viene determinada por su pared celular. Esta estructura funciona como un exoesqueleto, determinando la tasa de crecimiento y su dirección y, por tanto, ejerciendo una profunda influencia en el crecimiento y morfología de la planta. La pared celular está altamente organizada y compuesta por una mezcla compleja y cambiante de diferentes polisacáridos, proteínas y compuestos aromáticos, que son secretados por las células y ensambladas formando una red muy compleja entrelazada por diferentes tipos de enlaces. Estas secreciones se depositan secuencialmente en el exterior celular formando una serie de capas (Brummell, 2006).

La pared de las células vegetales está formada por los siguientes componentes estructurales (Buchanan, 2000) (Figura 1.5):

. **Lámina media**, es la capa más externa de la pared celular y la primera que se origina. Está formada principalmente por pectinas que actúan a modo de capa adhesiva, permitiendo la unión de células entre sí.

. **Pared celular primaria**, presente en todas las células vegetales está formada por una red de microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz amorfa constituida por fibrillas de hemicelulosa, pectinas y proteínas estructurales.

. **Pared celular secundaria**, se origina en algunas células especializadas (como las células del xilema) y aparece una vez se ha detenido el crecimiento. A diferencia de la pared primaria contiene, además una alta proporción de celulosa, lignina y/o suberina.

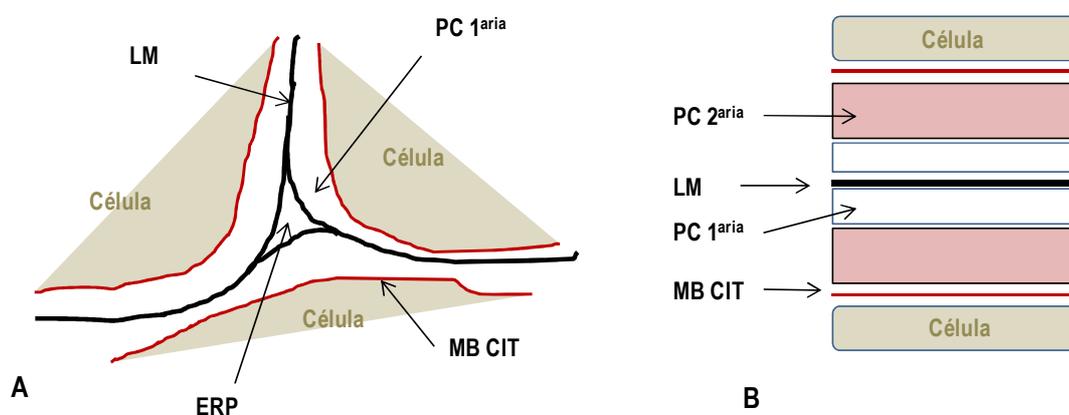


Figura 1.5: Esquema de los componentes estructurales de la pared celular. **A** Pared celular primaria. **B** Pared celular secundaria. Siendo: LM: Lámina media; ERP: Esquina rica en pectinas; MB CIT: Membrana citoplasmática; PC 1^{aria}: Pared celular primaria; PC 2^{aria}: la pared celular secundaria y Célula: indica el interior celular.

En los frutos de fresa, como en la mayoría de los frutos carnosos, la pared celular está constituida por la lámina media y la pared celular primaria, que se describe con más detalle a continuación.

1.5.1.- Composición y estructura de la pared celular primaria

La pared celular es un compartimento dinámico que sufre numerosos cambios durante la vida de la célula. En ella se suelen distinguir diferentes componentes en base a distintos criterios, en algunos casos arbitrarios o metodológicos. Desde el punto

de vista de la extracción y en orden de importancia cuantitativa, los polímeros que se obtienen son polímeros pécticos (35% del peso seco), celulosa (30%), hemicelulosa (25%) así como proteínas estructurales (10%). Con menor importancia cuantitativa, pero jugando también un papel estructural importante habría que mencionar la presencia de fenoles esterificados. Por lo general, el componente péctico adquiere una relevancia cuantitativa aún mayor en frutos, pudiendo suponer hasta el 60% del total del peso seco (Redgwell y Fisher, 2001).

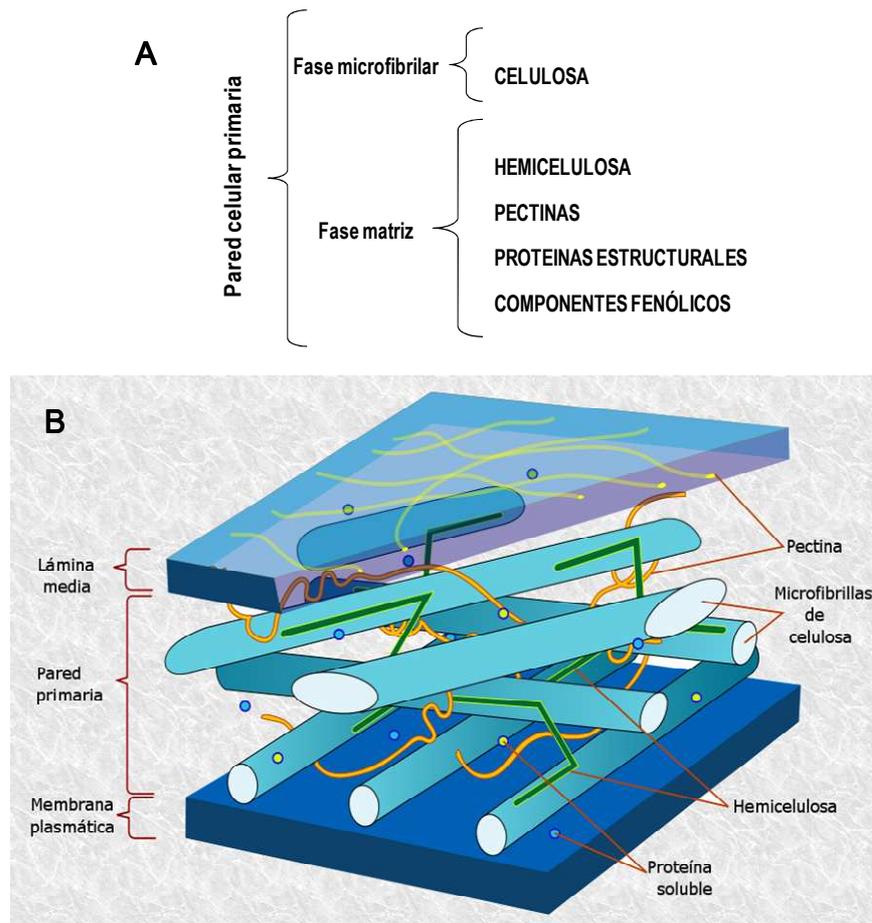


Figura 1.6: Estructura y composición de la pared celular primaria. **A:** Composición de la pared celular primaria. **B:** Estructura de la pared celular primaria, situada entre la lámina media y la membrana plasmática. (Fuente: Wikimedia Commons. Obra de dominio público, publicada por LadyofHats).

Según Carpita y McCann (2000), la pared celular primaria estaría formada por un esqueleto de celulosa unido por fibrillas de hemicelulosa (xiloglucanos o

glucoarabinosilanos) adheridos a la superficie de la celulosa mediante puentes de hidrógeno, y todo ello embebido en una matriz de diversos tipos de pectinas y proteínas estructurales (Figura 1.6).

Se distinguen dos tipos de pared celular primaria, denominadas Tipo I y Tipo II, en función del tipo de polisacárido que entrecruza las fibrillas de celulosa. El modelo más aceptado de pared primaria Tipo I es el propuesto por Carpita y Gibeaut (1993). Según este modelo, la pared está formada por un esqueleto de microfibrillas de celulosa unidas entre sí a través de xiloglucanos. Este tipo de pared está presente en dicotiledóneas y muchas monocotiledóneas, siendo el modelo de pared aplicable a la mayoría de frutos. En las paredes celulares de Tipo II, típica de la familia *Poaceae*, los polisacáridos que entrecruzan las fibrillas de celulosa son del tipo glucoarabinosilanos (Carpita y Gibeaut, 1993; Carpita y McCann, 2000; Redgwell y Fisher, 2002).

A continuación se describen con más detalle los componentes estructurales de la pared celular primaria.

1.5.1.1.- Fase microfibrilar

Formada únicamente por microfibrillas de celulosa. Este polímero está formado por cadenas de polisacáridos lineales que contienen unos 8.000 residuos de D-glucosa unidos por enlace β (1 \rightarrow 4). Aproximadamente 36 de estas cadenas se unen mediante puentes de hidrógeno para formar una microfibrilla de celulosa (Taylor, 2008). El ancho de las fibrillas es de 5 a 15 nm y están espaciadas entre sí unos 20-40 nm. Las fibrillas son más largas que las cadenas que las forman porque cada cadena comienza y termina en un lugar distinto.

La región interna de las microfibrillas es cristalina y excluye el agua, siendo las capas más externas más amorfas, permitiendo la unión de las cadenas de glucanos (Pauly y col., 1999).

1.5.1.2.- Matriz de polisacáridos hemicelulósicos

Se denomina hemicelulosa a los polisacáridos no celulósicos de la pared que se extraen a pH fuertemente alcalino. Los glucanos conocidos como hemicelulosas están

formados predominantemente por azúcares neutros, ya que de forma mayoritaria sus componentes son glucosa, xilosa o manosa y no contienen ácido galacturónico (GalA) (Scheller y Ulvskov, 2010). El Xiloglucano es el polisacárido más abundante de la matriz hemicelulósica y se encuentran en las paredes Tipo I presentes en la mayoría de las plantas. Está formado por cadenas lineales de glucosa unidas por enlace β (1 \rightarrow 4), como en la celulosa, pero bastante más corto y con residuos de xilosa unidas por enlace α (1 \rightarrow 6). A veces pueden llevar unidas cadenas laterales de disacáridos (xilosa - arabinosa) o trisacáridos (arabinosa - fucosa - galactosa). Los xiloglucanos se unen entre sí y a la superficie de las microfibrillas de celulosa por puentes de hidrógeno, formando una red que engloba a la celulosa. Las cadenas de xiloglucano tienen una longitud de 200 nm de media, suficiente para abarcar la distancia entre dos microfibrillas de celulosa y entrelazarlas (Carpita y Gibeaut, 1993).

Otros tipos de hemicelulosas mucho menos abundantes en la paredes de dicotiledóneas son los Glucuronoarabinoxilanos, formados por cadenas lineales de xilosa unidas por enlace β (1 \rightarrow 4) con residuos de arabinosa y ácido glucurónico; o los Glucomananos, formados por regiones alternas de β (1 \rightarrow 4) glucosa y β (1 \rightarrow 4) manosa (Carpita y Gibeaut, 1993; Carpita y McCann, 2000).

Esta red formada por las cadenas de celulosa y xiloglucanos está embebida en una matriz de pectinas que controla la porosidad de la pared (Brett y Waldron, 1996).

1.5.1.3.- Pectinas

Tradicionalmente se consideran pectinas a los polisacáridos de la pared celular en cuya extracción se utilizan agentes quelantes de calcio o soluciones ácidas diluidas, aunque también hay una importante fracción péctica extraíble con carbonato sódico. Así, el término 'pectinas' es muy genérico y engloba a un conjunto de polímeros heterogéneos, altamente hidratados y ricos en ácido D-galacturónico. Estos polímeros pécticos son cuantitativamente muy importantes en la pared celular primaria, representando un 30% de la misma. Aún más, como ya hemos comentado, las paredes celulares de muchos frutos normalmente están enriquecidas en pectinas, llegando hasta un 60% en algunas especies (Redgwell y col., 1997a).

La función de la matriz péctica no es sólo estructural, ya que además de controlar el tamaño de poro, proveen a la pared de carga superficial, lo que determina el balance iónico y modula el pH en este compartimento celular. Como se ha mencionado anteriormente, la lámina media está constituida fundamentalmente por pectinas, siendo a este nivel donde se regula la adhesión celular. Además de estas características físico-químicas y funciones estructurales, algunos polisacáridos pécticos de pequeño tamaño actúan como señal en procesos de interacción entre la planta y otros organismos, así como en otros procesos fisiológicos, incluida la maduración del fruto (Carpita y McCann, 2000; Dumville y Fry, 2000).

Los dos polímeros pécticos más abundantes en la pared celular son el Homogalacturonano (HGA) y el Ramnogalacturonano I (RGI).

1.5.1.3.1.- Homogalacturonano (HGA)

El esqueleto del HGA está compuesto por un homopolímero de ácido galacturónico (GalA) unido por enlaces α (1 \rightarrow 4) altamente metil esterificado. Las cadenas suelen tener unas 200 unidades de GalA, lo que origina esqueletos de una longitud aproximada de 100 nm (Figura 1.7).

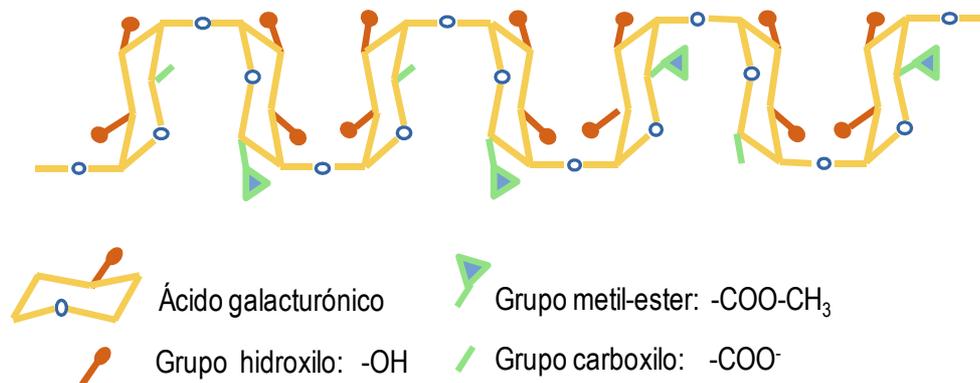


Figura 1.7: Modelo conformacional del homogalacturonano formado por monómeros de ácido galacturónico (GalA) unidos por enlace α (1 \rightarrow 4). Estos polímeros se encuentran metil esterificados con relativa frecuencia (Modificado con permiso a partir de Matas y col., 2015).

Los HGAs se sintetizan en el aparato de Golgi y son secretados a la pared celular con el 70-80% de los residuos de ácido galacturónico metil-esterificados en el carbono

6-carboxil. Es necesaria la acción de la pectin metilesterasa (PME), una enzima que modifica este componente de la pared celular *in situ* escindiendo parte de los grupos metilo, para que los grupos carboxilos queden libres y puedan interaccionar iónicamente con el calcio presente en la pared, formando así zonas de unión entre dos cadenas de poligalacturónicos. Estas zonas de unión se conocen como cajas de huevo (egg-box) (Morris y col., 1982) (Figura 1.8).

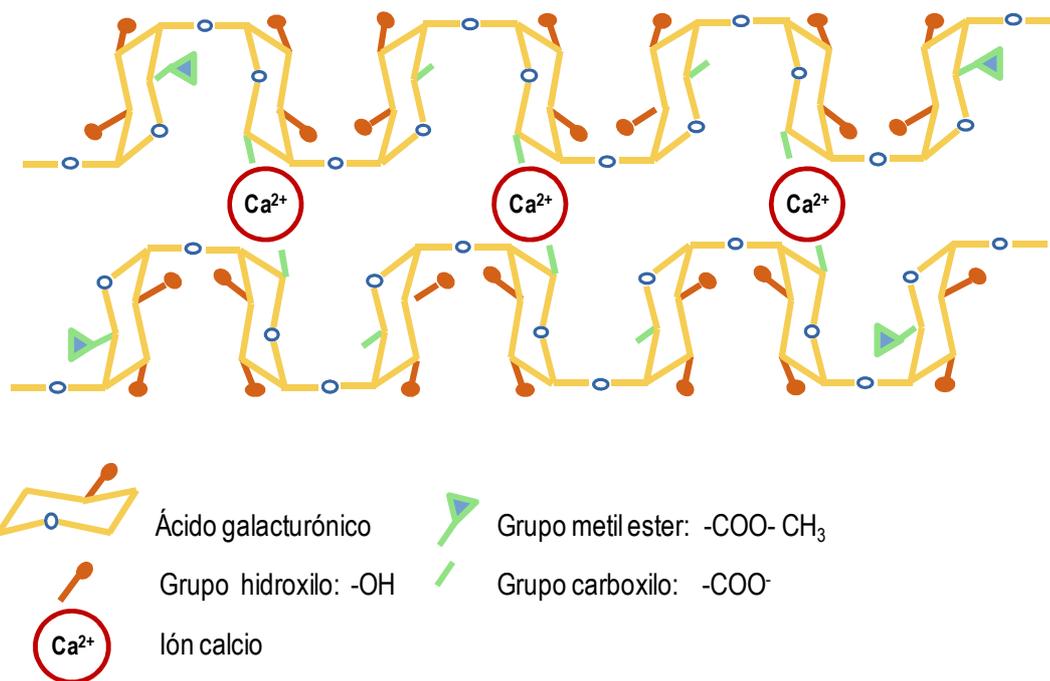


Figura 1.8: Modelo caja de huevos “egg-box” de Morris y col. (1982), muestra el nivel máximo de entrecruzamiento entre residuos de ácido poligalacturónico desmetilados (Modificado con permiso a partir de Matas y col., 2015).

El tamaño del poro de la pared está determinado por la extensión y frecuencia con que se den estas zonas de unión, el grado de esterificación, y la mayor o menor ocupación de estas zonas por las cadenas laterales que ramifican al esqueleto de RG.

Existen dos tipos de modificaciones asociadas a los homogalacturonanos: los Xilogalacturonanos y los Ramnogalacturonanos II (Figura 1.9). Los xilogalacturonanos son HGA modificados en los que aproximadamente la mitad de los monómeros de

ácido galacturónico (GalA) presentan residuos de α -D-Xilosa (Xil). Por su parte, los Ramnogalacturonanos II (RG II) son polímeros pécticos relativamente pequeños y muy conservados con una estructura muy compleja tanto por su composición de azúcares, como por el tipo de enlaces que se dan en él. Su esqueleto básico es de GalA y presentan múltiples ramificaciones. Los monómeros de RG II pueden formar dímeros a través de un éster de borato en el que intervienen los residuos de apiosa. También se pueden encontrar en sus ramificaciones otros azúcares como L-fucosa, D-arabinosa, D-manosa, D-xilosa y el D-ácido galacturónico. Esta estructura compleja está altamente conservada en las paredes celulares de las plantas vasculares (Vincken y col., 2003).

1.5.1.3.2.- Ramnogalacturonano I (RG I)

Se trata de un heteropolímero formado a partir de la repetición de un disacárido formado por unidades de α (1 \rightarrow 2) -L-Ramnosa -(1 \rightarrow 4) -D-GalA (Figura 1.9). Entre un 20 y un 80% de los residuos de las ramnosas del dímero presentan cadenas laterales formadas por varias galactosas o varias arabinosas y, en ocasiones, pueden presentar ramificaciones secundarias (Rose y col., 2003) (Figura 1.9). Así, arabinanos, galactanos y arabinogalactanos son las cadenas laterales más comunes.

Los HGAs se unen covalentemente mediante enlaces glucosídicos a RG I y RG II los cuales, probablemente, también se enlazan entre sí. Algunos autores, sin embargo, consideran que las regiones de HGA son cadenas laterales de RG I (Vincken y col., 2003). Las regiones ricas en RG I se conocen como “hairy pectins” por la cantidad de ramificaciones que presentan, en comparación con las zonas de HGA, denominadas como “smooth pectins”.

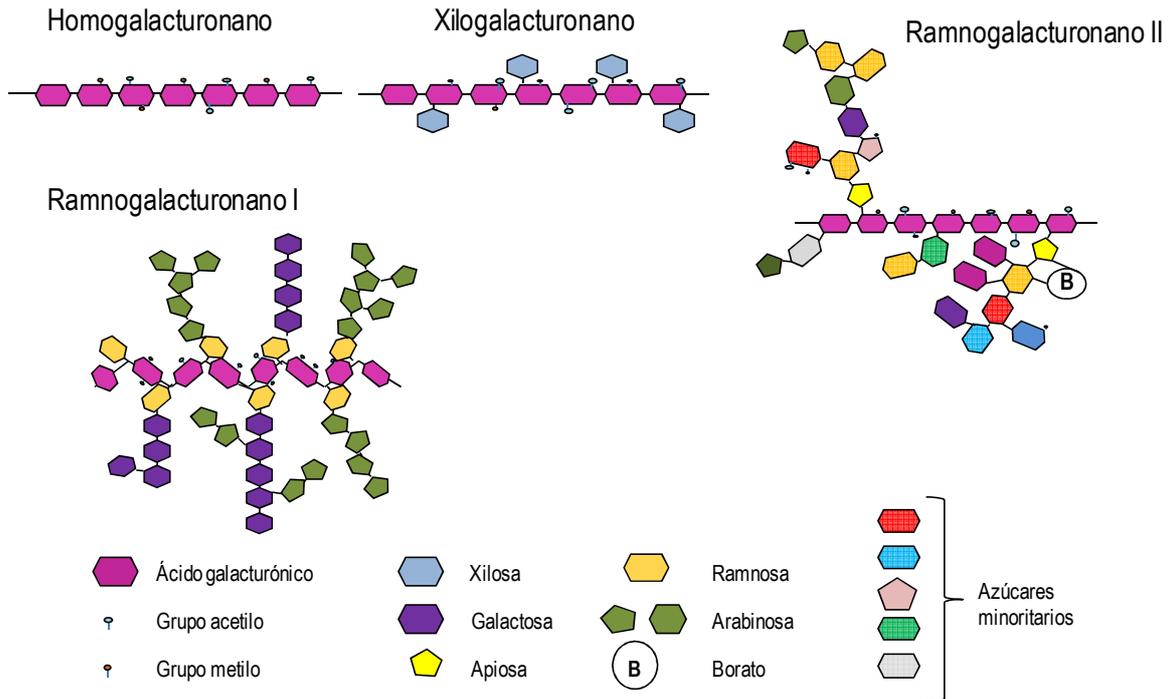


Figura 1.9. Estructura y composición de los polímeros pécticos de la pared celular primaria.

1.5.1.4.- Proteínas estructurales

Representan alrededor del 10% de la pared celular y se clasifican en 4 familias de proteínas denominadas en base al aminoácido más abundante del polipéptido. Así encontramos glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), grupo que incluye la extensina, una de las más estudiadas, proteínas ricas en prolina (PRPs), proteínas ricas en glicina (GRPs) y proteoglicanos, grupo identificado en función del carbohidrato al que está asociado, en vez del aminoácido más abundante. Dentro de este grupo destaca el arabinogalactano (AGPs).

Estas proteínas tienen una función estructural ya que, al interactuar con el resto de los elementos de la pared, contribuyen a sus propiedades mecánicas. Su presencia puede inducir un aumento en la rigidez de la pared celular. Además de estas proteínas estructurales, en la pared celular hay otras proteínas con actividad enzimática que realizan muy diversas actividades, algunas de las cuales se describirán más adelante.

1.5.1.5.- Componentes fenólicos

Entre los componentes fenólicos de la pared celular primaria se encuentran principalmente el ácido felúrico y el ácido p-cumárico. Estos compuestos se pueden encontrar esterificados con residuos de arabinosa y galactosa o embebidos en los polisacáridos pécticos (McNeil y col., 1984).

A continuación se muestra, a modo de resumen, un esquema con todos los componentes anteriormente descritos (Figura 1.10).

		Componentes de la cadena principal	
Pared celular primaria	Fase microfibrilar	CELULOSA	Gluc
	HEMICELULOSA	Xiloglucano	Gluc, Xil,
		Glucuronoarabinosilano	Xil, Arab, Ac Gluc
	PECTINAS	Homogalacturonano	GalA
		Xilogalacturonano	GalA, Xil
Ramnogalacturonano I Ramnogalacturonano II		GalA, puede formar dímeros mediante éster de borato Ac Gal, Ramn	
Fase matriz	PROTEINAS ESTRUCTURALES	HPRP PRP GRP Proteoglicanos AGPs	Ricas en hidroxiprolina Ricas en prolina Ricas en glicina Arabinogalactanos prot
	COMPONENTES FENÓLICOS	Ácido felúrico Ácido cumárico	

Figura 1.10: Composición de la pared celular primaria. No todos los componentes de la matriz enumerados se encuentran en todas las paredes celulares vegetales. Siendo: Gluc: glucosa; Xil: xilosa; Arab: arabinosa; Ac Gluc: ácido glucurónico; GalA: ácido galacturónico y Ramn: ramnosa.

Según Jarvis y col. (2003) la pared celular primaria estaría formada por HGA, RG I, RG II, glucanos y celulosa, pero la lámina media contendría solamente HGA y algunas proteínas estructurales.

De forma genérica se puede decir que el grado de rigidez de la pared aumenta conforme lo hace el número de interacciones entre los elementos que la componen (Carpita y Gibeaut, 1993) confiriendo unas propiedades estructurales a nivel de tejidos y órganos, como los frutos, que determinan su mayor o menor dureza. Durante el crecimiento y desarrollo de la planta, los distintos tejidos se ven sometidos a cambios estructurales en la pared celular. En el caso del fruto, distintas actividades enzimáticas modifican los enlaces en la pared y llevan al reblandecimiento del mismo (Brummell, 2006).

1.5.2.- Extracción y análisis de la pared celular en frutos

Para poder estudiar en detalle el papel de las pectinas y de algunas enzimas pectinolíticas, como la pectato liasa o la poligalacturonasa, en el proceso de reblandecimiento de la fresa conviene optimizar metodologías que permitan valorar el grado solubilización y despolimerización de estos polímeros pécticos presentes en la pared celular. Para ello es necesario contar con un buen protocolo de extracción de pectinas y la puesta a punto de las técnicas de cromatografía para la caracterización de los grupos de polímeros presentes en las distintas fracciones.

En la bibliografía se describen varios protocolos de extracción de pared celular en frutos, caracterizados por la manera de inactivación de las enzimas hidrolíticas de la pared al inicio del procedimiento.

Redgwell y col. (1992) utilizan una solución formada por fenol, ácido acético y agua (denominada PAW, por sus siglas en inglés) para inactivar las enzimas hidrolíticas de la pared y evitar así la degradación de los polímeros de la pared durante la extracción. Con este protocolo se extrae la fracción PAW (en la que se obtendrían las pectinas más fácilmente solubles). La fracción no soluble contenida en esta solución constituye la pared celular, a la que denominan CWM (Cell Wall Material).

Otro protocolo ampliamente usado es el descrito por Huber y col. (1993), el cual emplea disoluciones de etanol para inactivar las enzimas parcialmente y, tras una

incubación con tris-fenol, se produce la desnaturalización total de éstas. En este protocolo se obtiene directamente la pared celular denominada AIS (Sólido Insoluble en Alcohol, por las siglas en inglés) y no se obtiene una fracción parecida a la fracción de pectinas más fácilmente solubilizables del protocolo de Redgwell (fracción PAW).

La extracción del tejido en otros disolventes como acetona o etanol a alta temperatura se ha demostrado poco adecuada ya que no inactiva totalmente las enzimas, al menos en fruto de tomate (Huber, 1991). Por otro lado, aunque el PAW es un excelente extractor de proteínas y pobre disolvente de polisacáridos (Fry, 2000), puede extraer cantidades significativas de calcio de la pared, afectando a la posterior extracción de pectinas queladas (Huber, 1991).

Este primer residuo de pared es sometido a un fraccionamiento secuencial con distintas soluciones. Este procedimiento es común en ambos protocolos, tanto para CWM (Redgwell y col., 1992) como para AIS (Huber y col., 1993). Primero, la pared se lava con agua, obteniéndose del sobrenadante la fracción soluble en AGUA que contiene las pectinas más débilmente unidas a la pared. Posteriormente, el residuo resultante es tratado con un agente quelante de calcio (generalmente Ciclohexano-trans-1,2-diamina tetra-acetato o CDTA), obteniéndose la fracción soluble en CDTA, donde se solubilizan las pectinas unidas entre sí por enlaces iónicos. Tras esto, el residuo se trata con una solución de carbonato sódico que de-esterifica uniones de tipo covalente, obteniéndose la fracción soluble en CARBONATO, donde se localizan las pectinas unidas covalentemente. Por último, el residuo se trata secuencialmente con soluciones de KOH 1M primero y, posteriormente, KOH 4M obteniéndose la fracción soluble en KOH que se corresponde con la fracción de HEMICELULOSA. El residuo final, tras todo este proceso, está enriquecido en CELULOSA.

1.5.3.- Papel de la pared celular en los cambios de textura de los frutos

La estructura de la pared celular determina las propiedades físicas de los distintos tejidos de las plantas. En general, se considera que los cambios de textura que ocurren en los frutos durante su maduración son el resultado de cambios en las

características y/o composición de la pared celular. Los frutos de tomate y fresa se han tomado como modelos de frutos carnosos, climatérico y no climatérico respectivamente, para el estudio de estos procesos. Si bien la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en tomate. Haciendo una búsqueda en Web of Science, con los términos maduración, pared celular y pectinas para tomate y para fresa observamos que el número de publicaciones hasta el año 2002, que fue cuando se inició este trabajo, la media en tomate estaba en torno a 12 publicaciones por año, y estos trabajos eran citados en otros 200 trabajos. En cambio los trabajos en fresa publicados en ese periodo de tiempo fueron de 2 trabajos por año y se citaban en unos 30 trabajos. De ese tiempo hasta la actualidad en tomate se ha mantenido en cuanto a número de publicaciones, si bien el número de citas en trabajos aumenta progresivamente experimentando desde 2006 una subida considerable llegando a ser citados en unos 1.000 trabajos. Se observa un aumento en el número de publicaciones en fresa, siendo de media unos 4 trabajos por año. A partir de 2006 se ve un aumento por el interés en fresa ya que la tendencia a citar estos trabajos aumenta considerablemente, oscilando entre 100 y 180 citas (Datos según una búsqueda en Web of Science en octubre de 2015).

En general, durante el reblandecimiento del fruto tiene lugar un proceso de desmantelamiento de la pared celular que incluye la solubilización y despolimerización de pectinas y hemicelulosas, la pérdida de azúcares neutros de pared, el incremento del grado de hinchamiento de la pared y la disolución de la lámina media (Brummell y Harpster 2001; Brummell 2006; Goulao y Oliveira 2008). Como consecuencia de estos cambios se produce una modificación significativa de las propiedades mecánicas de la pared y una reducción de la adhesión celular, dando lugar finalmente a una pérdida de firmeza. El componente péctico de la pared es el que más se ve modificado durante la maduración del fruto, siendo la solubilización de pectinas el proceso que mejor se correlaciona con la pérdida de firmeza y el hinchamiento de la pared celular (Mercado y col., 2007; Posé y col., 2012). La solubilización de pectinas se refiere al incremento de pectinas extraídas con disolventes acuosos, es decir, las fracciones PAW y AGUA. Mientras que la despolimerización representa una disminución de la masa molecular debida a la acción de enzimas específicas (hidrolasas de pared celular) y/o a la

disgregación de los complejos pectínicos mantenidos por fuerzas no covalentes (Lara, 2013), por lo que suele ir acompañado de un decremento en las pectinas extraídas con el tampón carbonato. Por tanto, se asume en buena medida que la solubilización de pectinas ocurre a expensas de los poliuronidos más fuertemente unidos a la pared (Wakabayashi, 2000; Brummell, 2006).

La presencia y extensión de los cambios en la pared antes mencionados dependen del tipo de fruto. Así, por ejemplo, la despolimerización de pectinas es muy elevada en tomate y aguacate pero muy baja o prácticamente ausente en banana, fresa o manzana (Brummell, 2006). En cualquier caso, es difícil la comparación entre los distintos trabajos debido a las diferentes metodologías utilizadas para el aislamiento y posterior análisis de la pared celular. En el siguiente apartado se discute con mayor profundidad el proceso de desmantelamiento de la pared celular durante la maduración de la fresa.

1.6.- Modificaciones de la pared celular del fruto de fresa durante su maduración

Tal como indica Rose (2003), es necesario ampliar los estudios de maduración y desmantelamiento de pared a frutos distintos del tomate que es, como hemos mencionado el más estudiado. La importancia económica de la fresa y su maduración no climatérica ha convertido este fruto en un modelo complementario para el estudio de los procesos de maduración. El estudio del desmantelamiento de la pared celular asociado a la maduración se ve dificultado en fresa debido a que el tamaño del fruto continúa incrementándose durante la maduración. Por tanto, la síntesis neta de residuos de pared celular durante la maduración podría enmascarar algunos cambios en los polímeros que la forman (Woodward, 1972; Huber, 1984).

A pesar de existir numerosos estudios (Lara y col., 2004; Rosli y col., 2004; Posé y col., 2012) las bases fisiológicas de la degradación de la pared celular en la fresa no están completamente establecidas aún. A nivel histológico, los frutos maduros

muestran un adelgazamiento de la pared celular y una casi completa disolución de la lámina media. Como consecuencia, las células del fruto maduro presentan poco o ningún contacto entre ellas y un considerable espacio intercelular en comparación con esos mismos frutos en estadio verde (Redgwell y col., 1997b).

Por otra parte, el grado de hinchamiento *in vitro* de la pared celular se incrementa en fruto rojo con respecto a fruto verde, lo que indica que el tamaño del poro de la pared aumenta durante la maduración, probablemente provocado por la degradación de la misma. A este nivel, los cambios más significativos detectados durante la maduración de la fresa son la solubilización de pectinas y la despolimerización de la hemicelulosa (Rosli y col., 2004).

En cuanto al contenido en pared celular y celulosa, se observa una ligera disminución por peso de fruto durante la maduración en todos los cultivares de fresa estudiados, independientemente de su firmeza (El-Zoghbi, 1984; Redgwell y col., 1997b; Koh y Melton, 2002; Rosli y col., 2004). La disminución de pared celular es más acusada en el tejido cortical que en la médula (Koh y Melton, 2002) pero según Figueroa y col. (2010), este parámetro no parece estar relacionado con la firmeza.

Respecto al contenido en hemicelulosas, Koh y Melton (2002) y Rosli y col. (2004) observaron una disminución de estos polímeros durante la maduración de la fresa en cultivares con distinto grado de firmeza. Sin embargo, en cuanto a la despolimerización de la hemicelulosa se han obtenido resultados contradictorios. Huber (1984) observó una significativa despolimerización de la hemicelulosa durante la maduración de frutos del cultivar Dover. Sin embargo, Rosli y col. (2004) no observaron cambios en el tamaño molecular de los polímeros presentes en la fracción de hemicelulosa en frutos del cultivar Pájaro y sólo una pequeña despolimerización tanto en frutos de un cultivar duro (Camarosa) como en frutos de un cultivar blando (Toyonaka). Finalmente, Nogata y col. (1996) detectaron una disminución de los polímeros hemicelulósicos de alto peso molecular, aunque estos cambios fueron más evidentes durante el crecimiento del fruto que durante la maduración.

Como se ha mencionado anteriormente, una de las características principales de la maduración de la fresa, detectada en todos los trabajos publicados sobre el tema, es el incremento en las pectinas solubles. Knee y col. (1977) observaron que en el periodo comprendido entre los 7 y 21 días tras la caída de los pétalos, aproximadamente el 90% de los polímeros pécticos estaban unidos a la pared celular. Sin embargo, la proporción de pectinas unidas a pared decaía al 30% durante la maduración. Koh y Melton (2002) observaron que las fracciones de pectinas solubles, extraídas con agua y fenol-HEPES, se incrementan en la transición de fruto verde a rojo. Paralelamente, las fracciones CDTA y CARBONATO, que incluyen respectivamente pectinas queladas y unidas covalentemente, disminuyen durante la maduración y contienen, además, una menor cantidad de poliurónidos. Los mayores cambios en los polímeros solubles en agua y los covalentemente unidos ocurren en la transición de fruto verde a blanco en *F. x ananassa* (cv Chandler) y *F. chiloensis* (Figueroa y col., 2010). Finalmente Redgwell y col. (1997a) observaron un incremento en el contenido de ácidos urónicos en la fracción PAW (pectinas solubles) durante la maduración del fruto de fresa, aunque este incremento es moderado comparado con otros frutos como el aguacate y el kiwi. Así, parece claro que la solubilización de pectinas durante la maduración del fruto de fresa ocurre a expensas de la fracción covalentemente unida a la pared celular.

Si bien existe consenso sobre el papel de la solubilización de las pectinas durante la maduración de la fresa, no ocurre lo mismo con la despolimerización de las pectinas. En el trabajo pionero de Huber (1984) se afirmaba que la solubilización de las pectinas no era consecuencia de su hidrólisis enzimática. Este autor no encontró despolimerización de las pectinas queladas, asumiéndose desde entonces que la despolimerización de las pectinas, y por tanto que las enzimas pectinolíticas, no juegan un papel importante en el reblandecimiento del fruto de fresa. Sin embargo, en trabajos posteriores, se ha observado una pequeña despolimerización de las pectinas solubles en PAW (Redgwell y col., 1997a), así como de las pectinas unidas covalentemente (Rosli y col., 2004; Figueroa y col., 2010; Posé y col., 2013).

El contenido total de azúcares neutros no cambia significativamente durante la maduración de la fresa (Gross y Sam, 1984; Redgwell y col., 1997b; Koh y Melton, 2002; Figueroa y col., 2010). Los azúcares neutros mayoritarios tanto en fruto inmaduro como maduro de fresa son arabinosa, xilosa y galactosa. Durante la maduración se produce una pérdida de arabinosa y galactosa, mientras que la cantidad de xilosa se incrementa, y la ramnosa, fucosa, manosa y glucosa permanecen inalteradas (Redgwell y col., 1997b). La mayor parte de la galactosa y arabinosa está asociada a polímeros de pectinas que permanecen unidos a la pared celular después de la extracción con KOH 4M (Redgwell y col., 1997b; Koh y Melton, 2002). De acuerdo con Redgwell y col. (1997b) la pérdida de azúcares neutros no se correlaciona con el reblandecimiento.

Como resumen, se podría decir que la modificación más característica de la pared celular durante la maduración de la fresa es la solubilización de las pectinas, la cual ocurre supuestamente a expensas de los poliurónidos unidos covalentemente a la pared celular. Varias hipótesis pueden explicar este proceso. Huber (1984) sugirió la idea de que la solubilización podría estar relacionada con la síntesis de pectinas más solubles durante la maduración. Koh y Melton (2002) postularon que la solubilización puede estar asociada con el desenmarañamiento de las pectinas en la pared celular debido a la degradación de cadenas laterales de arabinanos o de rotura de enlaces entre pectinas y hemicelulosa. Finalmente, ante las evidencias de una pequeña despolimerización de estos polímeros, Rosli y col. (2004) indicaron que la solubilización de pectinas podría ser debida a la despolimerización de las pectinas unidas covalentemente.

1.7.- Enzimas involucradas en los cambios de textura del fruto

El desmantelamiento de la pared celular durante la maduración del fruto está mediado por la expresión de genes que codifican enzimas y proteínas capaces de modificar los diferentes polisacáridos de pared, especialmente pectinas y hemicelulosas. Algunas de estas enzimas se encuentran en diversas etapas del

desarrollo del fruto, mientras que otras son específicas de la maduración. En cualquier caso, parece claro que las enzimas hidrolíticas de pared pueden ser buenas indicadores del estado de maduración del fruto (Huber, 1983; Tucker y Grierson, 1987), aunque, en líneas generales, sus papeles en los cambios que determinan el proceso de reblandecimiento de los frutos están poco definidos. Tradicionalmente, para definir el efecto de las actividades de una serie de enzimas en la maduración del fruto se recurría al uso de inhibidores (Yoshida y col., 1984; Picton y Grierson, 1988), mutantes (Hobson, 1967; Tigchelaar y col., 1978) o variaciones de las condiciones ambientales (Hobson y col., 1984; Yang, 1985; Lincoln y col., 1987; Davies y col., 1988). Actualmente, se puede determinar el efecto de actividades enzimáticas individuales en la degradación de la pared celular durante la maduración del fruto a través de técnicas de ingeniería genética, mediante la transformación de plantas con genes relacionados con el metabolismo de la pared celular. En este apartado, vamos a describir las principales proteínas involucradas en los cambios de la pared celular que tienen lugar durante la maduración de frutos y que son posibles dianas de actuaciones con esta metodología.

1.7.1.- Poligalacturonasa (PG)

Esta enzima β -1,4-D-galacturónico glicanohidrolasa (PG) tiene como principal sustrato la fracción péctica que incluye los homogalacturonanos (Brummell y col., 1999) y cataliza la hidrólisis de las uniones de ácido galacturónico actuando tanto como endo- o exo-enzima. La exo-PG (EC 3.2.1.67) elimina las unidades de ácido galacturónico a partir del extremo no reductor de los poliuronidos, mientras que para la endo-PG (EC 3.2.1.15) se ha sugerido que rompe estos polímeros en diferentes posiciones internas. El sustrato de la PG en la pared celular es principalmente el homogalacturonano, el cual es secretado en la pared altamente metil-esterificado y debe ser desesterificado para ser sustrato de esta enzima (Carpita y Gibeaut, 1993).

Los cambios en la estructura de las pectinas durante la maduración de muchos frutos se han atribuido a la acción de las poligalacturonasas. Estas enzimas se han

identificado en las zonas de abscisión en plantas de tomate (Tucker y col., 1984) así como en frutos maduros y en granos de polen de distintas especies (Pressey y Reger, 1989). De las PGs identificadas en frutos, se han caracterizado tanto exo- como endopoligalacturonasas (Hadfield y Bennett, 1998). Varios frutos contienen los dos tipos de enzimas, como el melocotón tipo “freestone”, la pera, el pepino y la papaya (Pressey y Avants, 1973; 1975; 1976; McFeeters y col., 1980; Chan y Tam, 1982). Otros, por el contrario, contienen sólo exo-PG, como es el caso de los melocotones tipo “clingstone” (Pressey y Avants, 1973). El incremento de actividad endo-PG durante la maduración se ha correlacionado en distintos frutos con un incremento en las pectinas solubles y un reblandecimiento del fruto. En muchos frutos, como el tomate, la actividad endo-PG induce una solubilización de las pectinas mientras que la actividad exo-PG completa la hidrólisis. En tomate, los niveles de mRNA y proteína PG así como la actividad poligalacturonasa se correlacionan positivamente con la maduración del fruto y el reblandecimiento, sugiriéndose que las PG juegan un papel esencial en la inducción del reblandecimiento del fruto (Bennett y DellaPenna, 1987; Brady, 1987).

El fruto de tomate se ha utilizado como modelo para el análisis del papel de enzimas hidrolasas mediante transgénesis. En el caso concreto de la PG, la inhibición de un gen de poligalacturonasa mediante antisentido, inesperadamente, no modificó la firmeza del fruto maduro, y los frutos transgénicos mostraron una menor despolimerización y solubilización de pectinas (Sheehy y col., 1988; Smith y col., 1988). Sin embargo, otras características del fruto como la vida postcosecha de frutos sobremaduros, susceptibilidad a patógenos y viscosidad de la pasta de tomate se vieron modificados por el silenciamiento de la PG (Smith y col., 1990; Kramer y col., 1992; Brummell y Labavitch, 1997). Estos estudios dieron lugar a la hipótesis, ampliamente aceptada, de que el desmantelamiento de las pectinas durante la maduración mediado por enzimas pectinolíticas no era suficiente, ni necesario para producir el reblandecimiento del fruto (Brummell y Harpster, 2001).

Gizis (1963) fue el primer investigador que demostró la presencia de endo-PG en fresa, aunque, por lo general, la actividad endo-PG o exo-PG que se ha encontrado en fruto es muy baja (Neal, 1965; Barnes y Patchett, 1976; Archer y Fielding, 1979; Gross

y Sams, 1984; Huber, 1984; Abeles y Takeda, 1990; Nogata y col., 1993; Hadfield y Bennett, 1998). Lefever y col. (2004) observaron un papel importante de la PG en la firmeza del fruto, encontrando una correlación negativa entre dureza de fruto y actividad PG, de tal forma que las variedades de frutos más duros tenían una baja actividad PG.

En fresa se han identificado tres genes que codifican PG que se expresan específicamente durante la maduración del fruto (Redondo-Nevado y col., 2001; Salentijn y col., 2003; Villarreal y col., 2008). Quesada y col. (2009) obtuvieron plantas transgénicas con bajos niveles de uno de estos genes, FaPI1, mediante transformación con antisentido. Los frutos maduros de algunas líneas seleccionadas fueron significativamente más duros que los controles, manteniéndose además el incremento en dureza durante la postcosecha del fruto. Por tanto, estos estudios parecen indicar que la PG sí tendría un papel importante en el reblandecimiento de la fresa.

1.7.2.- Pectato liasa (PL)

La enzima pectato liasa (PL, EC 4.2.2.2) ha sido ampliamente estudiada en bacterias fitopatógenas, las cuales la secretan favoreciendo la degradación de las pectinas de la lámina media de la planta infectada para así permitir la entrada del patógeno (Henrissat y col., 1995). La degradación de las pectinas por acción de la PL ocurre por β -eliminación, a diferencia del mecanismo hidrolítico de las PG. Estas enzimas catalizan la rotura de los enlaces α (1-4) entre residuos galacturónicos desmetilados, provocando la despolimerización de las pectinas de la lámina media y de la pared celular primaria de las células vegetales (Henrissat y col., 1995). Tienen, por tanto, una función similar a la de la poligalacturonasa, aunque el mecanismo enzimático de ambas es diferente.

En el caso del fruto de fresa, se han descrito 3 genes de pectato liasa. El primer gen de PL específico de frutos (pIC) fue descrito por Medina Escobar (1997) en fresa. La expresión de este gen está restringida a frutos en estadio blanco y rojo maduro y se

inhibe por tratamiento con auxina. Posteriormente, se comprobó la existencia de otros dos genes de pectato liasa pIA y pIB, que presentaban un patrón de expresión similar al anterior (Benítez-Burraco y col., 2003). También se han aislado genes de pectato liasa en frutos como banana (Domínguez-Puigjaner y col., 1997; Pua y col., 2001), uva (Nunan y col., 2001; Ishimaru y Kobayashi, 2002) y en varios tejidos de tomate, expresándose en niveles elevados durante la maduración del fruto (Marín-Rodríguez y col., 2002).

Para determinar el papel de los genes de pectato liasa en la maduración de fresa, Jiménez-Bermúdez y col. (2002) obtuvieron plantas transgénicas que contenían una secuencia en antisentido de la región conservada de las tres pectato liasas de fruto. De entre todas las líneas transgénicas obtenidas, se seleccionaron cuatro de ellas en base al grado de inhibición conseguido y a la producción de frutos. Estas líneas dieron frutos con una dureza significativamente superior a la de los frutos control. Tras el análisis de expresión por "Northern Blot" se comprobó que en las líneas seleccionadas los niveles estacionarios de mRNA correspondientes al gen *p/C* en fruto maduro estaban reducidos entre el 70 y el 100% con respecto al testigo sin transformar, dependiendo de la línea. Estas líneas se siguieron cultivando durante varios años consecutivos y en todas ellas se mantuvo el fenotipo de mayor dureza de fruto en estadio rojo. En cuanto al efecto de la inhibición del gen pectato liasa en el desmantelamiento de la pared celular de fresa durante la maduración, en un estudio preliminar se comprobó que las paredes de los frutos transgénicos contenían una menor proporción de pectinas queladas y presentaban un menor grado de hinchamiento cuando se colocaban en agua destilada, lo cual era indicativo de una reducción de la solubilización de estas pectinas de pared durante la maduración (Jiménez-Bermúdez y col., 2002). A nivel histológico, estos cambios en la pared se traducen en una disminución de los espacios intercelulares y un mayor grado de adhesión celular en los frutos transgénicos maduros. Todo esto sugiere que esta enzima juega un papel muy importante en el reblandecimiento del fruto de fresa durante la maduración. En el apartado 1.8 se describe con más detalle la obtención y caracterización de estas plantas, al ser el objeto de estudio de esta tesis.

1.7.3.- Pectin metilesterasa (PME)

Los homogalacturonanos son secretados en la pared celular altamente metil-esterificados y son parcialmente desesterificados *in muro*. En el proceso de maduración, el grado de metilesterificación de las paredes celulares disminuye (Koch y Nevins, 1989). La enzima pectin metilesterasa (PME; EC 3.1.1.11) elimina los grupos metilo de la posición 6 de los residuos de ácido galacturónico de las pectinas; esto provoca la liberación de grupos carboxilo, cambiando el pH así como la carga de la pared celular, y permite la unión entre cadenas de poliurónidos por puentes de calcio (Jarvis, 1984; Seymour y col., 1987; Koch y Nevins, 1989; Carpita y Gibeaut, 1993). La actividad de esta enzima es esencial para la actuación de las enzimas pectinolíticas, ya que tanto poligalacturonasa como pectato liasa requieren fragmentos con las cadenas pécticas demetiladas.

La PME se encuentra en diversos tejidos vegetales (Tucker y col., 1982). Los efectos de su actividad enzimática en el reblandecimiento no están claros ya que, por un lado, al desmetilar las pectinas favorecen la acción de las PG y PL, y con ello la despolimerización de pectinas mientras que, por otra parte, la liberación de grupos carboxilo promueve la formación de enlaces iónicos en la pared. Los resultados obtenidos con plantas de tomate con PME en antisentido muestran que las pectinas presentaron un menor grado de esterificación (15-40%) que las plantas controles y un menor contenido de pectinas solubles en EDTA (Tieman y col., 1992; Tieman y Handa, 1994), no obstante la dureza de los frutos no se vio afectada. Al igual que en el caso de la PG, los resultados sugieren que esta enzima está involucrada en la degradación de la pared celular pero su supresión no es suficiente para modificar la dureza de los frutos.

En frutos de fresa, se ha detectado actividad PME (Gizis, 1963; Neal, 1965; Barnes y Patchett, 1976; Archer, 1979) encontrándose que dicha actividad prácticamente se duplicaba, aproximadamente al pasar del estadio inmaduro al maduro. Posteriormente, la actividad disminuía hasta niveles basales en frutos muy maduros. En fresa se han caracterizado cuatro genes de PME, FaPe1 a FaPe4, de los cuales, el FaPe1, se expresa específicamente en fruto mostrando un incremento de la expresión durante la

maduración alcanzando el máximo en el estadio intermedio de maduración (Castillejo y col., 2004). Mediante líneas transgénicas con una alta actividad PME en fruto, se observó en el análisis de sus paredes celulares una reducción del 20% de la metilación de las pectinas solubles y unidas iónicamente, si bien no se pudo mostrar un aumento en la firmeza ni en la vida postcosecha, sí que mostraron una mejor resistencia a la infección por hongos (Osorio y col., 2008).

1.7.4.- Endo- β -1,4-D-glucanasa (EGasa)

La fracción de hemicelulosa de la pared es despolimerizada durante el reblandecimiento del fruto (Huber, 1984; Brummell y col., 1999). Una de las enzimas que se considera responsable de este proceso es la celulasa o glucanasa (EGasa, EC 3.2.1.4). Las EGasas hidrolizan glucanos con uniones β -D-1,4, aunque probablemente no son capaces de degradar la celulosa cristalina (Brummell y col., 1994). Sus sustratos en la pared celular podrían incluir al xiloglucano, regiones no cristalinas de la celulosa y posiblemente glucomananos con suficiente cantidad de β -D-1,4-glucanos para permitir la unión de la enzima al sustrato (Hatfield y Nevins, 1986; Nakamura y Hayashi, 1993; Ohmiya y col., 2000). Se ha encontrado actividad EGasa en todos los frutos examinados (Brummell y col., 1994) pero las cantidades encontradas varían notablemente según la especie considerada. En la mayoría de los frutos se ha descrito la existencia de numerosas isoformas de EGasa durante la maduración (Kanellis y Kalaitzis, 1992).

En el caso de la fresa, la enzima endo 1,4-D-glucanasa parece estar involucrada en el reblandecimiento del fruto (Abeles y Takeda, 1990). Barnes y Patchett (1976) detectaron actividad en frutos correspondientes a los estadios maduros y muy maduros. Además, se ha observado un aumento en la actividad de seis veces entre los estadios verde y rojo maduro (Abeles y Takeda, 1990). A pesar de la estrecha relación temporal entre esta actividad celulasa y el reblandecimiento y maduración del fruto, hay pocas evidencias microscópicas de cambios importantes en la matriz de celulosa a lo largo del desarrollo del mismo (Al-Jamali, 1973). A nivel génico, se han

aislado dos genes de celulasa en frutos de fresa (FaEg1 y FaEg3) que muestran alta expresión durante la maduración (Manning, 1998; Llop-Tous y col., 1999; Trainotti y col., 1999). Sin embargo, el papel de estos genes no es todavía conocido (Harrison y col., 2001).

Para determinar la posible función de estos genes en el proceso de maduración, Woolley y col. (2001) y Mercado y col. (2010) obtuvieron plantas transgénicas de fresa conteniendo secuencias en antisentido de FaEg1 y de FaEg3, respectivamente. En ambos casos no se observó ninguna diferencia en la dureza de frutos en estadio rojo maduro, entre las líneas transgénicas y el control. Palomer y col. (2006) obtuvieron plantas transgénicas con un silenciamiento parcial de ambos genes y no observaron variaciones ni en la composición de la pared celular ni en la dureza del fruto. Por tanto, los resultados obtenidos con plantas transgénicas no sostienen un papel de estas enzimas en el proceso de reblandecimiento de frutos de fresa.

1.7.5.- Expansinas (EXP)

Las expansinas son proteínas que inducen el “relajamiento” de la estructura de la pared aunque se cree que carecen de actividad hidrolítica y no se las considera enzimas. Se postula que su mecanismo de actuación es a través de la rotura o interrupción de puentes de hidrógeno, considerándose que actúan a nivel de la interacción celulosa-hemicelulosa (MacQueen-Mason y Cosgrove, 1994; 1995; Cosgrove 2000a; 2000b). Son proteínas cuya presencia se ha descrito en numerosos tejidos e, inicialmente, su función se relacionó con procesos de crecimiento (Cosgrove, 2000a; 2000b). La disminución del número de enlaces de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y las de hemicelulosa posibilitaría una mayor libertad de movimiento y una nueva disposición de los polímeros durante el crecimiento y expansión celular. Más recientemente se han descrito también en frutos, donde se considera que contribuyen a modificar la estructura de la pared incrementando el acceso de las hidrolasas a zonas de la pared celular que de otro modo no podrían alcanzar. Ello se traducirá finalmente en un reblandecimiento del fruto.

En tomate y fresa se han aislado los genes de expansinas cuya expresión coincide con los patrones espacio-temporales de maduración del fruto (Rose y col., 1997; Civello y col., 1999). En fresa, la expresión del gen denominado FaExp1 se detecta en el estadio blanco, momento en el que comienza el reblandecimiento del fruto, manteniéndose los niveles altos durante la maduración del fruto (Civello y col., 1999). Por otro lado, la supresión de la expansina del fruto de tomate (LeExp 1) resultó en una reducción del reblandecimiento, mientras que la sobreexpresión de LeExp 1 aumentó el reblandecimiento del fruto (Brummell y col., 1999). Ambos resultados concuerdan con la hipótesis de que la actividad de la expansina contribuye significativamente a la pérdida de firmeza de los frutos.

1.7.6.- Otros genes de pared

Se han identificado otros genes que actúan en la pared celular involucrados en el reblandecimiento del fruto y se ha analizado su expresión en distintos cultivares de fresa. Martínez y col. (2004) clonaron un fragmento de cDNA que codificaba un supuesto gen de xilosidasa (FaXyl) de fruto maduro. Posteriormente se aisló el gen con su secuencia y su región promotora completas (Bustamante y col., 2006; Bustamante y col., 2009). La xilosidasa libera residuos simples de la xilosa contenida en los oligosacáridos. La xilosa está presente en la hemicelulosa (xiloglucanos y principalmente xilanos) y en las pectinas (xilogalacturonanos). La mayoría de la xilosa que aparece en el fruto de fresa se encuentra en la fracción de hemicelulosa (Koh y Melton, 2002). Se han encontrado altos niveles de expresión y de actividad xilosidasa tanto en Camarosa, un cultivar de fruto duro, como en el Toyonaka que es un cultivar de fruto blando (Bustamante y col., 2006). El patrón de expresión de esta enzima durante el desarrollo del fruto y su maduración difiere entre los distintos cultivares estudiados, dificultando la correlación de la expresión de este gen con el reblandecimiento.

La galactosa y la arabinosa son los azúcares neutros que más disminuyen durante la maduración del fruto de fresa y se han aislado genes de galactosidasa y

arabinofuranosidasa. La actividad arabinofuranosidasa se ha detectado en todos los estadios de maduración del fruto, excepto en fruto verde pequeño (Rosli y col., 2009). Esta actividad aumenta con la maduración del fruto, alcanzando en frutos de cultivares blandos mayores niveles de expresión que en los cultivares duro. La actividad arabinofuranosidasa se ha detectado en frutos de *F. chiloensis* aunque, en este caso, se ha observado la mayor actividad en fruto verde grande (Figueroa y col., 2010). Tres genes de arabinofuranosidasa son los responsables de esta actividad (FaAra1, FaAra2 y FaAra3). El análisis de su expresión muestra que se expresan durante el desarrollo completo del fruto, incluyendo todos los estadios de maduración. Aparentemente ninguno está correlacionado con el reblandecimiento aunque, considerando la expresión global de los tres genes FaAra, el cultivar blando muestra una expresión mayor que el cultivar duro (Rosli y col., 2009).

La actividad galactosidasa se incrementa durante el desarrollo del fruto manteniéndose elevada durante el estadio maduro, lo cual está de acuerdo con la disminución del contenido de galactosa de la pared celular que se observa (Trainotti y col., 2001; Figueroa y col., 2010). En el trabajo de Trainotti y col. (2001) se indica la identificación de tres secuencias completas de galactosidasa (FaGal1 a FaGal3) que se expresan en fruto maduro. De los tres genes mencionados, sólo FaGal1 muestra un incremento elevado de expresión durante el proceso de maduración. FaGal1 y FaGal2 contienen un dominio que le sirve de anclaje a un azúcar específico. Este dominio podría incrementar la eficiencia en la liberación de residuos de galactosa de los polímeros de la pared celular.

1.8.- Silenciamiento del gen pectato liasa en fresa

Las plantas de fresa con las que hemos trabajado en esta tesis fueron obtenidas por Jiménez Bermúdez (2005). Para la transformación genética de las plantas de fresa se siguió el método desarrollado para el cultivar Chandler por Barceló y col. (1998). La bacteria que se utilizó provenía de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Hoekema y col., 1983) que poseía el plásmido Ti desarmado pAL4404. El T-DNA

tenía el gen pectato liasa en antisentido, como gen foráneo, controlado por el promotor del virus del mosaico de la coliflor con un amplificador, y un terminador en el extremo 3' derecho y como gen marcador, el gen de la neomicina fosfotransferasa (nptII) que le confiere resistencia al antibiótico kanamicina, con su promotor y su terminador en el extremo 5' (Figura 1.11).

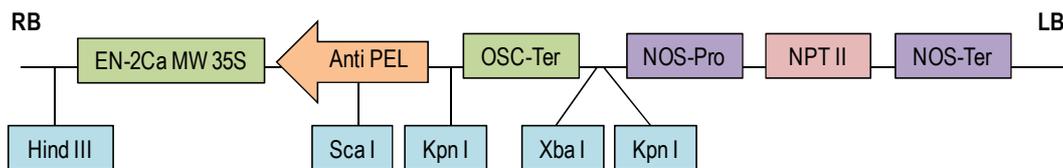


Figura 1.11: Esquema del T-DNA utilizado para transformar con el gen de pectato liasa en antisentido. RB: borde derecho, LB: borde izquierdo, ANTI PEL gen de la pectato liasa en antisentido, con su promotor EN-2Ca MW 35S y su terminador OSC-Ter, NPT II gen que le confiere resistencia a la kanamicina con su promotor NOS-Pro y su terminador NOS-Ter.

Se obtuvieron más de 70 líneas supuestamente transgénicas de las que se aclimataron 42 a condiciones de invernadero. De estas últimas se seleccionaron aquellas líneas transgénicas independientes más parecidas a los testigos en cuanto a producción y aspecto de los frutos, pero mostrando a la vez mayores valores de firmeza en fruto maduro. En estas líneas seleccionadas, los valores de inhibición del gen pIC en fruto rojo fueron superiores al 95%, observándose incrementos de dureza comprendidos entre el 25 y 30% en relación a los testigos (Jiménez-Bermúdez y col., 2002). A pesar de estos cambios en dureza, los frutos transgénicos no presentaron variaciones significativas en otros parámetros evaluados como color, forma o sólidos solubles. Las diferencias en dureza entre los frutos transgénicos y testigos sólo se observaron a partir de estadio blanco y no en estadios previos de desarrollo. La inhibición de la expresión de la pectato liasa reduce por tanto el reblandecimiento que ocurre entre los estadios blanco a rojo de maduración.

El incremento de firmeza en los frutos con la pectato liasa silenciada se mantuvo durante la postcosecha del fruto (Jiménez-Bermúdez y col., 2002; García Gago y col., 2009). De igual forma, ciertos parámetros de calidad de los procesados de fresa en forma de mermelada o zumos se vieron modificados en los frutos transgénicos (Sesmero y col., 2007; 2009).

A nivel de pared celular, análisis preliminares de estos frutos transgénicos mostraron una reducción del grado de hinchamiento *in vitro* de la pared, así como una menor solubilización de pectinas unidas iónicamente (Jiménez-Bermúdez y col., 2002).

Por otro lado, estudios histológicos mostraron que la lámina media de frutos maduros con el gen de la pectato liasa silenciado estaba menos degradada que en frutos control (Jiménez-Bermúdez y col., 2002). Estos resultados indican por tanto que la degradación de las pectinas mediada por la pectato liasa juega un papel importante en el reblandecimiento de la fresa. Para clarificar el papel de la pectato liasa en el desmantelamiento de la pared celular durante la maduración de la fresa, es necesario completar un análisis de estos polímeros pécticos.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



CAPÍTULO 2. **Objetivos**



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2.- Objetivos

El objetivo general de esta tesis es el estudio de los cambios que tienen lugar en la pared celular durante la maduración del fruto de fresa, tanto en frutos con el gen de pectato liasa silenciado como en frutos control. Este objetivo se concreta en varios objetivos parciales:

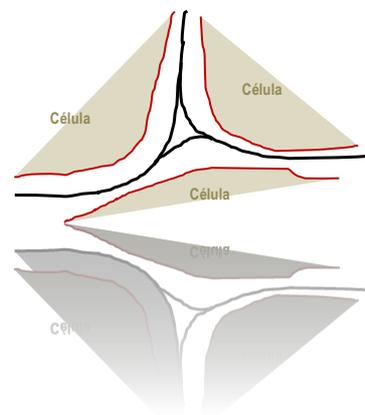
1.- Puesta a punto de una metodología para la extracción, fraccionamiento y análisis de la pared celular de frutos de fresa.

2.- Análisis comparativo de los polímeros de pared en frutos inmaduros (verdes) y maduros (rojos) con especial énfasis en los polímeros pécticos.

3.- Estudio del efecto del silenciamiento del gen pectato liasa en el proceso de desmantelamiento de la pared celular asociado a la maduración del fruto.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



CAPÍTULO 3. Material y métodos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3.- Material y métodos

3.1.- Material Vegetal

El trabajo de esta tesis se ha realizado con frutos de plantas de fresa *Fragaria x ananasa* Duch. cv Chandler. Las plantas de fresa se cultivaron en invernadero, en las instalaciones del IFAPA de Churriana, Málaga. Los frutos fueron recolectados a primera hora de la mañana, transportados al laboratorio en contenedores con placas de hielo para mantener una temperatura baja y posteriormente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -20°C.

Se ha trabajado con plantas transformadas genéticamente con la secuencia del gen de la pectato liasa en antisentido. En concreto, Apel 14, Apel 23 y Apel 39, tres líneas con el gen silenciado, obtenidas previamente por Jiménez-Bermúdez y col. (2002). Las líneas Apel 23 y Apel 39 mostraban una inhibición total de la expresión del gen pectato liasa mientras que Apel 14 mostraba una inhibición de expresión del 95%. Se ha trabajado con el fruto de estas fresas en dos estadios de maduración: rojo (como fruto en estadio maduro) y verde (como fruto en estadio inmaduro). Estas tres líneas se caracterizaban por tener frutos en estadio rojo significativamente más duros que el control.

Estas tres líneas transgénicas fueron cultivadas junto a las plantas control en condiciones confinadas en invernadero. Tanto las plantas control no transgénicas como las líneas transgénicas se propagaban vegetativamente a partir de estolones de plantas madre anualmente.

3.2.- Metodología

3.2.1.- Extracción de la Pared Celular

Debido a la existencia de distintos protocolos de extracción y fraccionamiento de paredes celulares, se probaron inicialmente tres protocolos. Para la extracción de

paredes celulares probamos dos protocolos descritos en la bibliografía: Redgwell y col. (1992) y Huber y col. (1993), así como una modificación de este último. La principal diferencia entre ellos era la manera de desactivar las enzimas pectinolíticas, además de que con el protocolo de Redgwell se obtenía una fracción de pectinas muy solubles que no se conseguían con el protocolo de Huber. Esto nos llevó a probar una modificación del protocolo de Huber con el fin de obtener esa fracción de pectinas más solubles que se obtenían siguiendo el procedimiento de Redgwell y col. (1992).

Las extracciones de la pared celular de los frutos se realizaron por triplicado.

3.2.1.1.- Protocolo de extracción de Redgwell

El protocolo de extracción de Redgwell (Redgwell y col., 1992) comenzó con una pulverización de los frutos en mortero con nitrógeno líquido (Figura 3.1). A continuación por cada 20 gramos de fruto triturado se añadieron 40 ml de una solución denominada PAW (fenol:acético:agua en proporción 2:1:1 p/v/v) y se procedió a una homogeneización con el ULTRA-TURRAX®, con tres pases de 1 minuto, siempre manteniendo todo el material en frío. Tras una centrifugación de 15 minutos a 4.000 g, se filtró el sobrenadante con doble capa de muselina (tejido Miracloth, ref: 475855, Calbiochem), y el precipitado se lavó resuspendiéndolo previamente en 20 ml de agua destilada y volviéndose a centrifugar a 4.000 g durante 15 minutos. Este paso de lavado se realizó dos veces. Todos los sobrenadantes obtenidos en los pasos anteriores se unieron en uno solo para proseguir con el protocolo, mientras que al precipitado se le añadió DMSO, para eliminar el almidón de la muestra, como se detalla más adelante.

El sobrenadante conjunto se dializó en agua destilada con una membrana de diálisis de 7.000 MWCO (SnakeSkin Pleated Tubing, ref: 68700 de la casa PIERCE) durante una semana y con al menos tres cambios diarios en un volumen 50 veces mayor de agua. A continuación se centrifugó a 23.000 g, se concentró usando un rotavapor y se secó mediante liofilización. La fracción así obtenida se denominó FRACCIÓN SOLUBLE EN PAW.

El precipitado resultante de las centrifugaciones anteriores se incubó toda la noche en 40 ml de DMSO al 90% en agitación suave a temperatura ambiente. Al día siguiente se centrifugó 15 minutos a 4.000 g. El nuevo precipitado se lavó dos veces con 20 ml de agua destilada, descartando los sobrenadantes. Con el DMSO se elimina el almidón de la muestra, por lo que la fracción soluble en DMSO se desechó tras comprobarse que no contenía pectinas de ningún tipo. El precipitado resultante tras este tratamiento, se secó mediante liofilización, obteniendo lo que Redgwell denominó CELL WALL MATERIAL (CWM) O PARED CELULAR (PC).

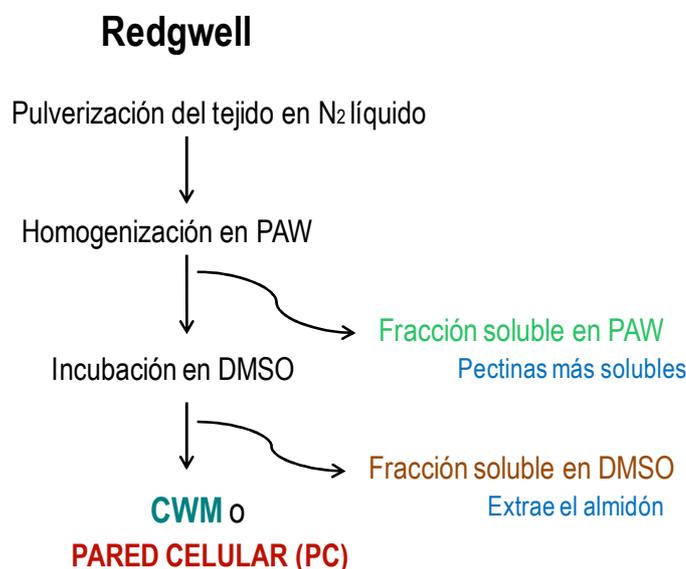


Figura 3.1: Descripción de los pasos seguidos para la extracción de la pared celular según el protocolo de Redgwell (Redgwell y col., 1992).

3.2.1.2.- Protocolo de Huber

El protocolo de extracción de Huber (Huber y col., 1993) se detalla a continuación (Figura 3.2):

La extracción comenzó con la pulverización de los frutos en mortero con nitrógeno líquido. A 20 gramos del pulverizado de fruto se le añadieron 20 ml de etanol al 80%,

se homogeneizaron con el ULTRA-TURRAX ® con tres pases de 1 minuto y siempre manteniendo todo el material en frío, igual que en el caso anterior.

A continuación se realizó un filtrado en doble capa de muselina (tejido Miracloth) y lo que quedó en el filtro se lavó, añadiendo 100 ml de etanol al 80%. El residuo que quedó en el filtro se recogió e introdujo en un tubo de 50 ml y se incubó en 20 ml de TRIS-fenol a pH 7 durante 30 minutos a 23°C. Se ajustó con etanol al 95% para llevar el volumen final a una concentración de etanol al 80% y se incubó 1 hora a -20°C.

Posteriormente, se filtró con GF/C (filtro de microfibra de vidrio, ref: FVC055, de la casa ALBET) y se lavó con 200 ml de etanol al 95%. Después se continuó con una incubación en 100 ml de cloroformo: metanol (1:1, v/v) durante 30 minutos a 23°C. Se volvió a filtrar con GF/C y se lavó con 200 ml de acetona. El residuo resultante se dejó secar a 34°C durante 12 horas para obtener lo que Huber denominó SÓLIDO INSOLUBLE EN ALCOHOL (AIS) o PARED CELULAR (PC).

La principal diferencia con el protocolo de extracción de Redgwell es que con éste no se extrae ninguna fracción parecida a la fracción de pectinas más solubles, por eso incluimos una modificación en este protocolo para obtener una fracción parecida a la fracción PAW extraída por Redgwell.

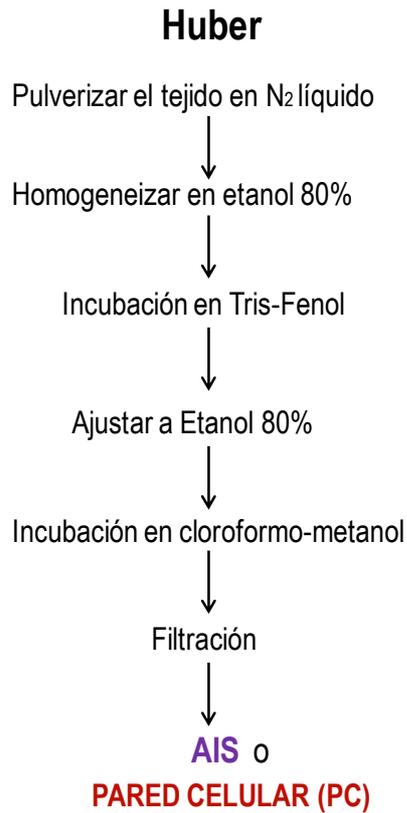


Figura 3.2: Descripción de los pasos seguidos para la extracción de la pared celular según el protocolo de Huber (Huber y col., 1993).

3.2.1.3.- Modificación del protocolo de extracción de Huber

El protocolo modificado de Huber comenzó como el protocolo de Huber (Huber y col., 1993) anteriormente mencionado (Figura 3.3).

Se pulverizaron los frutos con nitrógeno líquido y se homogeneizaron 20 gramos del pulverizado en 20 ml de etanol al 80%. Se filtró con doble capa de muselina (tejido Miracloth) y se lavó el filtrado con 100 ml de etanol al 80%. Se recogió lo que quedó en el filtro y se incubó en tris-fenol a pH 7 durante 30 minutos a 23°C.

La modificación propuesta se introdujo en este punto. La solución se pasó por un filtro GF/C. El residuo se recogió y se le añadieron 20 ml de agua destilada, se resuspendió y se centrifugó a 4.000 g durante 15 minutos, repitiéndose este paso de lavado otra vez. Todos los sobrenadantes obtenidos se unieron y tras una diálisis,

concentración y liofilizado como anteriormente se ha descrito, para el protocolo de Redgwell y se obtiene una FRACCIÓN EQUIVALENTE a la fracción PAW.

El residuo que quedó se ajustó a etanol al 80% y se incubó 1 hora a -20°C. Los pasos siguientes son iguales a los descritos con anterioridad; filtrado con GF/C seguido de un lavado con 200 ml de etanol al 95%. Se siguió con una incubación en 100 ml de cloroformo: metanol (1:1, v/v) durante 30 minutos a 23°C. Se realizó otro filtrado con GF/C y posterior lavado con 200 ml de acetona. El residuo se dejó secar a 34°C durante 12 horas para obtener el SÓLIDO INSOLUBLE EN ALCOHOL (AIS) o PARED CELULAR.

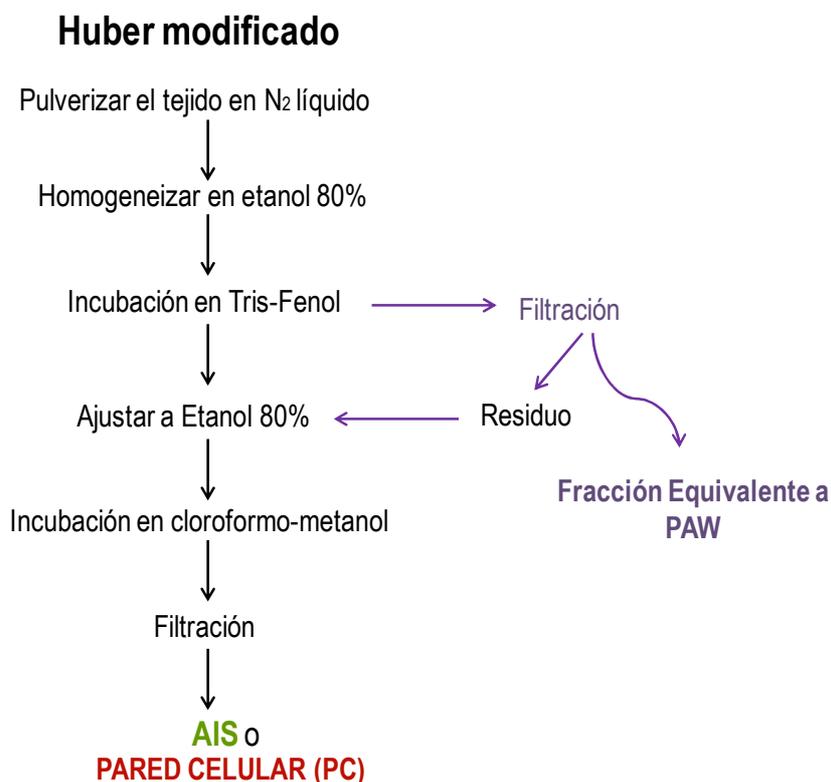


Figura 3.3: Descripción de los pasos seguidos para la extracción de la pared celular según la modificación propuesta para el protocolo de Huber.

Con esta modificación conseguimos una fracción de pectinas solubles, como la que se obtenía con el protocolo de Redgwell junto con el AIS que correspondería a la pared celular.

3.2.2.- Fraccionamiento de la Pared Celular

El fraccionamiento de la pared celular (Brummell y Labavitch, 1997) consistió en una serie de tratamientos secuenciales de la muestra con distintas soluciones. Cada uno de estos tratamientos permitía solubilizar grupos de polisacáridos diferentes, ligados más o menos fuertemente a la pared celular. Las soluciones empleadas para estos tratamientos fueron:

- AGUA: se obtienen las pectinas más solubles, las más débilmente unidas a la pared.
- CDTA (Ácido trans-1, 2-diamino Ciclohexano N,N,N',N' tetraacético monohidrato 50 mM + Acetato potásico 50 mM a pH 6): agente quelante de calcio y solubiliza las pectinas unidas por enlace iónico.
- CARBONATO (Carbonato Sódico 100 mM + Sodio Borohidrido (NaBH) 0.1%): rompe enlaces tipo éster y extrae las pectinas unidas por éster covalente.
- KOH 1M y KOH 4M (Hidróxido potásico a las concentraciones indicadas con Sodio Borohidrido 0,02M): extrae la hemicelulosa. La fracción KOH 1M es un paso intermedio y puede contener más pectinas que la KOH 4M.

El protocolo del fraccionamiento de la pared celular se describe a continuación (Figura 3.4): se incubaron 30 mg de pared celular (CWM de Redgwell o AIS de Huber y Huber modificado) en 15 ml de agua destilada manteniéndolo en agitación suave a temperatura ambiente durante toda la noche. Tras este tiempo se centrifugó a 4.000 g durante 15 minutos, el sobrenadante se guardó a 4°C y el precipitado se volvió a incubar con otros 15 ml de agua destilada durante toda la noche, volviendo a repetir todo el proceso anterior. Tras la segunda centrifugación ambos sobrenadantes se unieron. El volumen final de unos 30 ml, se filtró con filtro de microfibra de vidrio, GF/C (ref: FVC055, de la casa ALBET), y tras una diálisis frente a agua destilada durante una semana, (en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior para la

fracción PAW), se concentró mediante un rotavapor y se secó mediante liofilizado obteniendo así la FRACCIÓN SOLUBLE EN AGUA.

El precipitado resultante del paso anterior se incubó en 15 ml de tampón acetato con CDTA 50 mM, teniéndolo en agitación suave a temperatura ambiente toda la noche. Se centrifuga a 4.000 g durante 15 minutos. El precipitado de la centrifugación anterior se volvió a incubar en la misma solución con CDTA toda la noche. Tras la segunda centrifugación el precipitado que quedó se lavó dos veces resuspendiéndolo en 15 ml de agua destilada, y centrifugándolo a 4.000 g durante 15 minutos. Uniendo todos los sobrenadantes (los de la incubación con CDTA y los de los lavados en agua), y siguiendo los pasos descritos con anterioridad de filtrado con GF/C y diálisis para limpiar la muestra, seguido de la concentración mediante rotavapor y secado en el liofilizador se obtuvo la FRACCIÓN SOLUBLE EN CDTA.

A continuación el nuevo precipitado resultante se incubó dos veces en 15 ml de carbonato sódico 0,1M, en agitación suave toda la noche, seguido de dos lavados en 15 ml de agua en las mismas condiciones descritas. Uniendo todos los sobrenadantes (los de la incubación en tampón carbonato y los de los lavados en agua), y siguiendo los pasos descritos con anterioridad de filtrado, diálisis, concentración y liofilizado se obtuvo la FRACCIÓN SOLUBLE EN CARBONATO.

La siguiente incubación del precipitado se llevó a cabo en 15 ml de hidróxido sódico 1M. Se procedió igual que en los casos anteriores, dos incubaciones del precipitado con el KOH 1M toda la noche en agitación suave, seguido de dos lavados con 15 ml de agua destilada. Se unieron los sobrenadantes de todas las centrifugaciones y tras la diálisis, concentración y secado se obtuvo la FRACCIÓN SOLUBLE EN KOH 1M.

El precipitado que nos quedó se incubó ahora con hidróxido sódico 4M, en las mismas condiciones anteriores obteniendo así la FRACCIÓN SOLUBLE EN KOH 4M.

El residuo que quedó tras todo el proceso anterior contenía mayoritariamente CELULOSA y nada o sólo un residuo de polímeros pécticos.

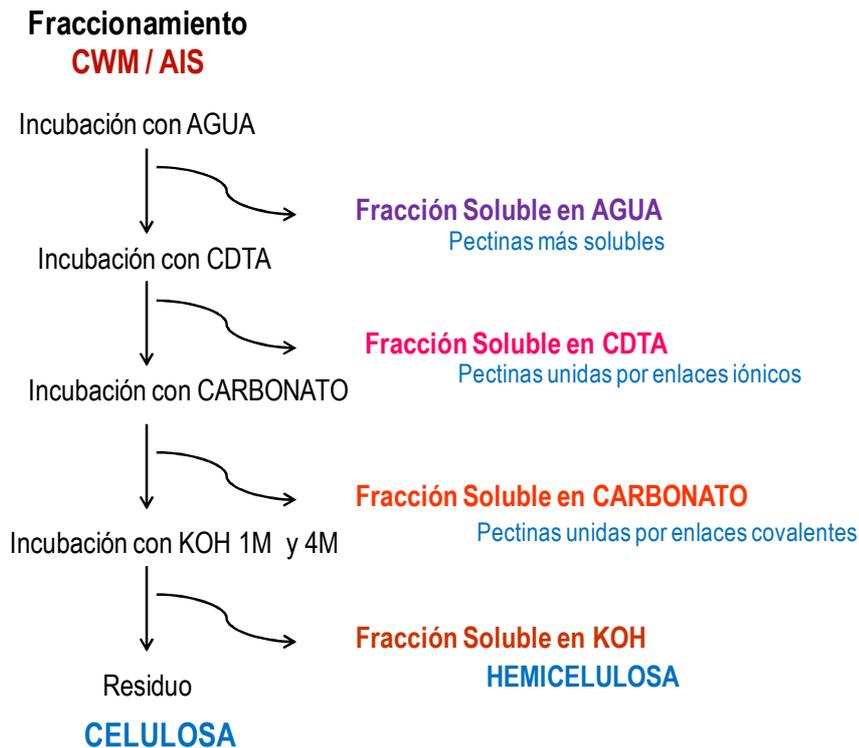


Figura 3.4: Descripción de los pasos seguidos para el fraccionamiento de la pared celular.

3.2.3.- Cuantificación de pectinas

La cuantificación de pectinas se realizó aplicando el método que emplea como reactivo el m-hidroxibifenil. Este protocolo está basado en el protocolo de Van den Hoogen (1998) y optimizado para nuestro sistema de trabajo siendo adaptados los volúmenes para la realización de las medidas en placa de Elisa de 48 pocillos. El ácido galacturónico es el componente principal y mayoritario de las pectinas por lo que su cuantificación proporciona una buena estimación de la cantidad de pectinas de la muestra.

Para la realización del ensayo, se mezclan 200 μ l de la muestra con 760 μ l de una solución de ácido sulfúrico al 96% con 120 mM de tetraborato sódico. Se incubó la reacción durante una hora a 80°C. Transcurrido ese tiempo, se tomó una primera medida de la densidad óptica a 515 nm en un lector de Elisa (lector ELx800, controlado con el programa Gen 5, 1.05, Bio-Tek Instrument, Inc).

A la mezcla se le añadieron 160 μ l del reactivo que le da color rosado (100 mg m-hidroxibifenil/1ml de DMSO, diluido con ácido sulfúrico al 80% v/v en una proporción de 1:50 v/v). Tras 15 minutos, se tomó la segunda medida de densidad óptica a 515 nm.

La diferencia de absorbancias entre ambas medidas era mayor cuanto mayor cantidad galacturónico presentaba la muestra. Para dar los resultados de la cantidad de ácido galacturónico, se extrapolaó este valor de absorbancia en una recta patrón, previamente obtenida con concentraciones de ácido galacturónico conocido. De cada medida se realizaron al menos tres repeticiones de muestras independientes.

3.2.4.- Cuantificación de azúcares totales

Se realizó una estimación de la cantidad de azúcares totales de las muestras con el método del orcinol-sulfúrico (Dubois y col., 1956) con algunas modificaciones que se describen a continuación y adaptando los volúmenes para la realización de las medidas en placa de Elisa de 96 pocillos.

Se mezclaron 40 μ l de la muestra con 160 μ l del reactivo orcinol-sulfúrico, formado por ácido sulfúrico al 60% v/v mezclado con orcinol (ref: 15A639.1206, de Panreac) al 1,6% p/v en proporción 7,5:1. Las reacciones se incubaron durante 30 minutos a 100°C. La reacción se paró en frío y se pasó a una placa a hielo durante 15 minutos. Posteriormente cuando la mezcla se atemperó se midió la absorbancia a 450 nm.

Para estimar la cantidad de azúcares se extrapolaron los valores de la densidad óptica de cada muestra en una recta patrón con concentraciones conocidas de glucosa medidas de igual manera. Se realizaron, al menos, tres medidas independientes de azúcares en cada muestra.

3.2.5.- Cromatografía de filtración en gel.

Mediante la cromatografía de filtración en gel se separan moléculas según su masa molecular. La muestra se pasó por una columna que contiene un gel con un determinado tamaño de poro. Este gel hace que las moléculas más pequeñas pasen a través del poro y tengan un mayor recorrido que las moléculas de mayor tamaño, las cuales no pueden pasar a través de él saliendo antes en el eluido por el otro extremo de la columna.

Hemos empleado columnas de dos tamaños: unas de 95 cm de longitud y un diámetro de 0,8 cm y otras de 45 cm de longitud y un diámetro de 0,5 cm.

Se utilizaron dos tipos de geles que nos permitían discriminar dos rangos de tamaños moleculares: Sepharosa CL-6B, que separa moléculas con tamaño comprendido entre 10 y 1.000 KDa y Sepharosa CI-2B, que discrimina bien entre 100 y 20.000 KDa.

Se emplearon dos tipos de tampones dependiendo del tipo de muestra que circulaba por la columna. Se utilizó el tampón acetato 0,2M a pH 5,0 (Redgwell y col., 1997b), para las fracciones PAW, AGUA y CDTA y el tampón TRIS-HCl 0,1M a un pH 8,4 para las fracciones CARBONATO, KOH 1M y KOH 4M.

Las cromatografías se realizaron en cámara fría a 4°C, siendo también conveniente que los tampones acetato y TRIS-HCl estén fríos y desgasificados antes de utilizarlos. Las columnas se cargaron por la parte superior y estaban conectadas mediante tubos de teflón a una bomba peristáltica que hacía mantener un flujo constante en la columna, que se fijó en 14 ml/h. El volumen de elución se recogió fraccionado mediante un colector de fracciones (Figura 3.5). El volumen de las fracciones fue de aproximadamente 2 ml para las columnas grandes y en torno a 1 ml para las pequeñas (Figura 3.5).

A las muestras recogidas en el colector de fracciones se les midió la cantidad de ácido galacturónico y la cantidad de azúcares totales mediante los protocolos anteriormente descritos para obtener los perfiles cromatográficos donde se representa

la densidad óptica de la medida de galacturónico y/o azúcares frente al volumen de elución.

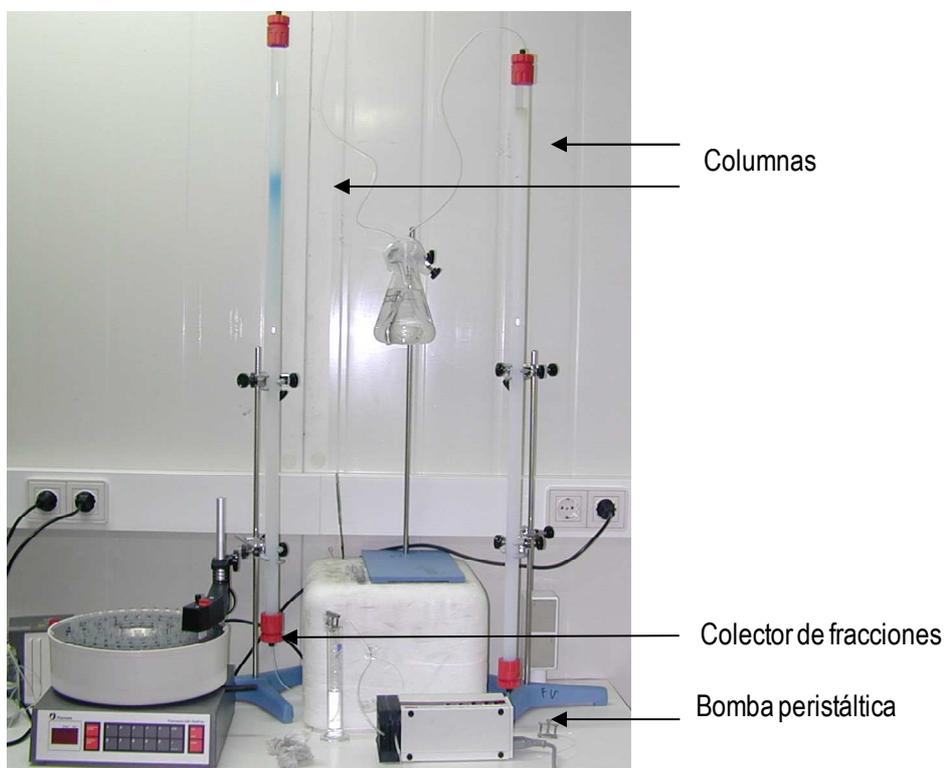


Figura 3.5: Área y equipo de trabajo de las cromatografías de filtración en gel, con las columnas, la bomba peristáltica y el colector de fracciones.

Las columnas se caracterizaron con unos estándares de masa molecular conocida. En ambas columnas se utilizó, en las mismas condiciones de las muestras, el azul de dextrano, un estándar de 2.000 KDa (Sigma ref: D4772). Para la columna con la Sepharosa CI-6B se emplearon además dextransos de 80 y 12 kDa (FLUKA Biochemika) para su calibrado.

3.2.6.- Hinchamiento *in vitro* de la pared celular

El estudio del hinchamiento *in vitro* de la pared celular (PC) del fruto se realizó en muestras control de fruto rojo y de fruto verde según el procedimiento descrito a continuación:

Se colocaron en viales de cristal de 0,4 cm de diámetro por 5 cm de alto 16 mg de pared celular pulverizada con nitrógeno líquido. A continuación se le añadieron 200 μ l de agua destilada y se volteó el vial hasta que toda la pared celular estuvo humedecida con el agua. Después, se rellenó todo el tubo con agua y se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente. La altura de la pared hidratada, después de estabilizarse se tomó como medida del hinchamiento *in vitro* de la pared celular.

Tras el hinchamiento con agua de la pared celular se probaron varios tratamientos y se evaluaron las alturas obtenidas. Los tratamientos empleados fueron:

- Tratamiento de carbonato (usando la misma solución que para el fraccionamiento de la pared).
- Tratamiento de calcio (empleando CaCl_2 , 100 mM al 1%).
- Tratamiento de CDTA (utilizando la misma solución que para el fraccionamiento de la pared).
- Tratamiento de CDTA, la misma solución que en el fraccionamiento, y luego se sustituyó por calcio, (CaCl_2 , 100 mM al 1%).

Para realizar estos tratamientos fue necesario sustituir toda el agua que contenía la muestra tras el hinchamiento *in vitro* por la solución con la que se quería tratar. Para ello se retiró el agua con una pipeta y se añadió la solución correspondiente, se volteó y se dejó reposar. Cuando se separaron las dos fases, se quitó el líquido y se volvió a añadir solución, repitiendo este proceso hasta asegurarnos que se había sustituido toda el agua por la solución (al menos cinco veces). La medida se tomó al estabilizarse la medida de la altura, una vez completado el procedimiento.

La altura de la pared hidratada se toma como el grado de hinchamiento. Una mayor altura supondrá un mayor grado de hidratación de la pared y consiguientemente una mayor desmantelamiento de la misma.

3.2.7- Medida de poliurónidos totales de la pared celular

La cuantificación de la cantidad de pectinas totales que hay en la pared celular se basó en el protocolo de Ahmed y Labavitch (1978). Para ello se pesaron de 6 mg de pared celular y se añadieron 0,83 ml de ácido sulfúrico concentrado y previamente enfriado. Se mantuvo 5 minutos en agitación suave y se le añadieron 0,26 ml de agua destilada se dejó 5 minutos en agitación suave. Este proceso se realizó dos veces. A continuación se añadieron 10 ml de agua destilada y se puso en agitación suave otros 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó durante 10 minutos a 4.000 g, quedando los poliurónidos en el sobrenadante. Para su cuantificación se realizaron las medidas de azúcares y galacturónicos previamente descritos.

3.2.8.- Medida de antocianinas

La medida de antocianinas presentes nos da una estimación del grado de maduración del fruto (Given y col., 1988). La medida de antocianinas realizado está basada en la metodología de Giusti y col. (1999), que se describe a continuación:

El fruto se pulverizó en nitrógeno líquido. A 1 gramo de fruto pulverizado se le añadieron 3 ml de etanol con 1% v/v de ácido clorhídrico, y se homogenizó con el ULTRA-TURRAX® se dieron tres pases de 30 segundos manteniéndolo en frío y se incubó el extracto a 4°C un mínimo de cuatro horas. Luego se centrifugó 10 minutos a 10.000 g a 4°C y se midió el volumen del sobrenadante en una probeta de 10 ml. Se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 530 nm y de 657 nm. El contenido de antocianinas se estimó como la diferencia entre el valor de absorbancia obtenido a 530 nm y el obtenido a 657 nm. Finalmente las medidas se expresaron como DO x ml extracto/g de peso fresco.

3.2.9.- Análisis de elementos esenciales

El análisis de los elementos esenciales de la pared celular se llevó a cabo en los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga, donde se llevaron las muestras de paredes celulares para su análisis. Se realizaron dos tipos de análisis: análisis elemental cuantitativo y espectrometría atómica, que pasamos a describir someramente.

El análisis elemental cuantitativo de muestras sólidas, líquidas viscosas y filtros permite obtener el contenido de C (carbono), H (hidrógeno), N (nitrógeno), S (azufre) y O (oxígeno) medido en porcentaje respecto al peso. La técnica de Análisis Elemental está totalmente automatizada, y se basa en la combustión completa de la muestra, en condiciones óptimas (950 a 1300 °C y atmósfera de oxígeno puro), para convertir los elementos antes mencionados en gases simples (anhídrido carbónico, nitrógeno, agua y anhídrido sulfuroso). Estos gases, después de ser separados con distintas técnicas (columna cromatográfica, infrarrojos) según el equipo utilizado, son medidos y se procesan teniendo en consideración el peso de la muestra y los datos proporcionados por una muestra patrón obteniéndose de este modo el contenido porcentual de cada elemento en la muestra.

La espectrometría atómica, en términos generales, está basada en la medición de los espectros de absorción, emisión o fluorescencia de átomos o iones elementales. Hay dos regiones del espectro que dan información atómica: la ultravioleta/visible y la de rayos X. Por otra parte, los iones cargados pueden ser separados y determinados mediante dispositivos denominados espectrómetros de masas. Los espectros atómicos ultravioleta y visible se obtienen mediante un adecuado tratamiento térmico que convierte los componentes de una muestra en átomos o iones elementales gaseosos. La emisión, absorción o fluorescencia de la mezcla gaseosa resultante sirve a continuación para la determinación cualitativa y cuantitativa de uno o varios de los elementos presentes en la muestra.

3.2.10.- Medida de la dureza de los frutos

La dureza de los frutos se midió empleando un penetrómetro manual (modelo FT02, Effegi, Italy) (Figura 3.6) que mide la resistencia de un fruto a ser penetrado con una aguja plana. La dureza se midió en frutos recién recolectados. El aparato se colocó siempre de manera perpendicular al fruto haciendo una leve presión hasta que la aguja entraba en el fruto. Estas medidas se realizaron en la zona de mayor diámetro del fruto, a una profundidad aproximada de 0,5 cm.

La superficie de las agujas varió dependiendo de los estadios de maduración estudiados, siendo para el fruto verde de 0,78 mm², para el blanco y el intermedio de 3,14 mm² y para el fruto rojo de 9,62 mm².



Figura 3.6: Medición de dureza en frutos de fresa con el penetrómetro (autor: Silvia Jiménez-Bermúdez. Fotografía usada con permiso del autor).

3.2.11.- Caracterización histológica de frutos de fresa

La caracterización histológica que se muestra en esta tesis y que aparece como resultado en el capítulo 6: “Efecto de la inhibición por tecnología antisentido de un gen de pectato liasa en la despolimerización de las pectinas y el reblandecimiento del fruto de fresa”, se corresponde al artículo publicado (anexo I) y sirve para apoyar nuestros resultados. Esta caracterización histológica fue realizada por Silvia Jiménez-Bermúdez.

Las muestras analizadas se cortaron en fragmentos de 0,5 cm de frutos recién recogidos procedentes de diferentes tejidos y de la zona de máximo diámetro, separando los bloques de inclusión en Epidermis-Córtex por un lado y Médula por otro.

Los cortes histológicos del fruto se realizaron utilizando el Kit comercial Historesin embedding de Leica. El proceso al que se sometieron los frutos consistió en una inmersión en una solución fijadora comercial Bouin durante 24 horas. Posteriormente se deshidrataron en una serie de etanoles diluidos (primero se colocaron en etanol 70%, 30 minutos 2 veces, luego en etanol 80%, 30 minutos 2 veces y por último etanol 95% 1 hora 2 veces). Posteriormente se pasó a la solución de preinfiltración-infiltración (incluida en el Kit). Como último paso se embebieron en la solución polimerizante Embedding medium que incluía el Kit. Los bloques y la polimerización de la parafina se realizaron a temperatura ambiente. Una vez endurecida la resina, se obtuvieron secciones transversales de 4µm empleando un microtomo de deslizamiento (HN 340 Micro Heidelberg). Se colocaron los cortes en una gota de agua destilada a 37°C para que se estiraran en el mismo portaobjetos y se dejaban secar en una plancha calefactora a 37°C.

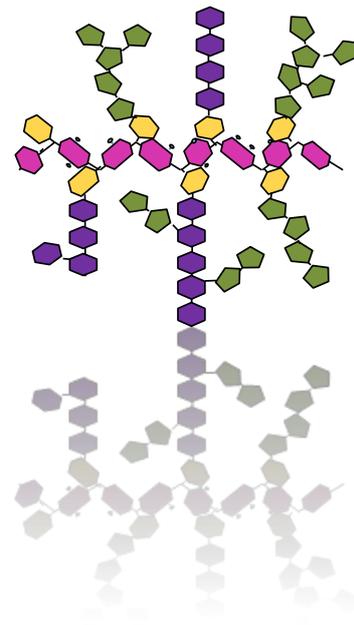
Para teñir las muestras se empleó rojo rutenio para las pectinas, a una concentración 0,2g/l durante dos horas; pasado ese tiempo se enjuagó con agua destilada. Para la tinción de celulosa se utilizó tionina a una concentración de 0,25 g/l durante 1 minuto; pasado ese tiempo, la muestra se enjuagaba con una solución de NaHCO_3 (1 g/l).

Las muestras se visualizaron mediante microscopio óptico con distintos aumentos. En algunos casos se estimó el área celular mediante el programa informático Visilog 6.

3.2.12.- Análisis estadístico de los datos.

Los datos fueron analizados en SPSS statistics 22 o R (versión 3.1.2) mediante análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias (T de Student y Test HSD de Tukey), según el caso, y previa verificación de la homogeneidad de las varianzas (Test

de Levene) y normalidad (Shajuro-Wilk) o igualdad de varianzas respectivamente. Para la comparación estadística se tomó un intervalo de confianza del 95% y se usaron al menos tres réplicas. Los datos fueron representados gráficamente usando SigmaPlot 11.0 Notebook.



CAPÍTULO 4.

Elección y puesta a punto del protocolo de extracción y fraccionamiento de la pared celular



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4.- Elección y puesta a punto del protocolo de extracción y fraccionamiento de la pared celular

La elección de un protocolo de extracción de pared celular se realizó con frutos de fresa del cultivar Chandler no transgénicos en estadio rojo. Se ensayaron tres protocolos de extracción: dos previamente empleados en distintos frutos, incluida la fresa, a los que denominamos protocolo de Redgwell y protocolo de Huber, y una modificación del método empleado por Huber que consistió en añadir al original un paso previo de extracción (detalles en el capítulo 3 “Material y Métodos”). El objetivo era conocer qué protocolo era más adecuado para frutos de fresa en cuanto a la cantidad de pared celular extraída y su posterior fraccionamiento, ya que en aquellos momentos estaba menos estudiado que otros frutos. Además, también se evaluó a efectos comparativos la cantidad de pectinas y de azúcares de las distintas fracciones, la presencia de distintos elementos esenciales y el comportamiento en cromatografía de filtración en gel de las fracciones. Esta última técnica permite estimar la masa molecular de los principales polímeros presentes en las fracciones y ver posibles diferencias.

Durante el fraccionamiento de la pared celular descrito en el capítulo 3 “Material y Métodos”, se obtenían las fracciones denominadas AGUA, CDTA, CARBONATO, KOH 1M y KOH 4M. En la elección del protocolo se tuvieron en cuenta preferentemente las fracciones en las que se solubilizaban de forma mayoritaria las pectinas, en concreto, las fracciones AGUA, CDTA y CARBONATO. Las fracciones solubilizadas con KOH 1M y 4M, ricas en hemicelulosa, también contienen una pequeña proporción de pectinas pero no fueron consideradas a la hora de comparar y elegir protocolo.

4.1.- Extracción de pared celular y fraccionamiento

En la Figura 4.1 A se muestra la cantidad de pared celular referida a peso de fruto. Se observó que las cantidades obtenidas mediante el protocolo de extracción de

Redgwell y el de Huber fueron muy similares, en torno a 0,7-0,8 g por 100 g fruto y no se observaron diferencias significativas entre ambos métodos. En el caso de la modificación ensayada del protocolo de Huber se registró una disminución muy significativa de la cantidad de pared celular extraída, con valores alrededor de 0,3 g por cada 100 g de fruto.

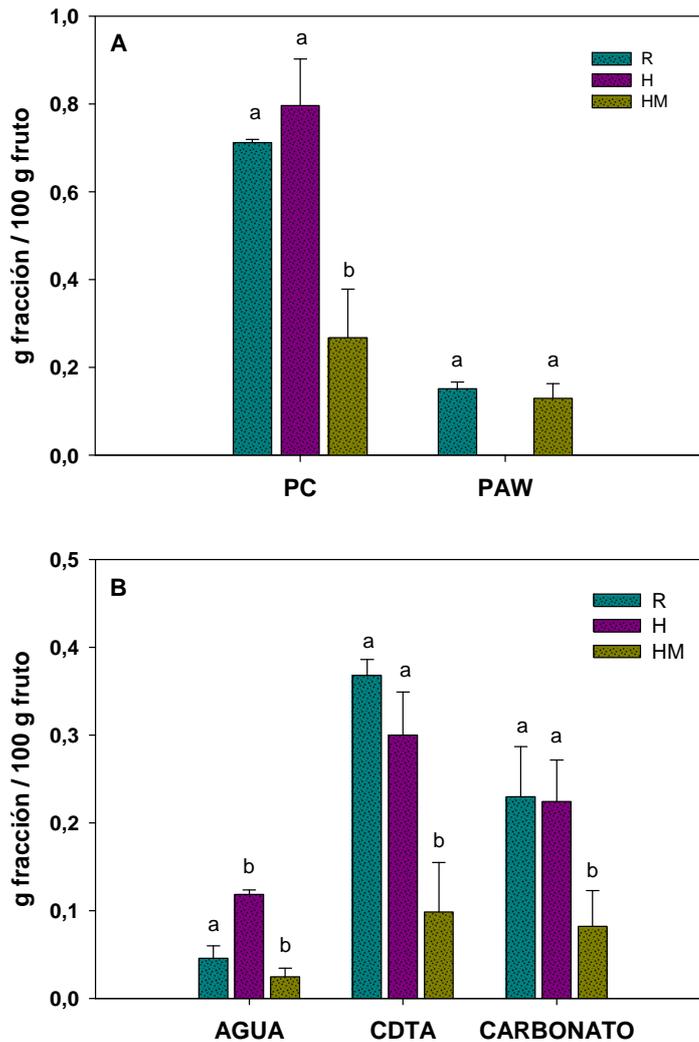


Figura 4.1: Cantidad de pared celular y fraccionamiento obtenido. **A:** Cantidad de pared celular (PC) y de fracción PAW, expresado en g/ 100 g fruto. **B:** Fraccionamiento de la pared celular, expresado en g fracción /100 g de fruto. **R** corresponde al protocolo de Redgwell, **H** al de Huber y **HM**, al de Huber modificado. En la comparación de los tres protocolos, para cada fracción, los valores medios no fueron significativamente diferentes si comparten la misma letra, según un análisis de ANOVA y Test HSD de-Tukey, con un límite de confianza de 95%.

También comparamos la cantidad de material que queda solubilizado en el medio de extracción que contiene fenol, acético y agua, (fracción PAW). Se obtuvieron valores en torno a los 0,15 g por 100 g de fruto y esta cantidad fue similar con los protocolos de Redgwell y de Huber modificado. Recordemos que esta fracción no se extraía con el protocolo de Huber.

En lo que se refiere al fraccionamiento de la pared celular podemos observar en la Figura 4.1 B las cantidades de fracción soluble en agua, en CDTA y en carbonato referidas también a fruto. Se observó que la cantidad de fracción AGUA de la extracción de Huber fue estadísticamente superior ($0,12 \pm 0,013$ g/100 g fruto) a las obtenidas usando el protocolo de Redgwell ($0,04 \pm 0,005$ g/100 g fruto) y el modificado de Huber (en torno a 0,025 g/100 g fruto). Esto se pudo deber a que con el agua se extraían, en el caso de Huber, más cantidad de polímeros de pared solubles, ya que no se habían solubilizado previamente con el paso de PAW, como en el caso de Redgwell y de Huber modificado.

La cantidad más alta de fracción soluble en CDTA se obtuvo usando el protocolo de Redgwell, pero sin llegar a ser estadísticamente distinta a la de Huber. Por el contrario, la cantidad de fracción obtenida con el protocolo modificado de Huber fue significativamente menor que las obtenidas con los otros dos protocolos. De igual forma, en el caso de la fracción CARBONATO, no se apreciaron diferencias entre los protocolos de Redgwell y de Huber en cuanto a cantidad de fracción obtenida, pero esta fracción fue significativamente inferior en la modificación del protocolo de Huber.

Al tratarse de un fraccionamiento de la pared celular es conveniente expresar los datos obtenidos del fraccionamiento no solo por peso de fruto, sino también por cantidad de pared celular de partida (Figura 4.2).

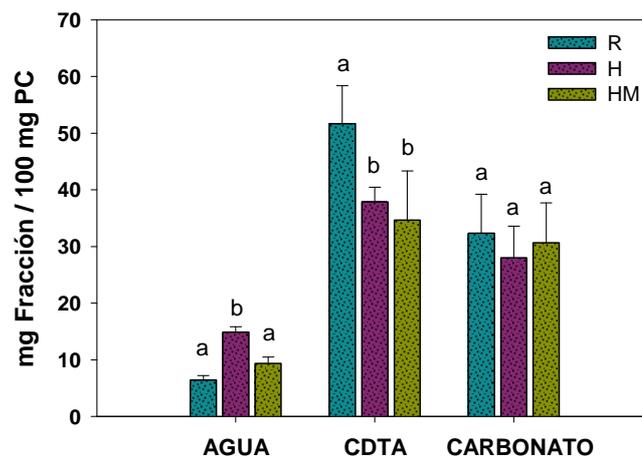


Figura 4.2: Fraccionamiento de la pared celular, expresado en mg fracción /100 mg de pared celular (PC). **R** corresponde al protocolo de Redgwell, **H** al de Huber y **HM**, al de Huber modificado. En la comparación de los tres protocolos, para cada fracción, los valores medios no fueron significativamente diferentes si comparten la misma letra según un análisis de ANOVA y Test HSD de-Tukey, con un límite de confianza de 95%.

Calculada de este modo, la fracción soluble en agua sigue siendo superior con la extracción de Huber y no se aprecian diferencias significativas entre el protocolo de Redgwell y la modificación de Huber. En el caso de la fracción soluble en CDTA, se observó que con el protocolo de Redgwell se obtuvo una cantidad de fracción estadísticamente mayor que la obtenida con el protocolo de Huber y con la modificación del protocolo de Huber, siendo estas dos últimas extracciones estadísticamente similares. En cuanto a la fracción soluble en tampón carbonato no se encontraron diferencias significativas entre los tres protocolos cuando se refirieron los datos a cantidad de pared.

4.2.- Cantidad de poliuronidos obtenidos

La cantidad de pectinas (poliuronidos) en una muestra se puede estimar midiendo el contenido de ácido galacturónico. Nosotros lo hemos cuantificado con el protocolo de Van den Hoogen (1998). En la Figura 4.3 se representa la cantidad de ácidos urónicos (AU) referida a 100 mg de fruto, tanto en la pared celular, como en la fracción PAW.

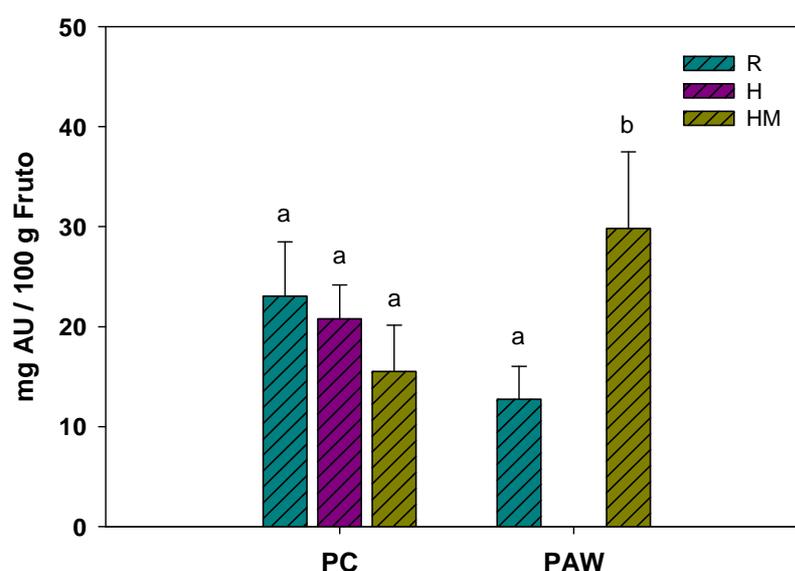


Figura 4.3: Cantidad de pectinas de la pared celular (PC) y de la fracción PAW, expresada en mg de AU /100 g fruto; con el protocolo de Huber no se extrae fracción PAW. **R** corresponde al protocolo de Redgwell, **H** al de Huber y **HM**, al de Huber modificado. En la comparación de los tres protocolos, para cada fracción, los valores medios no fueron significativamente diferentes si comparten la misma letra, según un análisis de ANOVA y Test HSD de-Tukey, con un límite de confianza de 95%.

No se aprecian diferencias significativas en la cantidad de pectinas presentes en la pared celular (PC) entre los tres protocolos evaluados. Dichos valores oscilaron entre los $23,05 \pm 5,43$ mg AU/100mg de fruto con el protocolo de Redgwell y los $15,51 \pm 4,64$ mg de AU/100 mg de fruto de la modificación del protocolo de Huber. La cantidad de pectinas de la fracción PAW extraída con el protocolo de Redgwell oscilaba alrededor de los 13 mg por cada 100 mg de fruto, siendo superior la cantidad

de pectinas obtenida con el protocolo de Huber modificado, en torno a 30 mg AU/100mg de fruto.

En la Figura 4.4 se representa la cantidad de ácidos urónicos referida a 100 mg de pared celular, en las tres fracciones de pared evaluadas.

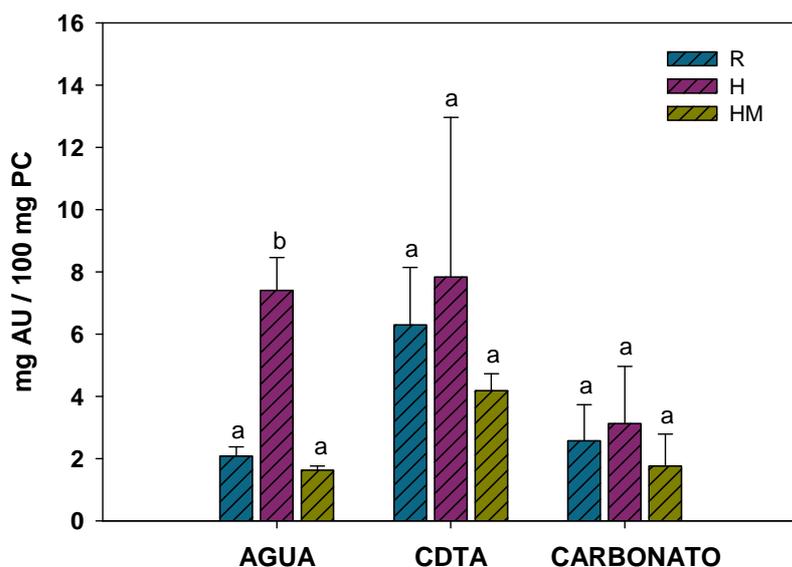


Figura 4.4: Cantidad de pectinas en el fraccionamiento de la pared celular (PC). Expresada en mg de ácidos urónicos (AU) por 100 mg de pared celular. **R** corresponde al protocolo de Redgwell, **H** al de Huber y **HM**, al de Huber modificado. En la comparación de los tres protocolos, para cada fracción, los valores medios no fueron significativamente diferentes si comparten la misma letra, según un análisis de ANOVA y Test HSD de-Tukey, con un límite de confianza de 95%.

Con el protocolo de Redgwell y el de Huber modificado no se apreciaron diferencias significativas en la fracción solubilizada con agua y los valores rondaban los 2 mg de ácidos urónicos por cada 100 mg de pared celular. Con el protocolo de Huber, el contenido péctico de la fracción AGUA era mayor, alcanzando los $7,40 \pm 1,06$ mg AU por 100 mg de pared celular, lo que muy probablemente se debe a que este fraccionamiento no emplea el paso previo con PAW que solubiliza pectinas en los otros dos métodos. De hecho, estas diferencias se minimizan si se comparan los tres

protocolos usando la suma de la fracción PAW y la de AGUA, ambas representativas de las pectinas más solubles (nada o muy débilmente ligadas a la pared celular).

En la fracción péctica soluble en CDTA no se observaron diferencias significativas entre los tres protocolos, con un rango comprendido entre los 4 mg AU/100mg de pared celular con Huber modificado y los casi 8 mg obtenidos empleando el protocolo de Huber. A pesar de no existir diferencias estadísticas debido a la gran desviación, se observó de forma consistente la tendencia de una menor presencia péctica usando la modificación del protocolo de Huber.

En la fracción soluble en CARBONATO, no se encontraron diferencias significativas entre los protocolos, con valores medios en torno a los 2 mg de ácidos urónicos por cada 100 mg de pared celular.

Los resultados obtenidos nos llevaron a descartar la modificación del protocolo de Huber debido a su bajo rendimiento a la hora de obtener pared celular y a que el fraccionamiento posterior de esa pared no mostró ningún beneficio con respecto a los otros dos protocolos.

4.3 Contenido de elementos esenciales en las paredes obtenidas

El contenido de distintos elementos esenciales se estimó en las paredes celulares obtenidas con los protocolos de Redgwell y Huber y los resultados se muestran en la Figura 4.5 A para los más abundantes, como son el oxígeno, carbono, hidrógeno y nitrógeno, y en la Figura 4.5 B para el boro, calcio, potasio, magnesio y sodio que son menos abundantes.

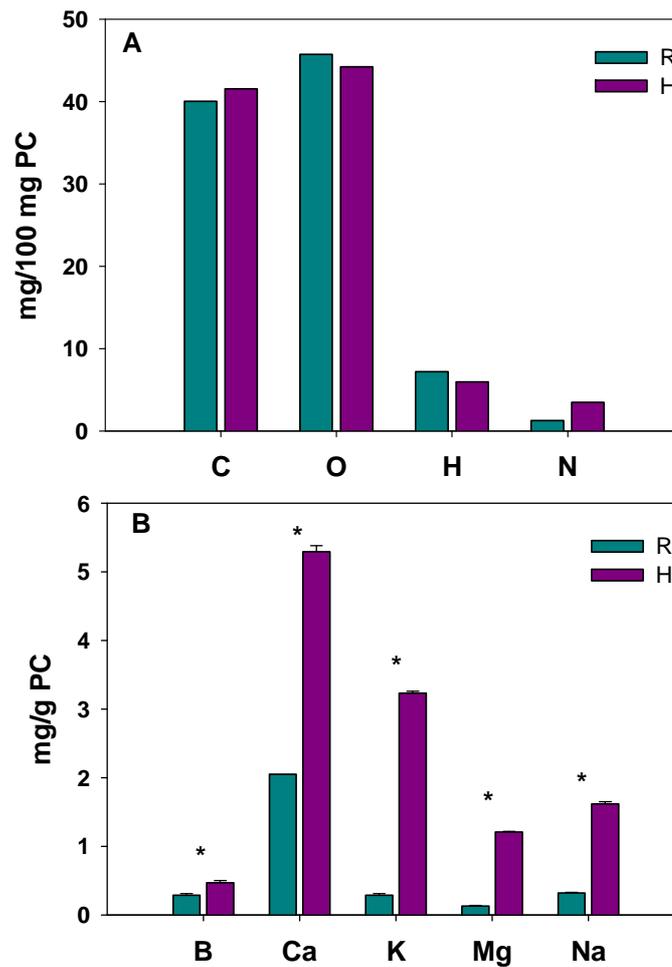


Figura 4.5: Abundancia de elementos esenciales de la pared celular extraída con el protocolo de Redgwell y con el de Huber. **A:** Contenido en C, O, H y N, expresado en mg por 100 mg de pared celular. **B:** Contenido en B, Ca, K, Mg y Na, expresado en mg por g de pared celular. En la comparación de los dos protocolos, para cada elemento, el asterisco indica que fueron significativamente diferentes, según un análisis de t-Student, con un límite de confianza del 95%.

Como se puede observar, el contenido de los cuatro elementos más abundantes es similar en los dos protocolos pero la presencia de los elementos metálicos es superior en el caso del protocolo de Huber. Según Huber (1991), el tratamiento con PAW puede llegar a reducir de un 35 a un 40% el contenido de calcio de la pared celular. En la gráfica 4.5 B observamos que en la muestra obtenida con el protocolo de Redgwell, el calcio tiene un valor próximo a 2,1 mg/g de pared celular y en el obtenido

con el protocolo de Huber de $5,29 \pm 0,09$ mg/g de pared, lo que concuerda con los valores obtenidos por Huber (1991). Observamos también una reducción importante de la cantidad extraída con el protocolo de Redgwell respecto al de Huber en el potasio, magnesio y sodio, no evaluados por Huber (1991). El paso de extracción con PAW, a pH relativamente bajo, parece facilitar la extracción de parte de estos elementos que se encuentran como cationes en la pared celular y disminuyendo, por tanto, su contenido en el residuo seco de pared obtenido con el protocolo de Redgwell.

4.4.- Cromatografía de filtración en gel de las fracciones de pared celular

La cromatografía de filtración en gel proporciona una estimación de la masa molecular de los polímeros o grupos de polímeros más representados en las distintas fracciones. Es una técnica usada por distintos autores para caracterizar las fracciones (Brummell y col., 1999; Rosli y col., 2004) pero requirió de una fase de optimización para aplicarla al material procedente de fruto de fresa. Inicialmente se utilizaron columnas de longitud considerable (95 cm de altura y un diámetro de 0,8 cm) pues eran las que estaban descritas en la bibliografía para este uso (Redgwell y col., 1997b; Rose y col., 1998). Se utilizaron dos tipos de geles para las columnas con diferente rango de fraccionamiento de masas moleculares.

Recordamos que, en el caso de las pectinas de las fracciones solubles, las fracciones PAW y AGUA se separaron por cromatografía en columnas que contenían el gel de Sepharosa CL-6B que separa polímeros con un tamaño comprendido entre los 10 y 1.000 KDa. Para las pectinas obtenidas en las fracciones de CDTA y CARBONATO, se usaron las columnas con Sepharosa CL-2B, que discrimina polímeros con tamaño comprendido entre los 100 y 20.000 KDa.

4.4.1.- Perfiles cromatográficos de las pectinas solubles (fracción PAW y fracción AGUA)

Los perfiles de pectinas más solubles, los más fácilmente extraíbles de la pared celular, se muestran en la Figura 4.6. Los dos primeros cromatogramas (4.6 A y 4.6 B) corresponden a pectinas extraídas aplicando el protocolo de Redgwell. El primero, en concreto, pertenece a la fracción PAW (Figura 4.6 A) y en él aparecen dos bloques bien definidos de azúcares. El de mayor masa molecular, que eluye entre los 65 y 100 ml, corresponde con un componente péctico, como pone en evidencia su coincidencia con el perfil de ácido galacturónico. Este primer pico contiene polímeros cuya masa molecular hace que se queden en el volumen de vacío de esta columna donde eluye el azul de dextrano de 2.000 KDa. El resto del perfil está constituido por polisacáridos no pécticos que se distribuyen por un amplio rango de la columna.

En la fracción AGUA extraída mediante el protocolo de Redgwell (Figura 4.6 B) se observó que las pectinas eluían en un amplio rango de la columna y que el perfil era paralelo al de azúcares totales lo que indican que estos azúcares probablemente son pectinas. El volumen al que eluyen estas pectinas muestran que son de menor masa molecular que las presentes en la fracción PAW, ya que eluyeron entre los 110 y los 180 ml, correspondiendo la zona del pico de esta fracción a una masa molecular próxima a los 12 KDa.

La fracción de AGUA extraída mediante el protocolo de Huber (Figura 4.6 C) presentó un bloque de azúcares que se correspondían con pectinas al inicio de la columna; estos polímeros presentaban un pico en torno a los 80 KDa. Al final de la columna se observan azúcares de menor tamaño molecular (entre los 160 y los 180 ml) que no estaban formados por ácido galacturónico.

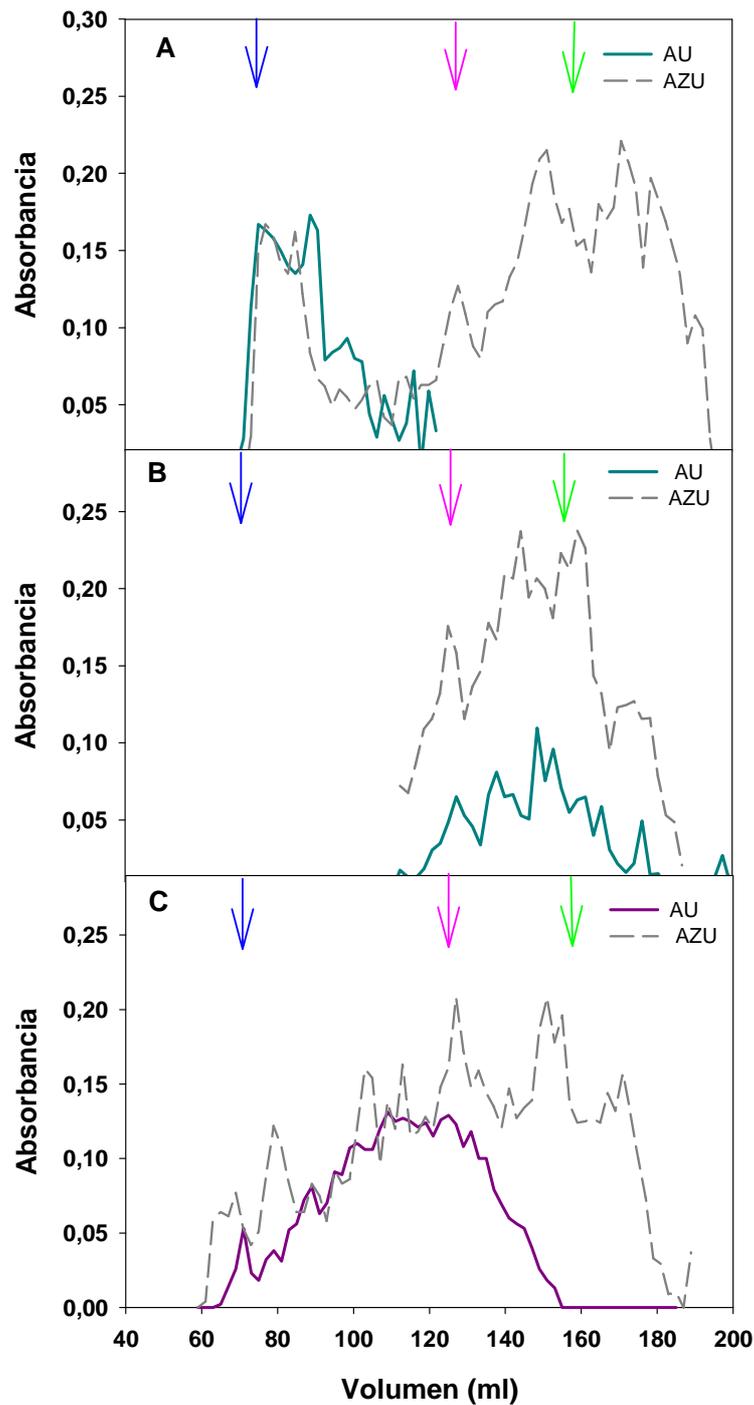


Figura 4.6. Perfiles cromatográficos de las pectinas solubles. **A:** Perfil cromatográfico de la fracción PAW extraída con el protocolo de Redgwell. **B:** Perfil de la fracción AGUA extraída mediante el protocolo de Redgwell. **C:** Cromatografía de la fracción AGUA extraída con el protocolo de Huber En color gris se representan las medidas de azúcares, en color morado y verde las de ácidos urónicos. Las absorbancias de los ácidos urónicos se miden a una longitud de onda de 515 nm y los azúcares a 450 nm. Las flechas indican el volumen al que eluyeron los estándares de pesos moleculares: azul de 2.000 KDa, rosa de 80 KDa, verde de 12 KDa.

Las diferencias comentadas quedan patentes en una sola figura de forma más clara, representando juntos los perfiles de ácido galacturónico de las fracciones PAW y AGUA extraídas con el protocolo de Redgwell y comparándolos con el de Huber para la fracción AGUA (Figura 4.7). Las tres fracciones se diferencian en sus componentes pécticos de una manera clara. Las pectinas de mayor tamaño se detectan en la fracción PAW (con un pico en torno a los 2.000 KDa) y las más pequeñas proceden de la fracción de AGUA extraída con el protocolo de Redgwell con un pico de masa molecular próxima a los 12 KDa. Las pectinas de la fracción AGUA extraídas con el protocolo de Huber se encontrarían en una zona intermedia, con el pico próximo a una masa molecular de 80 KDa, siendo el perfil bastante más suave y redondeado lo que puede interpretarse como una evidencia de degradación que ha provocado que los polímeros pécticos solubles de mayor tamaño no se detecten con este protocolo porque posiblemente hayan sido parcialmente procesados, desplazando el perfil a la derecha.

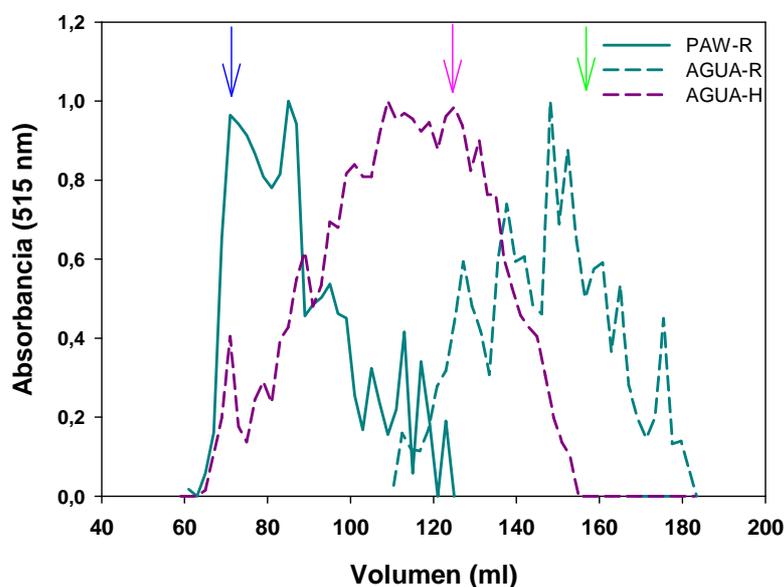


Figura 4.7: Perfil cromatográfico de las fracciones PAW y AGUA extraídas con el protocolo de Redgwell y Huber. Se representan las medidas de ácidos urónicos (relativizados) (en verde el correspondiente al protocolo de Redgwell y en morado a protocolo de Huber). Las flechas indican las masas moleculares correspondientes a los tres estándares con los que se calibró la columna: azul de 2.000 KDa, rosa de 80 KDa y en verde el de 12 KDa.

Mediante el protocolo de extracción de Redgwell fue por tanto posible solubilizar pectinas de gran tamaño que se extraían con el PAW y otras más pequeñas y más entremezcladas con la pared, extraídas con el agua. Con el protocolo de Huber, al no tener fracción similar al PAW, se extraían todas esas pectinas con el agua, y lo que se obtenía era un perfil intermedio que parecía ser una mezcla de las pectinas extraídas con Redgwell, pero donde estaban ausentes las pectinas de elevada masa molecular extraídas con el PAW. Este resultado sugiere la posibilidad de una peor preservación de ese componente péctico cuando se usa el procedimiento de Huber.

4.4.2.- Perfiles de pectinas unidas iónicamente (fracción CDTA)

El CDTA es un agente quelante de calcio que acaba retirando este catión de los enlaces iónicos que unen cadenas de pectinas posibilitando una solubilización de éstas, a las que nos referimos como iónicamente unidas a la pared.

Se observó en la fracción CDTA extraída con la metodología de Redgwell (Figura 4.8 A) que los perfiles de azúcares y de ácidos urónicos fueron muy similares, por lo que se trataría de una fracción compuesta mayoritariamente por pectinas. Sólo se observó una pequeña fracción de azúcares de pequeño tamaño cuyo perfil no coincidía con el péctico en la zona de bajo peso molecular del cromatograma. Se podría decir que el grueso de esta fracción se corresponde con pectinas mayores de 2.000 KDa que eluyen de la columna entre los 75 ml y los 140 ml.

En la fracción CDTA extraída con el protocolo de Huber (Figura 4.8 B) se observó que, al igual que en el caso anterior, que la primera parte del perfil correspondía con polímeros de naturaleza péctica y al final de la columna eluían azúcares de menor masa molecular. La mayoría de las pectinas de esta fracción son pectinas mayores de 2.000 KDa.

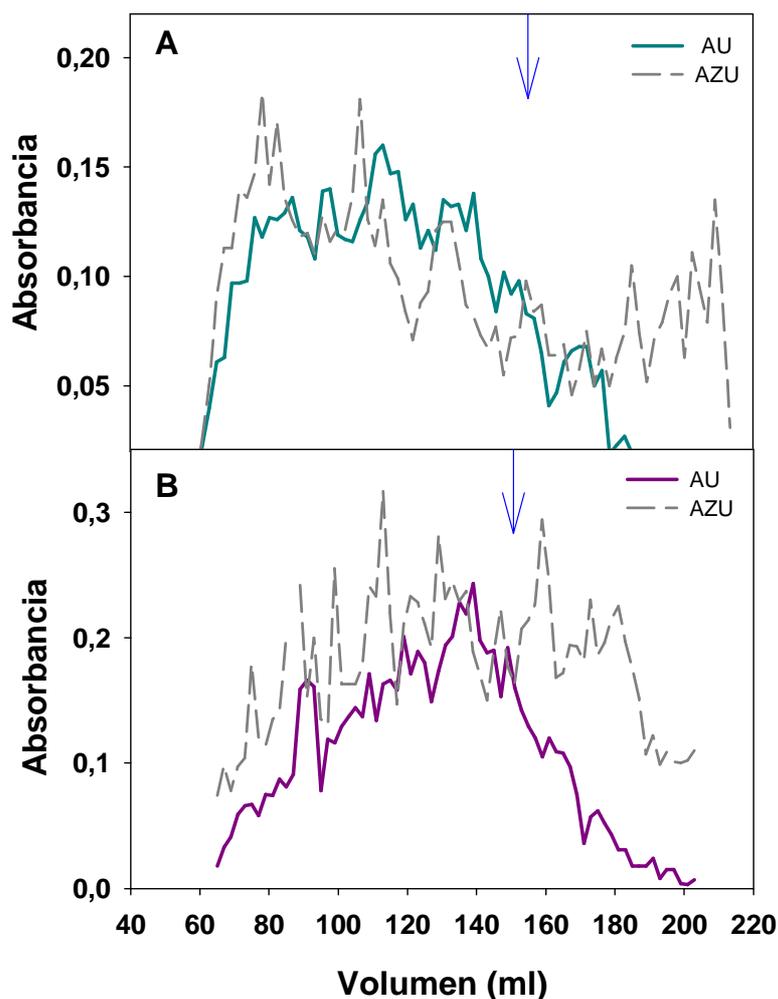


Figura 4.8: Perfiles cromatográficos de la fracción CDTA. **A:** Perfil obtenido de la fracción extraída con el protocolo de Redgwell. **B:** Perfil obtenido con el protocolo de Huber. En línea de color gris se representa el perfil correspondiente a los azúcares y en color morado y verde los ácidos urónicos. En ambos perfiles, la flecha indica el volumen de elución correspondiente al estándar de 2.000 KDa. Las absorbancias de los ácidos urónicos se miden a una longitud de onda de 515 nm y los azúcares a 450 nm.

La representación en el mismo gráfico de los dos perfiles pécticos (Figura 4.9) permite concluir que el perfil correspondiente al protocolo de Redgwell está algo desplazado a la izquierda y, por ello, más enriquecido en polímeros de mayor masa molecular; además el perfil es algo más estrecho. Ambas observaciones pueden indicar una mayor degradación de las pectinas con la extracción de Huber.

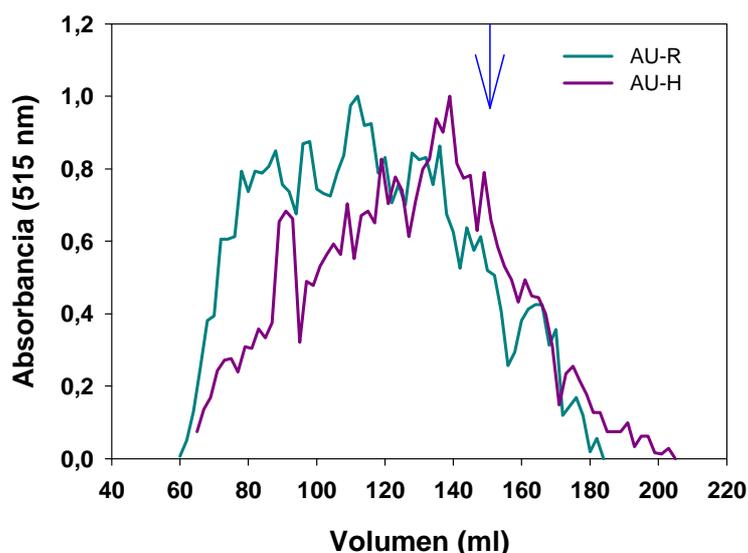


Figura 4.9: Perfil cromatográfico de los ácidos urónicos (relativizados) de la fracción CDTA extraída con el protocolo de Redgwell (AU-R) y Huber (AU-H). Se representan las medidas de ácido urónico (en verde la del protocolo de Redgwell y en morado la de Huber). La flecha indica el volumen de elución correspondiente al estándar de 2.000 KDa.

El conjunto de resultados obtenidos hasta aquí, junto al hecho que el protocolo de Redgwell se había utilizado por otros autores en fresa (Redgwell y col., 1997b; Lara y col., 2004) nos llevó a la adopción del protocolo de Redgwell para la extracción de las paredes celulares de nuestros frutos de fresa.

4.5.- Muestras de pectinas unidas covalentemente (fracción CARBONATO)

Inicialmente tuvimos problemas de solubilización de la fracción extraída con carbonato sódico lo que nos impedía separarla mediante cromatografía de filtración en gel. Ensayando distintas posibilidades concluimos que el problema era el pH relativamente bajo del tampón acetato (pH 5,0) y que se conseguiría una buena solubilización a pH superiores. En concreto, con tampón TRIS-HCl (pH 8,4) se consiguió una mejor solubilización de la fracción CARBONATO sin interferir en la medida de los ácidos urónicos presentes en las muestras. La fracción CARBONATO había sido menos estudiada y caracterizada por cromatografía de filtración en gel en

trabajos previos y el hecho de la menor presencia de pectinas en ella también dificultaba su detección al diluirse la muestra en las columnas. Esto nos llevó a tener que optimizar las condiciones de análisis cambiando también el volumen de las columnas. Ensayamos en columnas de 25 ml y se probó su comportamiento con estándares con los dos geles disponibles, usando como tampón de elución TRIS-HCl (pH 8,4). Como estándar se empleó el azul de dextrano de 2.000 KDa. En este caso se mide la absorbancia del azul directamente a 630 nm ya que el dextrano comercial tiene color azul con un pico de absorbancia en esta longitud de onda. Con la Sepharosa CL-6B se obtuvo el perfil que se muestra en la Figura 4.10 A.

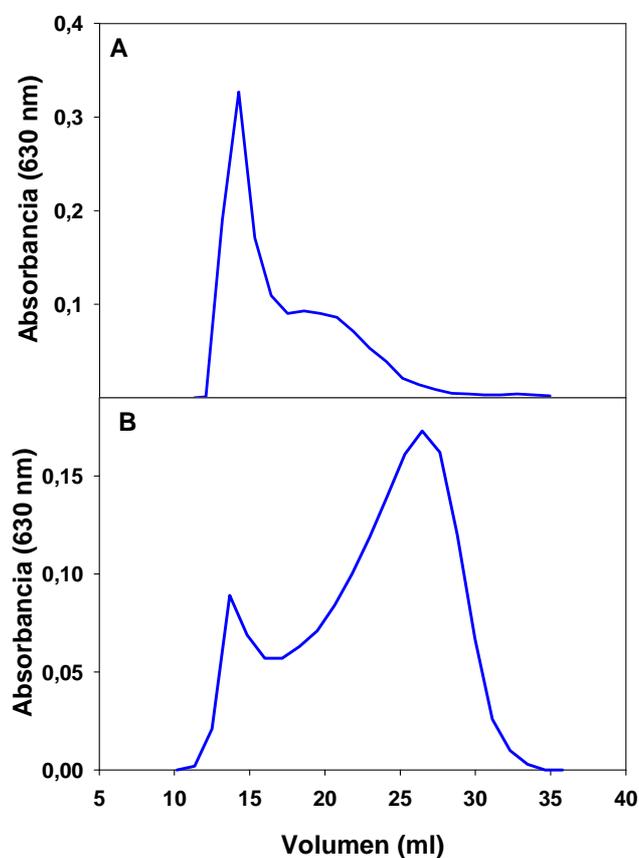


Figura 4.10 Perfiles obtenidos para el azul de dextrano en columnas de 25 ml con el tampón de elución TRIS pH 8,4. La figura **A**: con el gel de Sepharosa CL6B y la **B**: con Sepharosa CL-2B.

El azul de dextrano eluyó en un volumen de 14 ml en la columna con Sepharosa CL6B (Figura 4.10 A) y en el caso de la columna de 25 ml con Sepharosa CI-2B, el estándar de 2.000 KDa salía a los 26,5 ml (Figura 4.10 B).

El siguiente paso fue separar por cromatografía las muestras de la fracción CARBONATO en ambas columnas (Figuras 4.11 y 4.12). El perfil en la columna con Sepharosa CL-6B, mostrado en la Figura 4.11, fue muy parecido al obtenido con el estándar de 2.000 KDa e indicaba que los polímeros presentes en esta fracción tenían una masa molecular mayor de 2 millones de Daltons y eluían mayoritariamente en el volumen de vacío de la columna en torno a los 14 ml.

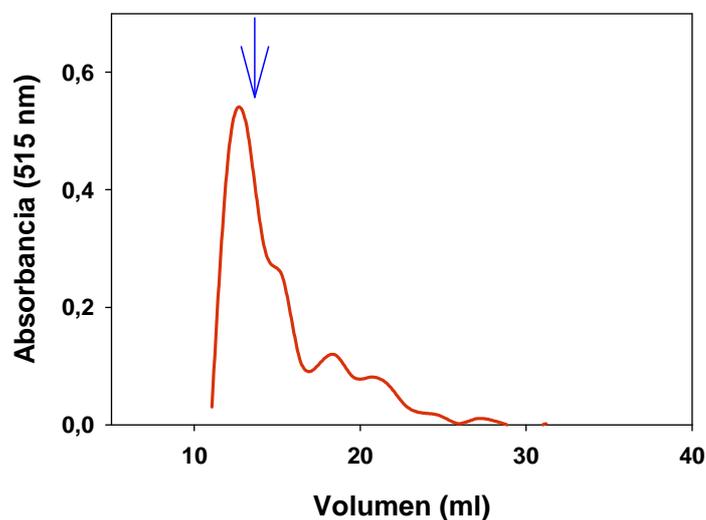


Figura 4.11: Perfil cromatográfico en columna de 25 ml con gel de Sepharosa CL6B de los ácidos urónicos de una muestra de CARBONATO. La flecha indica el volumen de elución del estándar de 2.000 KDa.

Cuando se utilizó el gel de Sepharosa CI-2B observamos que gran parte de la muestra eluyó antes del estándar de 2.000 KDa, (Figura 4.12) indicando así, la presencia de polímeros de masa molecular muy superior a los 2.000 KDa, detectándose al menos dos picos anteriores al pico del estándar.

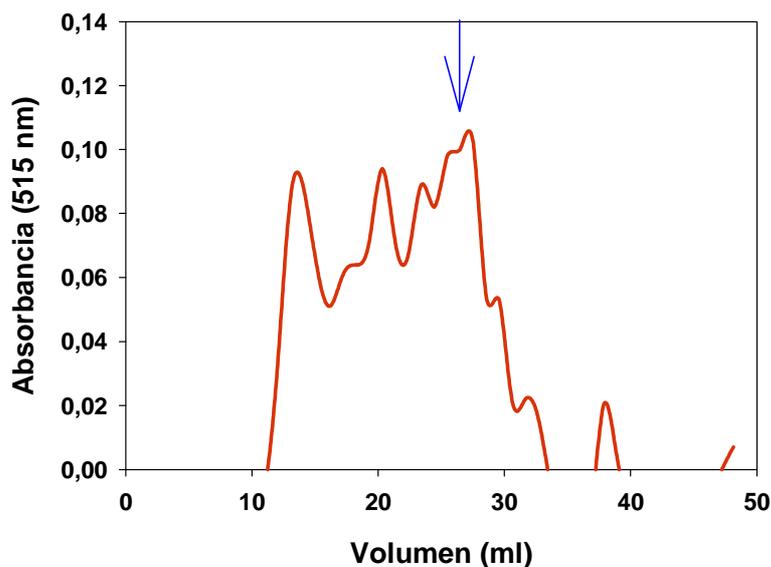


Figura 4.12: Perfil cromatográfico en columna de 25 ml con gel de Sepharosa CL2B de los ácidos urónicos de una muestra de CARBONATO. La flecha indica el volumen de elución del estándar de 2.000 KDa.

El buen comportamiento observado en estas columnas de menor tamaño al optimizar las condiciones de análisis de esta fracción nos llevó a probar su uso y generalizarlo al resto de fracciones. Ello supuso un ahorro importante de tiempo, material y cantidad de muestra, además de proporcionar una resolución suficiente para la comparación de las distintas fracciones y muestras.

4.6.- Mejoras posteriores del protocolo de extracción

La aplicación del protocolo de extracción de Redgwell a distintos estadios de desarrollo y la realización posterior de cromatografías puso en evidencia ciertas discrepancias en los resultados obtenidos en las fracciones solubles (PAW y AGUA) difíciles de interpretar. En concreto, se detectó un pico de pectinas presente en la muestra de PAW proveniente de fruto en estadio verde que no aparecía en las muestras de PAW en estadio rojo. En la fracción AGUA del estadio verde también se observó un pico de masa molecular algo inferior. Se realizó una extracción de pared

celular y posterior fraccionamiento pero evitando con cuidado la presencia de los aquenios del fruto. Al realizar las cromatografías con esta precaución comprobamos que el pico mencionado de la fracción PAW desaparecía (Figura 4.13 A), ocurriendo algo similar también ocurría con la fracción AGUA (Figura 4.13 B).

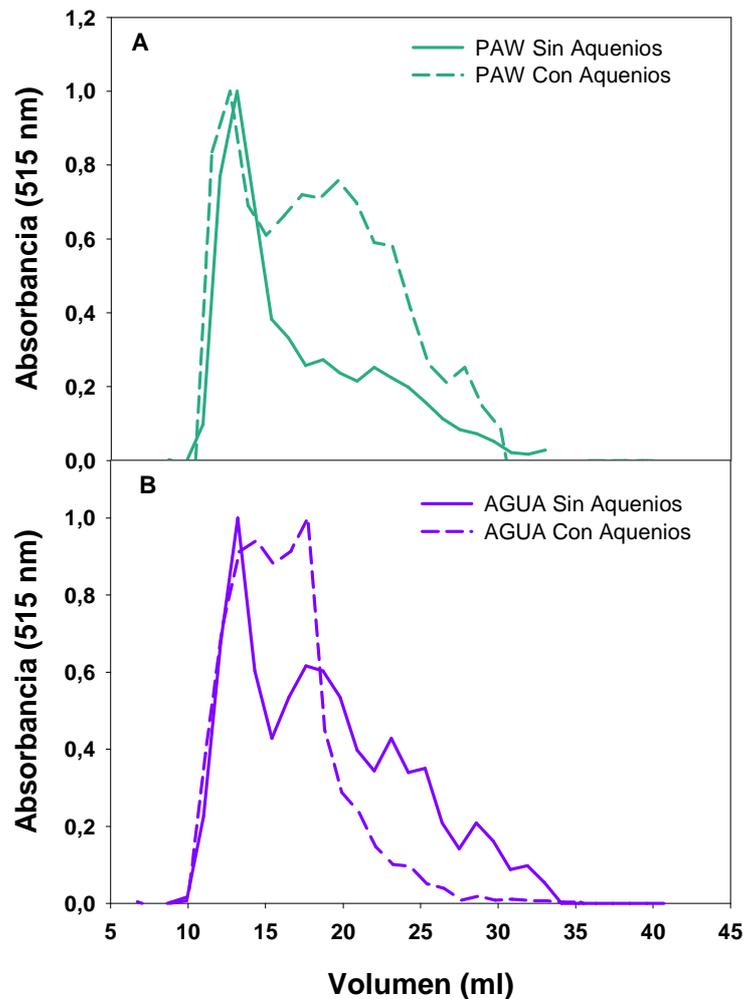


Figura 4.13. Perfiles cromatográficos de ácidos urónicos de muestras en estadio verde. **A:** Cromatografía de ácidos urónicos de la fracción PAW. **B:** Cromatografía de ácidos urónicos de muestras de la fracción AGUA. En línea continua representa las muestras sin los aquenios y en línea discontinua las muestras con los aquenios.

En el resto de fracciones, ni en el estadio verde ni en rojo, se observaron diferencias al comparar cromatogramas de las extracciones con y sin aquenios. De cualquier modo, el hecho de que si se observaran diferencias en las dos fracciones

mencionadas hace necesario una eliminación cuidadosa de los aquenios a la hora de extraer la pared de los frutos.

4.7.- Discusión

Desde un punto de vista cuantitativo, los rendimientos de extracción de pared celular y de las distintas fracciones son parecidos con los protocolos de extracción de Redgwell y de Huber. Tampoco se observan diferencias en la cantidad de pectinas presentes en estas fracciones. Donde observamos una caída notable en los rendimientos de extracción fue al modificar el protocolo de Huber incorporando al principio de la extracción un paso similar al PAW de Redgwell. Este bajo rendimiento en la obtención de pared celular fue probablemente debido a que se incluyó una filtración adicional que, además de ser instrumentalmente complicada, produjo una importante pérdida de material. La disminución en el rendimiento es muy evidente y afecta a todas las fracciones en lo que se refiere a la cantidad extraída. Si bien, cuando se parte de la misma cantidad de pared las diferencias entre la modificación propuesta y el protocolo de Huber se suavizan, a excepción de la fracción AGUA, que es menor, debido a que ya se había obtenido con la filtración previa. Esto nos llevó a descartar la modificación que ensayamos para el protocolo de Huber.

Desde un punto de vista cualitativo, los perfiles cromatográficos mostraron algunas diferencias entre las fracciones obtenidas con los protocolos de Huber y Redgwell. Con relación al tamaño de los polímeros más solubles de la pared encontramos polímeros de diferente tamaño (Figura 4.7), unas pectinas de alto peso molecular que se extraen con el PAW muy solubles y otras que muestran una menor masa molecular media y algo más de interacción con la pared, extraídas con agua. Con el protocolo de Huber, al no tener fracción similar al PAW, se extraen todas esas pectinas con agua, y lo que se obtiene parece ser una mezcla de las pectinas extraídas con el protocolo de Redgwell, ya que tienen un tamaño intermedio aunque la forma de los cromatogramas pueda interpretarse en el sentido de que las pectinas

solubles de mayor masa molecular extraídas con el protocolo de Huber están algo despolimerizadas.

Las pectinas unidas iónicamente, están formadas por polímeros que mayoritariamente superan los 2.000 KDa (Figuras 4.8 y 4.9), observándose que los que se han obtenido con el protocolo de Huber están desplazados hacia el marcador de los 2.000 KDa respecto a la fracción extraída con el protocolo de Redgwell, indicando que son polímeros más pequeños que los extraídos con el protocolo de Redgwell. Ello, junto a la forma del perfil, puede interpretarse también en el sentido de una mayor despolimerización en las fracciones provenientes de las paredes celulares extraídas siguiendo el protocolo de Huber.

Con estos datos, podemos decir que el protocolo de extracción de Redgwell parece evitar algo la degradación de las pectinas. La inactivación de enzimas hidrolíticas de la pared (Rose y col., 1998) parece ser más efectiva con este protocolo que con el de Huber en nuestras condiciones de trabajo. Atendiendo a este hecho y a que existían trabajos previos de fresa que incluían fraccionamientos parecidos al de Redgwell (Koh y Melton, 2002) se decidió adoptar este método como protocolo de extracción de paredes celulares para nuestro material.

En el momento de inicio del trabajo había pocos trabajos que realizaran análisis cromatográficos de la fracción CARBONATO, probablemente debido a la dificultad de solubilización de esta fracción. Por ello, se ha puesto a punto una metodología consistente en solubilizar la fracción CARBONATO en tampón alcalino (tampón TRIS-HCl a pH 8,4) y usar este mismo tampón para las columnas de cromatografía. También se cambió el tamaño de las columnas, optando por un menor tamaño de columna que mantiene una resolución suficiente de picos, que abarata y acorta temporalmente el trabajo. Siendo este método el empleado ahora de modo estándar en el laboratorio.

En cuanto a los elementos esenciales, a los mayoritarios que forman la estructura molecular de los constituyentes básicos de la pared celular (C, H, O y N) no les afecta el que se use un protocolo u otro, debido a que prácticamente no varían en

cantidad. En cuanto a los elementos esenciales minoritarios sí que se observa una disminución importante de los extraídos con el protocolo de Redgwell, respecto al de Huber, especialmente los que se encuentran en forma de cationes en la pared (Ca, Mg, K, Na). Según Huber (1991), el pH de la solución PAW, en torno a 1,3 sería lo suficientemente bajo como para desplazar el calcio de la pared, por lo que su adición durante la extracción de la pared celular puede ocasionar una reducción del 35 al 40% del calcio en la misma. Es muy probable que sea este mismo efecto el que explique la significativa disminución del resto de cationes.

Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de comenzar la extracción de la pared celular es la eliminación de los aquenios del fruto ya que se observó que producen interferencias en los cromatogramas de las fracciones de pectinas más solubles (PAW y AGUA) que mostraban picos que no podíamos explicar. Esto ocurría sobretodo en fruto verde donde la presencia de aquenios es más representativa por peso de fruto. Por eso recomendamos su eliminar cuidadosamente los aquenios antes de comenzar la extracción.



CAPÍTULO 5.

**Efecto de la maduración en la degradación
de las paredes celulares del fruto de fresa**



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

5.- Efecto de la maduración en la degradación de las paredes celulares del fruto de fresa.

Durante la maduración de los frutos, las paredes de las células parenquimáticas sufren modificaciones que alteran su composición y sus propiedades mecánicas. Entre otras, cabe destacar la disminución de la adhesión celular como resultado de la disolución de la lámina media. Esto junto a diversas modificaciones en la pared primaria resulta a nivel macroscópico en el reblandecimiento del fruto.

Buena parte de estas modificaciones son el resultado de la acción de enzimas de pared, que actúan *in muro* provocando lo que se conoce como “desmantelamiento” de la pared celular. Son especialmente notables los cambios provocados por la actuación de enzimas pectinolíticas en la fracción péctica de la pared, que es cuantitativamente la mayoritaria en muchos frutos maduros. Entre las consecuencias de estas modificaciones resulta bastante frecuente la mención a la “solubilización” de las pectinas. Con este término se hace referencia a la liberación de “bloques” de polímeros pécticos que dejan de formar parte de la matriz sólida, entretejida mediante enlaces de diversa índole con el resto de componentes de la pared, y pasan a la fase soluble del apoplasto. También se mencionan como causas del reblandecimiento, la despolimerización de las pectinas y de la matriz de glucanos, junto a la pérdida de azúcares neutros de las cadenas laterales de las pectinas (Brummell, 2006). Más recientemente, se ha sugerido que la integridad estructural de la red de xiloglucanos podría ser importante durante el reblandecimiento del fruto (Mercado y col., 2011). También se ha observado que el grado de hinchamiento *in vivo* e *in vitro* de la pared celular se incrementa en fruto rojo respecto a fruto verde, lo que se suele relacionar con un incremento del tamaño del poro que ocurre durante el proceso de desmantelamiento ordenado que sufre, la pared celular (Redgwell y col., 1997b).

El objetivo de este capítulo de la tesis es documentar los cambios que sufre la matriz péctica durante la maduración del fruto de fresa usando para ello la comparación de las paredes obtenidas de frutos verdes pequeños con las que provienen de fruto rojo. Es decir, compararemos la composición y características de

las paredes y de su componente péctico de frutos en estadio inmaduro con las de frutos maduros.

5.1 Extracción de pared celular y fraccionamiento

Los resultados mostraron que el contenido en pared celular disminuye significativamente durante la maduración cuando se compararon los estadios verde y rojo (Figura 5.1 A) con un rendimiento aproximado a 8 g de pared por 100 g de fruto verde y unas ocho veces menos en fruto rojo.

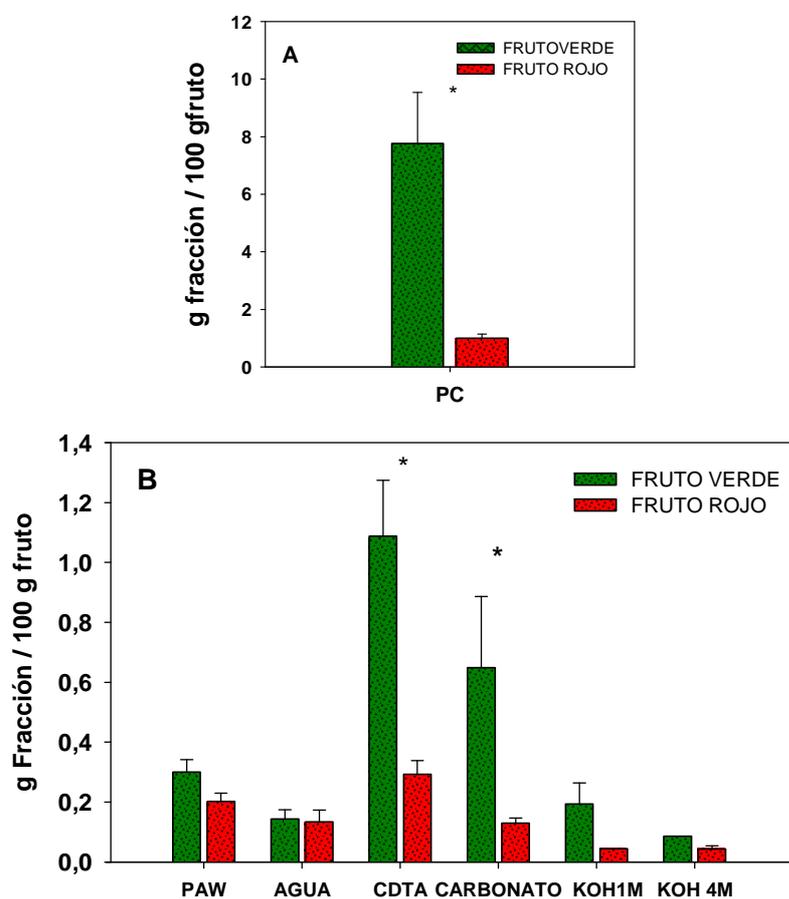


Figura 5.1. Cantidad de fracción expresada en g por 100 g de fruto. **A:** Gramos de pared celular por 100 g de fruto en estadio verde y en estadio rojo. **B:** Gramos de fracción por 100 g de fruto. Para cada fracción, el asterisco indica que se han encontrado diferencias significativas entre ambos estadios, según un análisis de ANOVA y Test HSD de-Tukey, con un límite de confianza de 95%.

También se observó que todas las fracciones de pared celular tienden a ser menores en las paredes de fruto rojo (Figura 5.1 B). Así, el rendimiento de la fracción PAW procedente de fruto verde tuvo un valor de $0,3 \pm 0,04$ g por 100 g de fruto y el de fruto rojo $0,2 \pm 0,03$ g por 100 g de fruto, sin llegar a ser estas diferencias significativas. La cantidad de la fracción AGUA fue similar en ambos estadios, en fruto verde mostró un valor de $0,14 \pm 0,03$ y en fruto rojo de $0,13 \pm 0,04$ g por 100 g de fruto. La fracción más abundante es la fracción CDTA, especialmente en fruto verde, con un valor de $1,09 \pm 0,18$ g/100 g fruto mientras que en fruto rojo alcanza los $0,29 \pm 0,046$ g/100 g. En la fracción CARBONATO también se aprecia una disminución significativa, el valor alcanzado en fruto verde es de $0,65 \pm 0,24$ g/100 g fruto, mientras que en fruto rojo es de $0,13 \pm 0,018$ g/100 g fruto. Las fracciones solubles en KOH 1M y 4M son las menos abundantes, en fruto rojo la cantidad obtenida se aproxima a los 0,05 g por 100 g fruto en ambos casos. En el fruto verde, la cantidad de fracción obtenida oscila entre los 0,2 g/ 100 g fruto del KOH 1M y los aproximadamente 0,1 g/ 100 g fruto en el caso de la fracción KOH 4M, sin que estas diferencias lleguen a ser estadísticamente significativas. En términos generales, el que la cantidad de las distintas fracciones por peso de fruto sea inferior en fruto rojo es consecuencia directa de la menor cantidad de pared.

De hecho, al estimar los rendimientos de las fracciones de pared celular respecto a la cantidad de pared celular inicial se observa un incremento generalizado de las distintas fracciones en el estadio rojo (Figura 5.2).

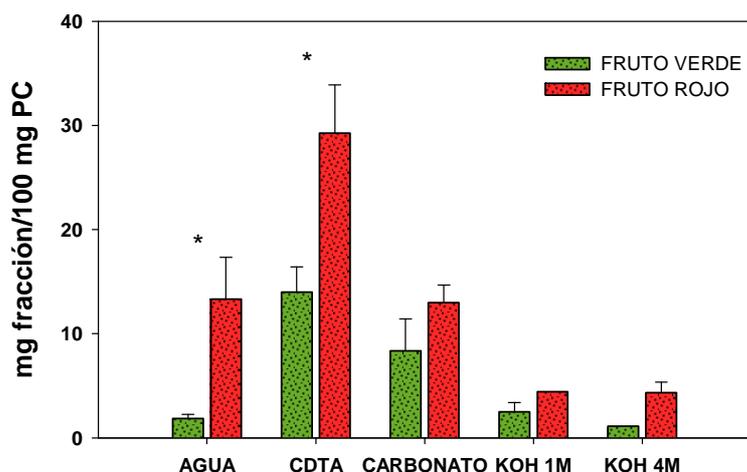


Figura 5.2. Rendimiento en las fracciones de pared celular expresada como mg de fracción por 100 mg de pared celular. Para cada fracción, el asterisco indica que se han encontrado diferencias significativas entre ambos estadios, según un análisis de ANOVA y Test HSD de Tukey, con un límite de confianza de 95%.

La fracción AGUA en fruto verde tiene un valor muy bajo de $1,85 \pm 0,39$ mg/100 mg de pared celular, siendo estadísticamente inferior que en el estadio rojo en el que alcanzan los $13,33 \pm 4,01$ mg por 100 mg de pared celular. La fracción CDTA sigue siendo la mayoritaria, observamos en fruto verde un valor de $14,0 \pm 2,40$ y en fruto rojo prácticamente el doble, $29,26 \pm 4,62$ mg/100 mg de pared celular, siendo estas diferencias significativas. En las fracciones unidas covalentemente, vemos que en estadio verde se obtienen alrededor de 8 mg /100 mg de pared celular y en el rojo alcanza los 13 mg/100 mg de pared. Las fracciones KOH 1M y 4M son las más escasas, llegando en fruto verde a los $2,5 \pm 0,89$ y aproximadamente 1 mg/100 mg de pared y en fruto rojo en torno a los 4,4 mg/100 mg de pared celular en ambas fracciones. Las diferencias encontradas en las fracciones CARBONATO, KOH 1M y KOH 4M, no fueron estadísticamente significativas.

Se confirma así un aumento en la cantidad de pectinas en las fracciones, AGUA y CDTA en estadio rojo. Además, la fracción CDTA es la más abundante en ambos estadios y las dos fracciones de hemicelulosa las menos abundantes.

5.2 Cantidad de poliurónidos obtenidos

Los protocolos de Van den Hoogen (1998) y Dubois y col. (1956) permitieron estimar la cantidad de ácidos urónicos y de azúcares totales, respectivamente, en las distintas fracciones obtenidas, tal como se describe en el Capítulo 3 “Material y Métodos”.

5.2.1.- Cantidad de ácidos urónicos

En los frutos en estadio rojo, observamos en todas las fracciones una disminución en la cantidad de pectinas obtenidas referidas a 100 g de fruto, siendo las diferencias estadísticamente significativas en todos los casos. Esto se debe de nuevo a la menor cantidad de pared celular por peso fresco de fruto observada en estadio rojo. Así en la fracción AGUA se produce una disminución de $67,81 \pm 7,44$ mg AU/100 g de fruto a los $51,24 \pm 7,32$ mg AU/100 g de fruto que presenta en rojo (Figura 5.3 A). Los mayores descensos son en la fracción CDTA, que pasa de tener en fruto verde alrededor de 150 mg de AU/100 g fruto a sólo 57 mg/100 g fruto en rojo, y en la fracción CARBONATO que baja prácticamente un 75%. Lógicamente el contenido péctico de las fracciones KOH son los menos abundantes pero también encontramos una reducción de pectinas estadísticamente significativa en los frutos rojos.

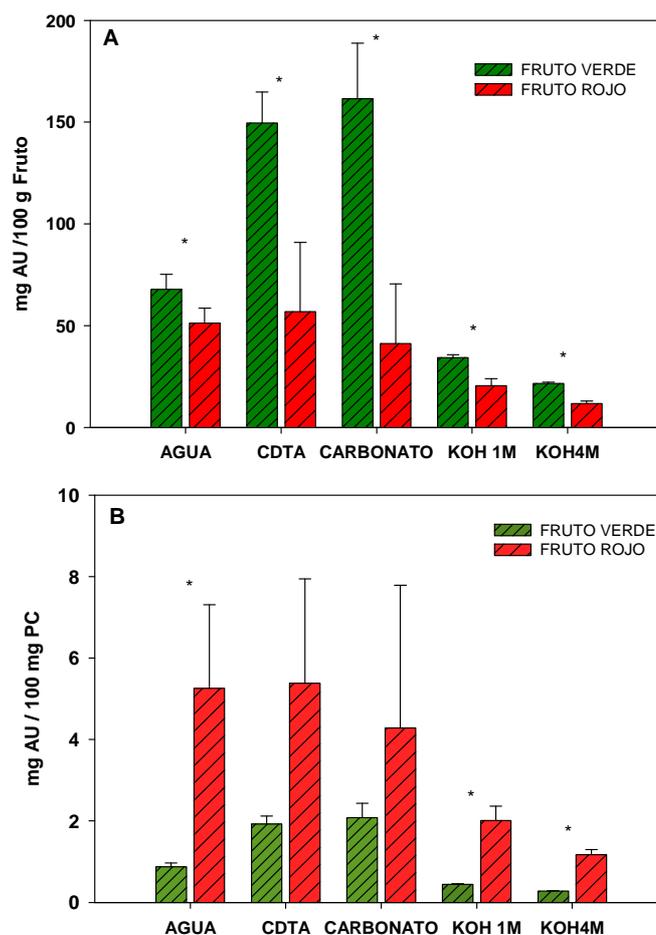


Figura 5.3. Cantidad de ácidos urónicos en las fracciones de pared celular. **A:** Ácidos urónicos expresados como mg por 100 g de fruto. **B:** Ácidos urónicos en mg relativizados por 100 mg de pared celular. Para cada fracción, el asterisco indica que se han encontrado diferencias significativas entre ambos estadios, según un análisis de ANOVA y Test HSD de-Tukey, con un límite de confianza de 95%.

Al representar los datos de ácidos urónicos referidos a 100 mg de pared celular (Figura 5.3 B) se pone de manifiesto que en estadio maduro todas las fracciones se enriquecen en el componente péctico, siendo la presencia de ácido urónico lógicamente mayor en las fracciones pécticas (AGUA, CDTA y CARBONATO). En la fracción AGUA encontramos un aumento que es estadísticamente significativo durante la maduración del fruto pasando de $0,87 \pm 0,09$ mg de AU por 100 mg de pared celular en estadio verde a $5,25 \pm 2,05$ mg de AU /100mg de pared celular del estadio rojo. La misma tendencia se observa en las fracciones CDTA y CARBONATO, con

incrementos en torno al 100% en ambas, pero la variabilidad entre muestras hace que estas diferencias no sean estadísticamente significativas. Las dos fracciones enriquecidas en el componente hemicelulósico, KOH 1M y 4M, también muestran un aumento muy significativo de ácidos urónicos por contenido de pared celular que, prácticamente, en un caso quintuplica y en el otro cuadruplica el contenido observado en fruto verde

5.2.2.- Cantidad de azúcares totales.

Como muestra la figura 5.4 A se observa una disminución generalizada en fruto rojo en la cantidad de azúcares referida a peso de fruto con la maduración del fruto. En la fracción más soluble, (fracción AGUA), se pasa de $180,34 \pm 23,46$ a unos 55 mg de azúcares por 100 g de fruto tras la maduración. Encontramos también una disminución significativa en las fracciones KOH 1M y 4M, pasando de $231,13 \pm 99,53$ en paredes del fruto verde a $84,42 \pm 13,28$ mg de azúcares por 100 g de fruto en rojo en el caso de KOH 1M, mientras que en la fracción KOH 4M disminuye drásticamente y significativamente; en estadio verde pasa de tener $738,90 \pm 315,63$ a $60,13 \pm 7,96$ mg por 100 mg de estadio rojo. Al igual que ocurría con el caso de los ácidos urónicos, esta tendencia generalizada de disminución del contenido de azúcares por peso fresco en las fracciones de fruto rojo se debe al hecho de que la cantidad de pared celular extraída por peso de fruto es muy inferior en el estadio maduro.

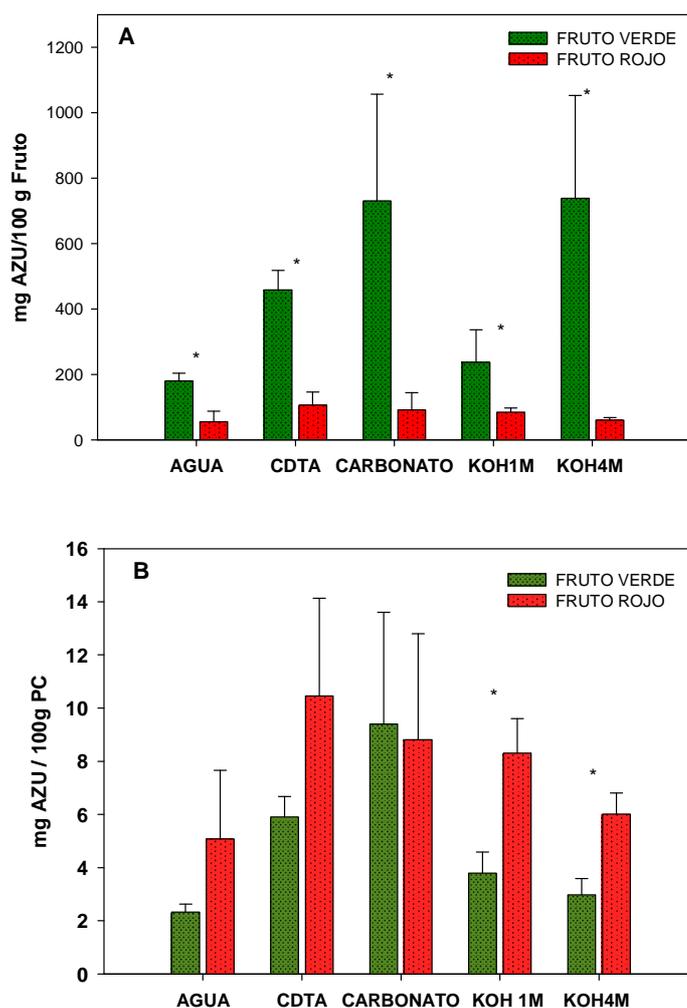


Figura 5.4. Cantidad de azúcares totales en las distintas fracciones de pared celular. **A:** Azúcares expresados como mg por 100 g de fruto. **B:** Azúcares expresados como mg por 100 g de pared celular. Para cada fracción, el asterisco indica que se han encontrado diferencias significativas entre ambos estadios, según un análisis de ANOVA y Test HSD de-Tukey, con un límite de confianza de 95%.

De hecho, cuando se normalizan los datos de medida de azúcares a la cantidad de pared celular inicial, observamos que sólo las fracciones consideradas hemicelulósicas (KOH 1M y 4M) muestran un incremento en estadio rojo frente al verde inmaduro (Figura 5.4 B). En ambas fracciones el contenido de azúcares prácticamente se duplica en fruto rojo.

5.3 Elementos esenciales rojo/verde

El análisis de los elementos esenciales mayoritarios (O, C, H y N) en frutos en estadio verde y rojo no mostró diferencias significativas relativas a la maduración (Figura 5.5 A), así, encontramos que el oxígeno (con un 44%) y el carbono (40%) son los elementos más abundantes en la pared celular y el hidrógeno (7%) y el nitrógeno (1,3%) presentan menor abundancia.

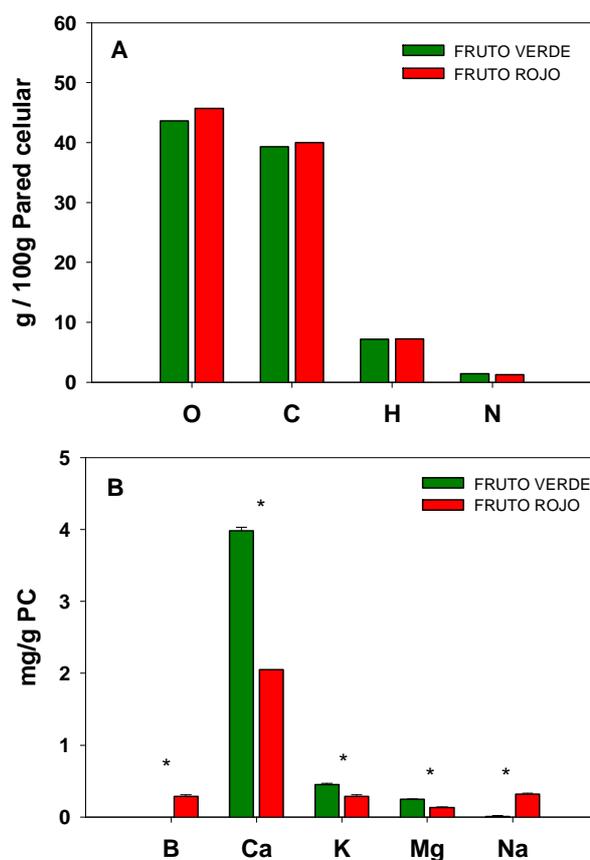


Figura 5.5: Cantidad de elementos esenciales de la pared celular extraída en fruto rojo y en fruto verde. **A:** Contenido en C, O, H y N, expresado en g por 100 g de pared celular. **B:** Contenido en B, Ca, K, Mg y Na, expresado en mg por g de pared celular. Para cada elemento, el asterisco indica que se han encontrado diferencias significativas entre ambos estadios, según un análisis de t.Student, con un límite de confianza de 95%.

Por otro lado, en cuanto a los elementos minoritarios (Figura 5.5 B), el boro no fue detectable en fruto verde con la metodología empleada mientras que en fruto rojo, muestra un valor próximo a 0,3 mg por gramo de pared. Algo parecido ocurre con el sodio, siendo la cantidad obtenida prácticamente indetectable en el fruto inmaduro (0,01 mg por gramo de pared celular) alcanzando en fruto maduro los $0,32 \pm 0,01$ mg por gramo de pared celular. Tanto el potasio como el magnesio tienen mayor representación en fruto verde que en fruto rojo, mostrando el potasio un valor de $0,45 \pm 0,02$ mg de potasio por g de pared en fruto verde y de $0,29 \pm 0,02$ mg por gramo de pared celular en el rojo. En lo que se refiere al magnesio, presenta unos 0,25 mg en fruto verde y $0,13 \pm 0,01$ mg por gramo en fruto rojo. En todos los casos las diferencias encontradas entre ambos estadios fueron estadísticamente significativas. El elemento más abundante en este grupo fue el calcio, en fruto verde su contenido se aproxima a los 4 mg de calcio por gramo de pared celular y en fruto rojo se reduce hasta prácticamente la mitad.

5.4.- Hinchamiento *in vitro* de la pared durante la maduración

Recordamos que para estudiar el hinchamiento *in vitro* de la pared hay que hidratarla (Capítulo 3: “Material y Métodos”), para ello se añade agua en unos viales de cristal de diámetro reducido, se mezcla bien y se deja reposar. La pared va sedimentando a la vez que se hidrata, al estabilizarse esta sedimentación la altura a la que queda la columna de pared hidratada se toma como medida del hinchamiento. La Figura 5.6 muestra como quedaría la pared hinchada una vez estabilizada, transcurrido el tiempo de hidratación.

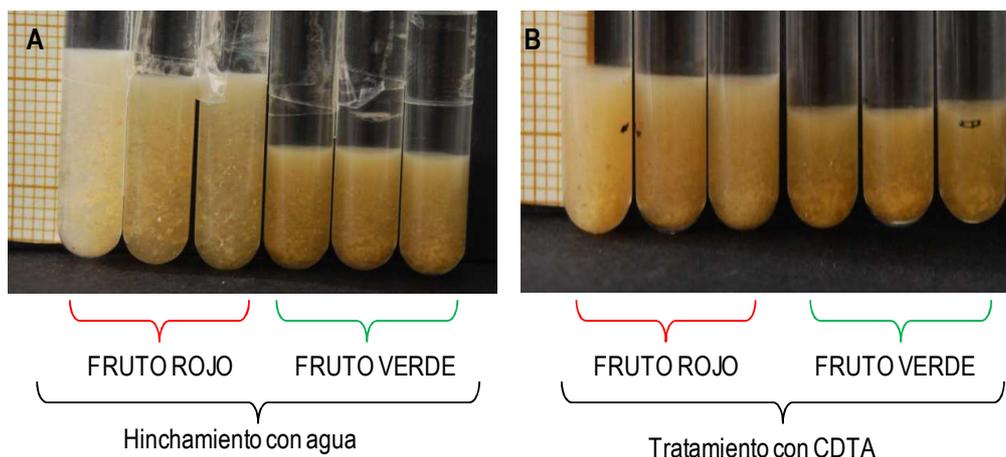


Figura 5.6: Hinchamiento de fruto rojo y fruto verde una vez estabilizada la altura. **A:** Hinchamiento con agua. **B:** Hinchamiento de la pared tras uno de los tratamientos.

5.4.1.- Hinchamiento de la pared durante la maduración

Se obtuvieron diferencias significativas al comparar el hinchamiento de la fracción pared celular en los estadios verde y rojo del fruto (Figura 5.7).

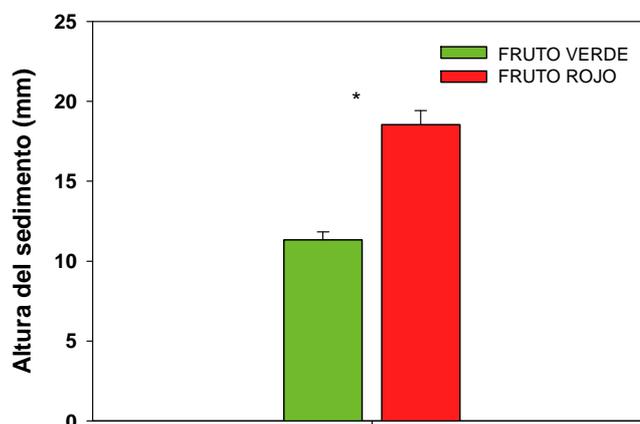


Figura 5.7. Medida (en mm) de la altura de la columna de pared celular hidratada de fruto verde y fruto rojo. Para cada fracción, el asterisco indica que se han encontrado diferencias significativas entre ambos estadios, según un análisis de ANOVA y Test HSD de-Tukey, con un límite de confianza de 95%.

En fruto rojo observamos un valor de altura de la columna de $18,55 \pm 0,88$ mm mientras que en verde el valor fue significativamente inferior, $11,33 \pm 0,50$ mm. Esto indicaría que en fruto rojo los distintos polímeros que forman la pared celular estarían más débilmente y menos entrelazados que en fruto verde. Permitiendo más huecos moleculares que ocuparía el agua provocando un hinchamiento mayor.

5.4.2.-Tratamientos con carbonato, CDTA y calcio

Una vez hinchada la pared, evaluamos el efecto de cuatro tratamientos en el hinchamiento. Estos tratamientos fueron: carbonato, calcio, CDTA y CDTA con posterior adición de calcio (mencionados en el Capítulo 3 de “Material y Métodos”). Para cada estadio y tratamiento se estimó la diferencia media entre la altura de la pared hinchada tras el tratamiento y la altura de esa misma muestra alcanzada tras el hinchamiento inicial con agua (Figura 5.8).

No se observaron variaciones significativas tras los tratamientos con soluciones de CaCl_2 o CDTA respecto al hinchamiento inicial con agua ni en pared celular aislada de fruto verde ni de fruto rojo. Si bien en el fruto verde se ponía de manifiesto una leve tendencia a mostrar un mayor hinchamiento, en rojo no variaba o incluso se reducía. Sí que aparecieron diferencias en el hinchamiento para los tratamientos con soluciones de carbonato y el tratamiento combinado de CDTA seguido de CaCl_2 , con incrementos de hinchamiento entre el 20 y el 50% respecto al hinchamiento inicial en agua. Aunque no hubo diferencias significativas entre las muestras provenientes de fruto verde y rojo para el doble tratamiento CDTA- CaCl_2 , sí se mantenía la tendencia a un hinchamiento mayor en las muestras de fruto verde. En el caso de las muestras tratadas con carbonato, los frutos verdes presentaron un incremento significativo de casi el 50% de media respecto al hinchamiento original en agua siendo, más del doble que el incremento observado en muestras provenientes de fruto rojo.

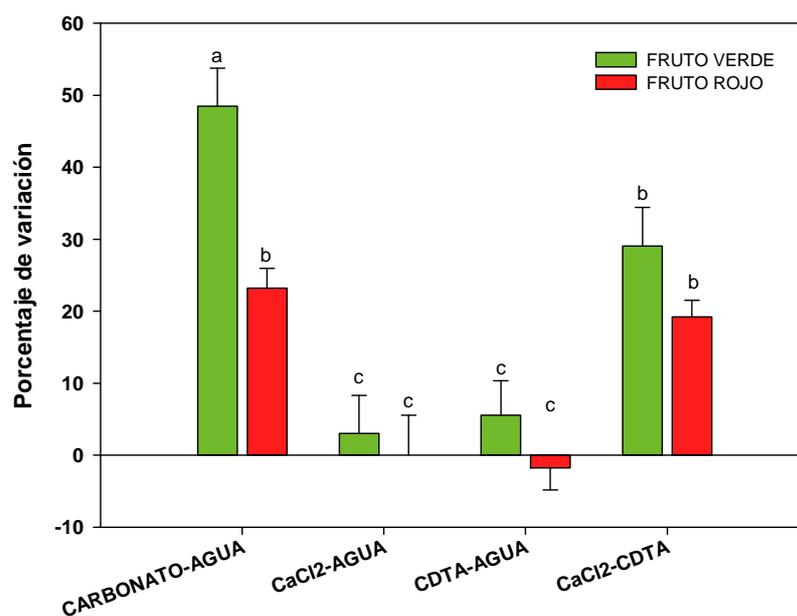


Figura 5.8: Porcentajes de variación en hinchamiento al aplicar los tratamientos carbonato, CaCl₂, CDTA y CDTA con lavado posterior con CaCl₂. Letras diferentes indican que se han encontrado diferencias significativas entre tratamientos, según un análisis de ANOVA y Test HSD de-Tukey, con un límite de confianza de 95%.

Sabemos que el carbonato rompe enlaces covalentes (Redgwell y col., 1997b) y probablemente solubiliza pectinas de toda la pared celular primaria creando más huecos en el entretejido polimérico que pueden ser ocupados por el agua produciendo el hinchamiento. Este mayor hinchamiento en fruto verde es esperable si consideramos que la pared de fruto rojo ya ha sido parcialmente desmantelada *in vivo*. Este hecho se traducía en la mayor capacidad de hinchamiento *in vitro* observada y ya comentada (Figuras 5.6 y 5.7). En paredes de fruto verde habría un mayor número de enlaces ésteres afectados por el tratamiento químico empleado en el ensayo que, en cambio, ya habrían sido modificados *in vivo* por el procesamiento *in muro* que han tenido las paredes durante el proceso de maduración del fruto.

Con nuestro diseño experimental, la adición de Cl₂Ca o CDTA de forma independiente no tienen efecto en cuanto al hinchamiento, pero al añadir calcio a paredes que han sido pretratadas con CDTA ya hemos comentado que sí se observa

un aumento significativo del hinchamiento (29% y 19% de media respectivamente en muestras de frutos verde y rojo). No es fácil explicar este resultado experimental ya que el CDTA es un quelante de calcio y este tratamiento desestructuraría en teoría la caja de huevos formada por enlaces iónicos en los que interviene el calcio, permitiendo que solubilicen las pectinas de la lámina media o de la superficie de la pared celular (Redgwell y col., 1997b). El que un tratamiento posterior adicionando calcio provoque un mayor hinchamiento no era esperable. Salvo que esa adición de calcio provoque una reestructuración y formación de enlaces iónicos diferentes de la original que propicie una mayor hidratación de la pared. Serían necesarios experimentos adicionales para dilucidar este punto.

5.5. Cromatografía de filtración en gel de las fracciones de pared celular

5.5.1.- Perfiles cromatográficos de las pectinas solubles (fracción PAW y fracción AGUA)

En la Figura 5.9 se muestran los perfiles de pectinas de las fracciones solubles: PAW y AGUA. La Figura 5.9 A se corresponde con el estadio verde de la fracción PAW y se observa que el perfil de azúcares ocupa todo el rango de la columna mostrando dos picos bien diferenciados. El primero eluye a los 12 ml y se correspondería con polímeros con una masa molecular superior pero próxima a los 2.000 kDa. La coincidencia de este pico con el que se observa en la misma figura de ácidos urónicos sugiere que este pico de azúcares es de naturaleza péctica. El segundo pico de azúcares lo encontramos a los 25 ml y se correspondería con polímeros de menor tamaño molecular. Vemos que es un pico mucho más abundante que el de los ácidos urónicos y podría corresponderse principalmente con azúcares neutros. Por otro lado, el cromatograma obtenido para la fracción PAW en estadio rojo (Figura 5.9 B) muestra también un perfil con dos picos de azúcares pero la importancia del primero se incrementa con respecto a lo observado en estadio verde. Este pico coincide con el presente en el perfil de ácidos urónicos y con una masa molecular próxima pero algo superior a los 2.000 KDa. El segundo pico de polímeros cuyo

volumen de elución coincide con el observado en estadio verde es relativamente menos abundante en estadio rojo.

Por su parte, en la fracción AGUA (Figuras 5.9 C y 5.9 D) observamos que el estadio verde presenta un pico de azúcares de gran tamaño en torno a los 2.000 KDa y una serie de picos de menor tamaño e importancia cuantitativa. Los picos de este perfil muestran una buena correspondencia con el perfil de ácidos urónicos. Por su parte, las muestras de estadio rojo presentan un único pico cuya masa molecular está próxima a la del estándar de 2.000 KDa. Esta parte de perfil es coincidente con la de los ácidos urónicos y en ambos perfiles se observa que los picos de menor tamaño observados en estadio verde están muy disminuidos en estadio rojo. En el caso del perfil de ácidos urónicos prácticamente desaparecen.

Observamos en los perfiles de ambas fracciones que el pico principal de pectinas en estadio rojo es más ancho que en verde, hecho que implicaría un menor tamaño de los polímeros probablemente debida a una cierta despolimerización (Redgwell y col., 1997a). Se aprecia también en los perfiles de ambas fracciones, especialmente en los perfiles de azúcares, que los picos posteriores al de mayor tamaño que aparecen disminuyen muy significativamente e incluso desaparecen en estadio rojo. En términos generales los perfiles muestran que la fracción AGUA está relativamente más enriquecida en pectinas que la fracción PAW, especialmente en estadio verde.

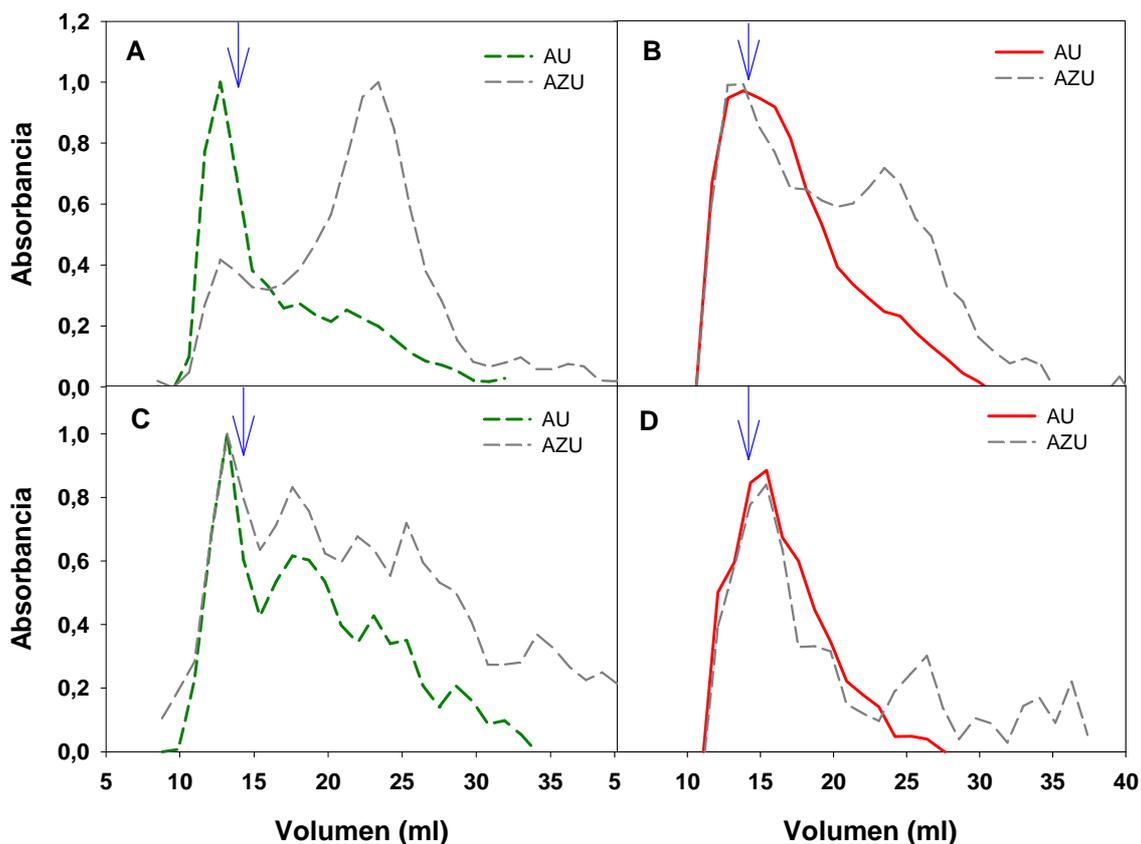


Figura 5.9: Perfiles cromatográficos de las fracciones solubles (PAW y AGUA). **A:** Perfil cromatográfico de la fracción PAW del estadio verde. **B:** Perfil cromatográfico de la fracción PAW de estadio rojo. **C:** Perfil cromatográfico de la fracción AGUA en estadio verde. **D:** Perfil cromatográfico de la fracción AGUA en estadio rojo. En color rojo y verde se representan las medidas de ácidos urónicos y en color gris las medidas de azúcares. Las absorbancias de ácidos urónicos se miden a una longitud de onda de 515 nm y las de azúcares a 450 nm. La flecha indica el volumen al que eluyó el estándar de peso molecular de 2.000 KDa.

Para facilitar la comparación de los perfiles de los ácidos urónicos en ambos estadios y fracciones se muestran de forma simultánea en la misma figura (Figura 5.10). La Figura 5.10 A corresponde a la fracción PAW y en ella se aprecia que ambos perfiles tienen un solo pico en torno a los 2.000 KDa. Observamos que las muestras procedentes de fruto rojo presentan un perfil más redondeado y más abierto que las de fruto verde donde el perfil aparece más puntiagudo. Esto podría indicar que las pectinas de fruto rojo están algo más degradadas que las de verde, como ya hemos mencionado.

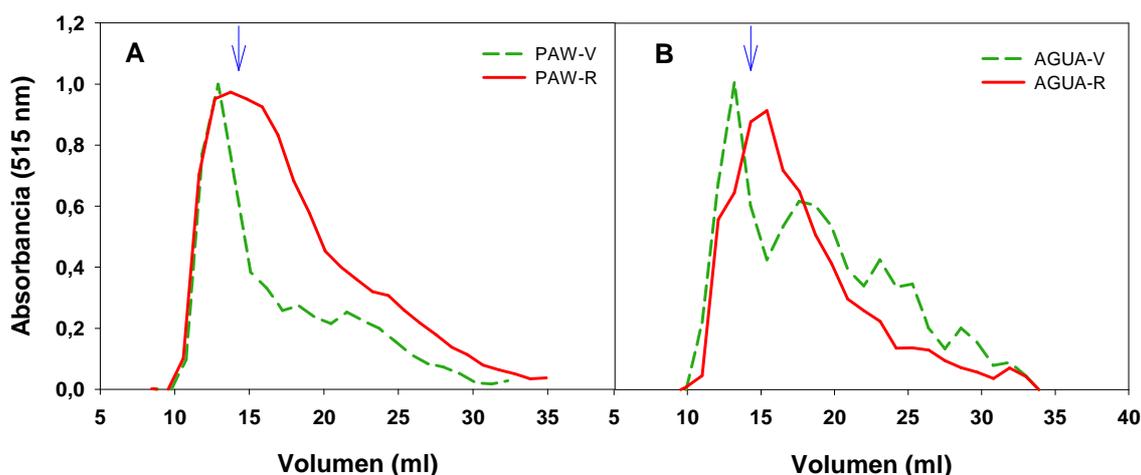


Figura 5.10. Perfil cromatográfico de los ácidos urónicos de la fracción soluble. **A:** Perfil cromatográfico de los ácidos urónicos de la fracción PAW. **B:** Perfil cromatográfico de la fracción AGUA. En color verde los ácidos urónicos del estadio verde y en color rojo los ácidos urónicos del estadio rojo. Las absorbancias de ácidos urónicos se miden a una longitud de onda de 515 nm. La flecha indica el volumen al que eluyó el estándar de peso molecular de 2.000 KDa.

La representación de los perfiles de ácidos urónicos de la fracción AGUA de ambos estadios (Figura 5.10 B) muestra, además de un pico más ancho en estadio rojo, un desplazamiento hacia la derecha del pico en estadio rojo, indicando que las pectinas del fruto rojo son algo más pequeñas que las del fruto verde. Esto podría significar que se ha producido una leve despolimerización de las pectinas durante la maduración.

Podemos concluir que las fracciones de pectinas solubles (PAW y AGUA) incluyen de forma mayoritaria polímeros pécticos de tamaño próximo a los 2.000 KDa y que, en el caso de fruto rojo, están algo más degradadas que en el fruto verde lo que coincidiría con lo descrito en la bibliografía (Redgwell y col., 1997b; Rosli y col., 2004; Huber, 1984; Posé y col., 2013).

5.5.2.- Perfiles de pectinas unidas iónicamente (fracción CDTA)

Los cromatogramas de la fracción soluble en CDTA, representados en la Figura 5.11 A, muestran como los perfiles de azúcares y ácidos urónicos del estadio verde coinciden prácticamente durante toda la columna. Se observa, a groso modo, una curva más o menos redondeada distribuida por todo el perfil que se corresponde con un tamaño de polímeros mayor de 2.000 KDa. Por su parte, el perfil de ácidos urónicos presenta una pequeña subida sin poder considerarse un pico, en torno a los 13 ml que se corresponden con polímeros de gran tamaño. El perfil de azúcares muestra también un pico a los 15 ml. En las muestras provenientes de fruto rojo (Figura 5.11 B), los cromatogramas de la fracción CDTA muestran que también ambos perfiles de azúcares y ácidos urónicos están solapados; se observa un único pico que está más cercano al estándar de 2.000 KDa con respecto al observado en estadio verde, indicando que son polímeros de menor peso molecular.

En esta fracción vemos que, tanto en el estadio verde como en el rojo, los perfiles de azúcares coinciden casi en su totalidad con los de ácidos urónicos. Se podría decir que la fracción soluble en CDTA está formada mayoritariamente por pectinas.

Comparando los perfiles de ácidos urónicos en la misma gráfica (Figura 5.12) observamos que ambos perfiles prácticamente están solapados con alguna pequeña diferencia. La curva que se corresponde con el estadio verde asoma en la zona de la izquierda de la gráfica y en el estadio rojo por la derecha. Esto sugiere que las pectinas en estadio verde podrían ser de tamaño ligeramente mayor que en el estadio rojo.

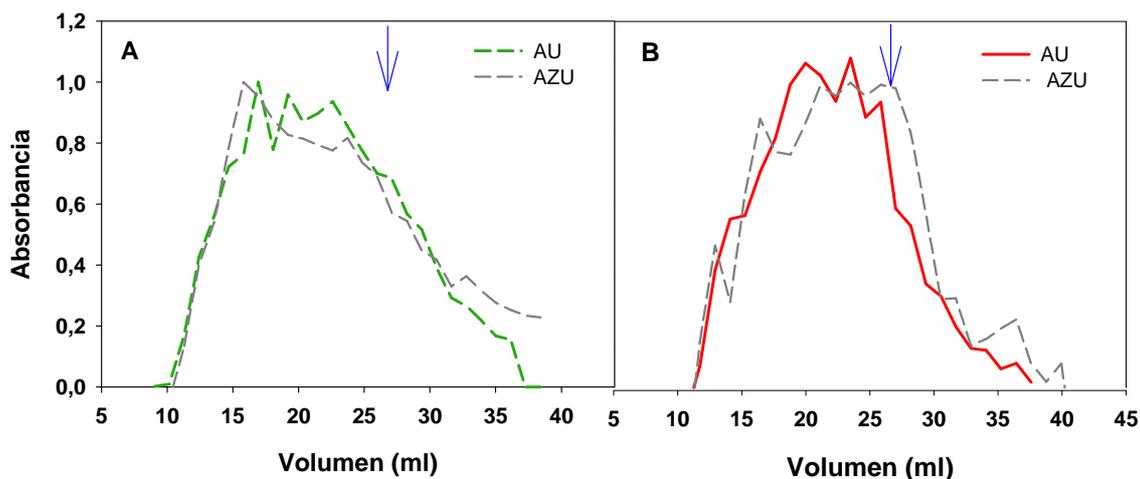


Figura 5.11: Perfiles cromatográficos de la fracción CDTA. **A:** Perfil cromatográfico de la fracción CDTA en estadio verde. **B:** Perfil cromatográfico de la fracción CDTA en estadio rojo. En color rojo y verde se representan las medidas de ácidos urónicos y en color gris las de azúcares. Las absorbancias de ácidos urónicos se miden a una longitud de onda de 515 nm y las de azúcares a 450 nm. La flecha indica el volumen al que eluyó el estándar de peso molecular de 2.000 KDa.

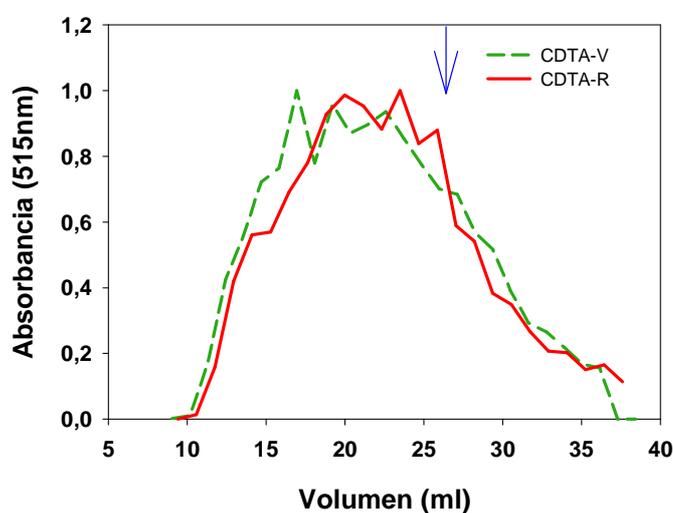


Figura 5.12: Perfil cromatográfico de los ácidos urónicos de la fracción CDTA. En color verde los ácidos urónicos del estadio verde y en color rojo los ácidos urónicos del estadio rojo. Las absorbancias de ácidos urónicos se miden a una longitud de onda de 515 nm. La flecha indica el volumen al que eluyó el estándar de peso molecular de 2.000 KDa.

Estos resultados parecen indicar que durante la maduración ocurre una ligera degradación de pectinas en la fracción de pectinas unidas iónicamente y coincide con resultados anteriores (Redgwell y col., 1997b).

5.5.3.- Perfiles de pectinas unidas Covalentemente (fracción CARBONATO).

La fracción CARBONATO se muestra en la Figura 5.13. Los cromatogramas de la fracción CARBONATO en estadio verde se representan en la Figura 5.13 A. Vemos que tanto el perfil de azúcares como el de los ácidos urónicos presentan dos picos bien definidos. Los azúcares muestran un pico al principio de la columna de gran tamaño molecular que eluye a los 13 ml, que es muy abundante, y otro que se corresponde con polímeros de menor tamaño que eluye entre los 23 y 25 ml. Por su parte, el perfil de ácidos urónicos muestra dos picos que coinciden en el volumen de elución con los del perfil de azúcares. Las abundancias relativas, estimadas por los valores de absorbancia, sugieren que el pico de azúcares de menor masa molecular estaría formado principalmente por pectinas.

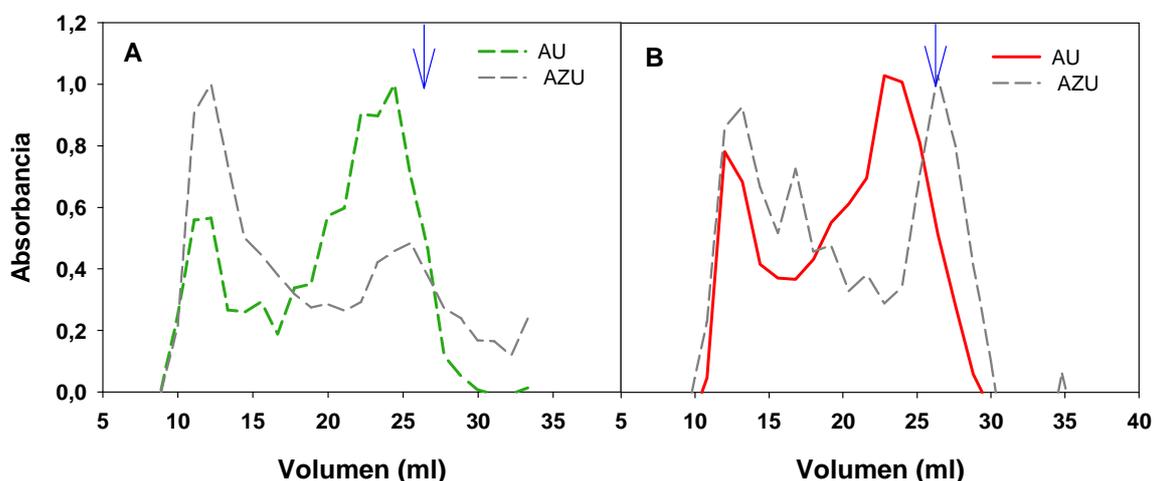


Figura 5.14: Perfiles cromatográficos de la fracción CARBONATO. **A:** Perfil cromatográfico de la fracción CARBONATO en estadio verde. **B:** Perfil cromatográfico de la fracción CARBONATO en estadio rojo. En color rojo y verde se representan las medidas de ácidos urónicos y en color gris las de azúcares. Las absorbancias de ácidos urónicos se miden a una longitud de onda de 515 nm y las de azúcares a 450 nm. La flecha indica el volumen al que eluyó el estándar de peso molecular de 2.000 KDa.

En el cromatograma de la fracción CARBONATO en estadio rojo (Figura 5.14 B) el perfil de pectinas muestra dos picos bien definidos, al igual que ocurría en el estadio verde. El de mayor peso molecular eluye a los 10 ml y el otro, de menor masa molecular, lo hace entre los 22 y 24 ml aproximadamente. El perfil de azúcares obtenido muestra tres picos diferenciados que eluyen a los 13, a los 17 y, el de menor masa molecular, a los 26 ml coincidiendo con el estándar de 2.000 KDa. Observamos que esta fracción, además de pectinas, tiene una gran proporción de otro tipo de azúcares. Parece que el pico de alto peso molecular en el perfil de azúcares del estadio verde, al degradarse durante la maduración, dando lugar a todos los picos de azúcares más pequeños que aparecen en el estadio rojo.

Al comparar los perfiles de ácido galacturónico de la fracción covalente (Figura 5.15) vemos que ambos perfiles tienen dos picos muy bien definidos. Uno de mayor masa molecular que aparece a los 11 ml en el caso del estadio verde y en torno a los 13 ml en el caso del estadio rojo. El otro pico se registra en torno a los 24 ml y está prácticamente solapado en los dos estadios.

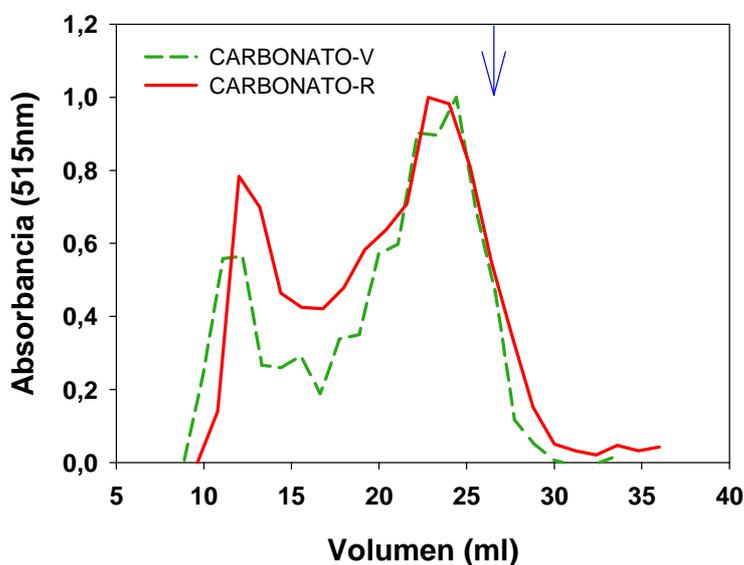


Figura 5.15: Perfil cromatográfico de los ácidos urónicos de la fracción CARBONATO. En color verde los ácidos urónicos del estadio verde y en color rojo los ácidos urónicos del estadio rojo. Las absorbancias de ácidos urónicos se miden a una longitud de onda de 515 nm. La flecha indica el volumen al que eluyó el estándar de peso molecular de 2.000 KDa.

La principal diferencia entre ambos perfiles la encontramos en la zona de las moléculas de mayor tamaño. Observamos que el perfil de los ácidos urónicos en el estadio verde empieza en un volumen anterior al del estadio rojo, unos 2 ml antes. Esto, unido al desplazamiento del primer pico que hemos mencionado antes de mayor tamaño, puede ser indicativo de una despolimerización de las pectinas unidas covalentemente durante la maduración del fruto.

5.5.4.- Perfiles de HEMICELULOSA (fracción KOH 4M)

Se espera que el contenido de las fracciones KOH 1M y 4M se corresponda principalmente con la hemicelulosa y donde las pectinas deberían tener muy baja representación, por eso al representar los perfiles de ácidos urónicos y de azúcares obtenidos de la cromatografía (Figura 5.16), se observa como la cantidad de ácidos urónicos es muy baja en comparación a la de azúcares, por lo que se empleará el perfil de azúcares para representar esta fracción. La extracción con KOH 1M es un paso intermedio y presenta un comportamiento intermedio por lo que se usará la fracción KOH 4M como más característica del componente hemicelulósico y en ella el componente péctico es prácticamente residual.

Los perfiles de los azúcares de la fracción KOH 4M en estadio rojo y en verde (Figura 5.17) presentan ambos dos picos bien definidos; uno de azúcares de menor masa molecular, próximo a los 2.000 KDa que se solapa en ambos perfiles y eluye a los 25 ml, y otro pico de mayor masa molecular y menos abundancia en ambos casos pero con marcadas diferencias. Mientras que el pico de mayor masa molecular correspondiente al estadio verde se sitúa en los 8 ml, el del estadio rojo no aparece hasta los 11 ml.

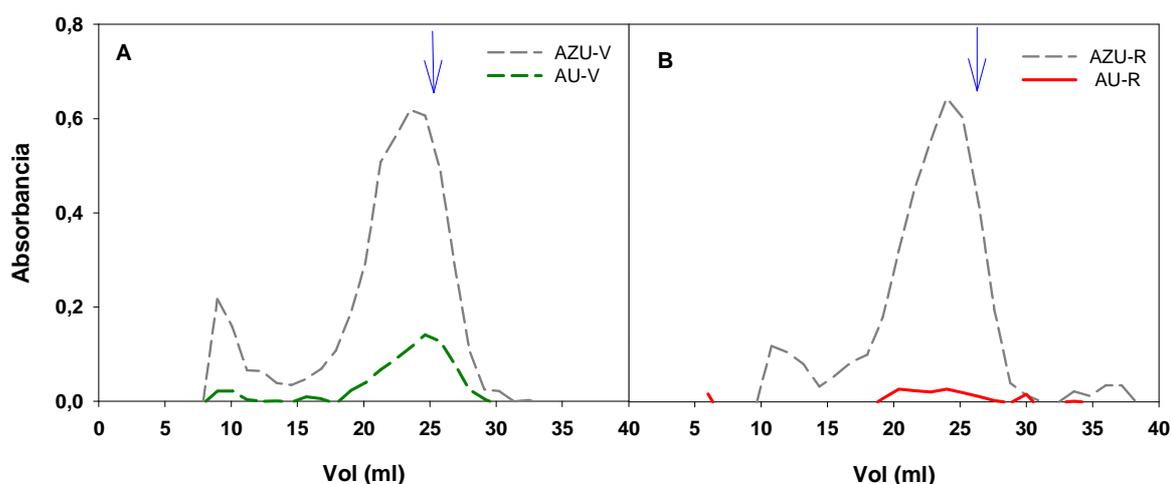


Figura 5.16: Perfiles cromatográficos de la fracción KOH 4M. **A:** Perfil cromatográfico de la fracción KOH 4M en estadio verde. **B:** Perfil cromatográfico de la fracción KOH 4M en estadio rojo. En color rojo y verde se representan las medidas de ácidos urónicos y en color gris las de azúcares. Las absorbancias de ácidos urónicos se miden a una longitud de onda de 515 nm y las de azúcares a 450 nm. La flecha indica el volumen al que eluyó el estándar de peso molecular de 2.000 KDa.

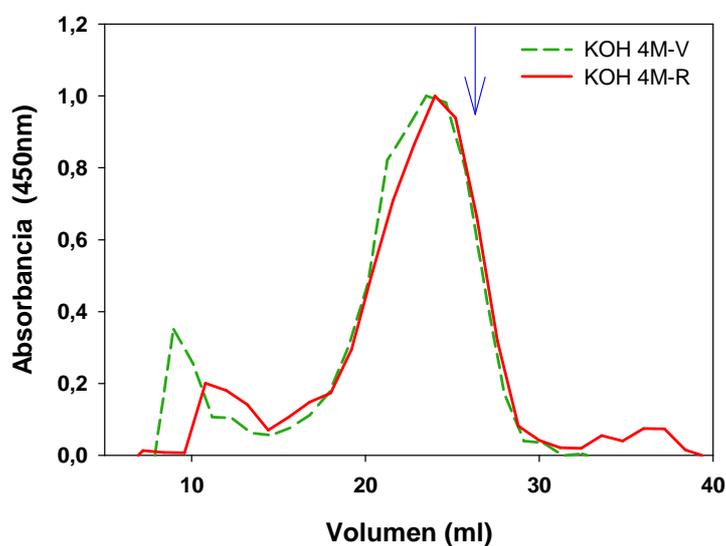


Figura 5.17: Perfil cromatográfico de los azúcares de la fracción KOH 4M. En color verde los azúcares del estadio verde y en color rojo los azúcares del estadio rojo. Las absorbancias de azúcares se miden a una longitud de onda de 450 nm. La flecha indica el volumen al que eluyó el estándar de peso molecular de 2.000 KDa.

Este desplazamiento de picos al comparar el estadio verde con el rojo es probablemente debido a una despolimerización de las hemicelulosas durante la maduración del fruto. Esta despolimerización en la hemicelulosa también ha sido observada por otros autores anteriormente (Rose y col., 2004; Brummell, 2006).

5.6 Discusión

La comparación entre fruto verde y rojo que hemos realizado en este trabajo pone de manifiesto importantes cambios cuantitativos y cualitativos en las paredes celulares de los frutos de fresa entre estos dos estadios de desarrollo. Desde el punto de vista cuantitativo, el contenido de pared celular por peso de fruto fresco disminuye drásticamente a la vez que, cualitativamente, las pectinas incrementan su proporción de manera muy significativa, lo que las lleva a que su peso relativo en la pared supere claramente el 50%. Estos datos estarían de acuerdo con las tendencias observadas por otros autores para la fresa (Rosli y col., 2004; Koh y Melton, 2002). También, en términos generales, parece lógico pensar que una disminución de 8 veces en el contenido de pared celular con la maduración se traduzca en un debilitamiento estructural importante resultando en un reblandecimiento del fruto. Pero no sólo la cantidad de andamiaje estructural es importante, también lo es el comportamiento físico de esas estructuras ya que en ellas se llevan a cabo las relaciones hídricas a nivel celular y tisular determinando el comportamiento mecánico de los tejidos. De hecho, la disminución en la cantidad de pared no fue el único cambio observado, las interacciones físicas entre sus componentes poliméricos también habían cambiado en los frutos rojos como demuestra la mayor capacidad de hidratación/hinchamiento de las paredes extraídas en este estadio. Este hinchamiento de la pared celular se ha observado previamente en fresa y otros frutos (Redgwell y col., 1997b) y se relaciona con un incremento del tamaño medio de poro en la pared celular causado, probablemente, por el desmantelamiento ordenado de la matriz péctica provocado por la actuación coordinada de las pectinasas (Redgwell y col., 1997b; Hadfield y Bennett, 1998; Santiago-Doménech y col., 2008).

Este comportamiento físico diferencial y, probablemente, también el reblandecimiento del fruto está causado por los cambios en la composición y en las interacciones entre los componentes de la pared celular. Ya hemos comentado que el componente péctico se incrementa al doble en las paredes de fruto rojo pero no es sólo eso, su distribución entre fracciones de extracción es distinta en estos frutos. Esta distribución desigual puede ser interpretada como una solubilización de grupos de polímeros pécticos. La solubilización de pectinas es un proceso observado con bastante frecuencia en la maduración de frutos carnosos y blandos (soft). Este proceso consiste en un incremento del contenido de pectinas solubles de la pared celular (fracción AGUA) y, en algunos casos, las pectinas iónicas. En paralelo, puede ocurrir una disminución de la cantidad de las unidas covalentemente. Según Koh y Melton (2002), en fresa, el mayor incremento de pectinas solubles ocurre al pasar del estadio verde a los intermedios y luego no se incrementan mucho o permanecen constantes en el estadio rojo (si se considera como porcentaje de pared aislada). Nosotros no hemos evaluados estadios intermedios pero sí verificamos en buena medida ese incremento de pectinas solubles en nuestras muestras de frutos rojos. La cantidad de polímeros solubles en agua aumenta de estadio verde a rojo. Por el contrario, la cantidad de pectinas unidas covalentemente disminuyen durante la maduración, quedando patente que se produce una solubilización de las pectinas durante la maduración de nuestros frutos. Esta solubilización ocurre a expensas de las pectinas covalentemente unidas a la pared (Wakabayashi, 2000; Brummell, 2006; Mercado y col., 2011; Paniagua y col., 2014). Una interpretación alternativa o complementaria al hecho experimental de la solubilización fue la propuesta de Huber (1984). Este autor sugería a la síntesis *di novo* de pectinas más solubles como la causa de la observación de una mayor proporción de pectinas solubles, no ligadas o débilmente ligadas a la fase sólida de la pared celular. Sin embargo, parece que la causa más probable sea el resultado de una pérdida y/o degradación (Inari y Takeuchi, 1997) de pectinas no esterificadas y muy ramificadas durante la maduración. Otros autores también sugieren que las pectinas en realidad se solubilizarían al degradarse las hemicelulosas a las que estarían unidas en la pared primaria (Koh y Melton, 2002). Esta degradación de la hemicelulosa podría ser un proceso constante desde los

estadios iniciales hasta el comienzo de la coloración del fruto como se refleja por una disminución gradual de los azúcares neutros en las fracciones CDTA y CARBONATO (Koh y Melton, 2002) que nosotros no observamos (Figura 5.4 B) y, además, el contenido relativo de azúcares neutros se incrementan en las dos fracciones hemicelulósicas (KOH 1 y 4 M). Si bien es cierto que los perfiles cromatográficos que hemos obtenido de la fracción KOH 4M muestra una despolimerización de las hemicelulosas durante la maduración del fruto que también ha sido observada por otros autores anteriormente (Rose y col., 2004; Brummell, 2006). También, en relación con esta cuestión, conviene recordar que nosotros hemos encontrado que el silenciamiento de la pectato liasa, que actúa específicamente sobre la matriz péctica, tuvo también como efecto colateral en las dos fracciones de hemicelulosa. Observamos un menor contenido del pico mayoritario de azúcares neutros presentes en los perfiles cromatográficos de las dos fracciones (Capítulo 6, Figura 6.10; Santiago-Doménech y col., 2008). Como ya hemos comentado, la complejidad del metabolismo de la pared celular y la multiplicidad de agentes que actúan en ella al mismo tiempo interactuando entre sí dificultan el que, en muchas ocasiones, sea posible distinguir causas de efectos con claridad.

Volviendo a las pectinas, hemos encontrado que, el contenido de ácidos urónicos referidos a pared celular, en términos generales, presentan un mayor contenido en fruto rojo coincidiendo con Woodward (1972). Si bien otros autores han observado una disminución en la cantidad total de ácidos urónicos (Rosli y col., 2004; Koh y Melton, 2002), mientras que Huber (1984) no observó cambios. Aunque cuando los resultados se expresan como total de AU con respecto a peso de pared celular, Rosli y col., (2004) también observan un incremento al pasar de estadio verde al blanco y de éste al estadio rojo permanece constante. Nosotros no hemos evaluado contenidos en estadios intermedios pero si hemos verificado el ya mencionado mayor contenido de ácidos urónicos en fruto rojo con respecto al verde.

Además de los procesos de solubilización, en determinados frutos la despolimerización de polímeros pécticos por la actuación de poligalacturonasas y otros enzimas pectinolíticos (Brummell y col., 1988) puede jugar un papel importante en el

desmantelamiento de la pared celular durante la maduración. Aunque en fresa se consideraba inicialmente este proceso de menor importancia debido a que los primeros estudios experimentales que abordaron la cuestión encontraron una relativamente baja actividad poligalacturonasa y escasas evidencias de despolimerización (Huber, 1984; Nogata y col., 1996; Brummell, 2006). Este posicionamiento inicial se ha visto modificado al aportarse evidencias de despolimerización cuantitativamente importante y alta actividad poligalacturonasa en cultivares especialmente blandos, como Toyonaka (Rosli y col., 2004; Villarreal y col., 2008) y nuestros propios resultados usando una aproximación transgénica (Capítulo 6; Santiago-Doménech y col., 2008). Nuestro estudio comparativo de los estadios verde y rojo en el cultivar Chandler también indica que se produce una despolimerización paulatina de las pectinas al alcanzar el fruto la madurez. Ello se pone de relieve por los cambios en los cromatogramas de las fracciones CDTA y, sobretudo, en los perfiles de la fracción CARBONATO cuando se comparan las muestras extraídas de fruto verde y rojo. Los picos asociados con polímeros ricos en AU y alta masa molecular tienden a desplazarse hacia zonas de menor peso molecular, lo que indicaría una degradación de las pectinas. Esta posible despolimerización afecta a la estructura de las pectinas y su interacción con otros componentes de la pared, afectando al comportamiento físico de la red y, en última instancia, a la textura del fruto, propiciando probablemente su reblandecimiento. Tampoco podemos descartar, que además de los procesos enzimáticos, las diferencias encontradas en los iones presentes en la pared, especialmente el calcio, que disminuye en fruto rojo significativamente, contribuyan también a cambios importantes en la estructura de la matriz péctica y sus propiedades físicas, propiciando, por ejemplo, la solubilización de grupos poliméricos de la lámina media en estadio rojo y afectando al hinchamiento de la pared celular.

En conjunto, nuestros resultados ponen de manifiesto que en frutos de fresa del cultivar Chandler la solubilización y, en menor medida, la despolimerización de las pectinas, son parte significativa del proceso de desmantelamiento ordenado de la pared celular. Si junto a estos dos hechos consideramos:

- que el componente péctico supone prácticamente el 60% de los polímeros presentes en la pared en fruto rojo,
- que el comportamiento físico de esta pared se ve modificado por estos cambios,
- que estos cambios son de alguna manera contrarrestados al silenciar una pectato liasa (Capítulo 6) y una poligalacturonasa (Quesada y col., 2009),
- y que los frutos transgénicos de estas líneas transgénicas son más duros que los de planta control no transgénicas en el mismo estadio de desarrollo

Contamos con un conjunto de evidencias que permiten proponer que existe algo más que una correlación entre el procesamiento de pectinas asociado a la maduración de los frutos de fresa y el reblandecimiento de este fruto.



CAPÍTULO 6.

Efecto de la inhibición por tecnología antisentido de un gen de pectato liasa en la despolimerización de las pectinas y el reblandecimiento del fruto de fresa



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

6.- Efecto de la inhibición por tecnología antisentido de un gen de pectato liasa en la despolimerización de las pectinas y el reblandecimiento del fruto de fresa.

Los resultados de esta sección se corresponden en su selección y formato de presentación con los publicados en la revista *Journal of Experimental Botany* (adjunto en el anexo I).

6.1.- Introducción

La maduración de los frutos carnosos suele coincidir con un importante reblandecimiento de sus tejidos para cuya causa se han propuesto tanto mecanismos de tipo enzimático (Brummell y Hapster, 2001; Brummell, 2006), como no enzimáticos (Dumville y Fry, 2003) de degradación y/o modificación de la pared celular. También existe evidencia experimental de que la modificación de la turgencia celular durante el periodo de maduración juega un papel importante en este reblandecimiento (Saladié y col., 2007), aunque el hecho es que son mucho más numerosos los trabajos que se han dedicado a investigar los cambios en la composición y estructura de la pared celular, así como los referidos a las proteínas y enzimas que modifican este compartimento celular (Vicente y col., 2007). Estos trabajos han puesto de manifiesto un cierto número de modificaciones específicas del proceso de reblandecimiento, tanto a nivel estructural como de composición, lo que ha permitido la propuesta de un modelo de desmantelamiento de la pared celular para frutos. Si bien, este modelo está algo sesgado debido al hecho de que determinados frutos como el tomate han recibido bastante más atención que otros como la fresa. De hecho, cuando se baja un poco más al detalle de los procesos bioquímicos relacionados con este desmantelamiento de la pared celular y los cambios texturales correlacionados con ellos comparando distintos frutos, aparecen diferencias reseñables entre especies (Brummell y Hapster, 2001; Rose y col., 2003). Una parte de esa variabilidad se puede relacionar con las diferentes texturas que muestran los frutos carnosos al alcanzar la madurez. Los dos

principales tipos a considerar serían los de textura blanda, como las fresas, que en fase muy terminal de la maduración pueden presentar textura líquida (soft-melting) o aquellos con textura crujiente (crisp), mantenida incluso en fases terminales y que no muestran esa textura blanda/líquida. Un ejemplo de fruto con este tipo de textura “crisp” en maduración sería la manzana.

Como hemos indicado, la fresa cultivada (*Fragaria x ananassa* Duch.) está incluida en el grupo de frutos que desarrollan una textura blanda durante la maduración. Este reblandecimiento implica cambios físicos y químicos en la pared celular que incluyen la degradación de la lámina media, un incremento significativo en la solubilización de las pectinas, reducción en la masa molecular de los polímeros de xiloglucanos y un hinchamiento de la pared celular (Redgwell y col., 1997a; Koh y Melton, 2002). El hinchamiento *in vitro* de la pared celular se suele correlacionar con la solubilización de las pectinas y también, en condiciones *in vivo*, con una relajación de las interacciones que existen entre la red de xiloglucano y la de celulosa (Redgwell y col., 1997b; Brummell, 2006). En fresa, además de las reestructuraciones y modificaciones de la pared celular que implican a las pectinas y su solubilización (Lara y col., 2004; Rosli y col., 2004), también hay estudios que describen cambios de la matriz hemicelulósica. Entre ellos destacan un incremento de polímeros de bajo peso molecular (Huber, 1984), una disminución de los de alto peso molecular (Nogata y col., 1996) y una despolimerización (Rosli y col., 2004).

En lo que concierne a la celulosa, los estudios previos sugieren que no existe una degradación de este componente durante la maduración del fruto de fresa y que, por tanto, no juega un papel importante en el proceso de reblandecimiento (Koh y col., 1997; Koh y Melton, 2002). A pesar de ello, conviene ser cautos ya que se suele evaluar la degradación de la fracción cristalina de la celulosa y no la que se puede desarrollar en la fracción de celulosa no cristalina que puede ser importante pero difícil de estimar (Rose, 2003). Desde el punto de vista de las posibles enzimas implicadas, también se ha encontrado que la inhibición de la expresión de varios genes de endonucleasas incluidos en la familia “Glicosil-Hidrolasas 9” (GH9) no afecta la firmeza del fruto (Woolley y col., 2001; Palomer y col., 2006). De todos modos, hay que indicar

también que no está claro cuál es *in vivo* el sustrato de las enzimas de esta familia (Urbanowicz y col., 2007).

A diferencia de lo descrito para la celulosa, hay bastante más información sobre los cambios mediados por enzimas en la matriz péctica durante la maduración de frutos. Siendo el más mencionado el conocido de modo genérico como “solubilización de las pectinas”. Existen varias causas posibles para explicar esta solubilización (Koh y Melton, 2002), como son la despolimerización de las pectinas, la pérdida del calcio que estabiliza la estructura gel de las pectinas (Knee y col., 1977; Lara y col., 2004), la rotura de uniones entre pectinas y hemicelulosa (Nogata y col., 1996) o el desmantelamiento/desestructuración de la matriz de pectinas debido a la degradación de las cadenas laterales de arabinanos y, posiblemente, galactanos (Redgwell y col., 1997b; Trainotti y col., 2001; Koh y Melton, 2002). En el caso de la fresa parece que varios de estos procesos interactúan entre sí durante la maduración originando la solubilización de las pectinas pero, tradicionalmente, el papel de la despolimerización de las pectinas se ha considerado un factor de menor importancia. Esta asunción descansaba en las afirmaciones publicadas en los primeros trabajos que abordaron esta cuestión en fresa ya que encontraron un bajo grado de despolimerización de pectinas y una baja actividad poligalacturonasa en frutos maduros, al compararlos con los obtenidos en otros frutos (Huber, 1984; Nogata y col., 1996; Brummell, 2006). Sin embargo, trabajos como el de Rosli y col. (2004), sí que describen una despolimerización cuantitativamente importante y una alta actividad poligalacturonasa, especialmente en el cultivar japonés Toyonaka que es muy blando (Villarreal y col., 2008).

Además de las poligalacturonasas, otra enzima que podía estar involucrada en la despolimerización de las pectinas es la pectato liasa que rompe el enlace entre los residuos de galacturónico por una reacción de β -eliminación y no por el mecanismo hidrolítico que emplean las poligalacturonasas (Marín-Rodríguez y col., 2002).

Las pectato liasas, inicialmente más conocidas como enzimas bacterianas, han sido identificadas en distintos frutos mostrando un patrón de expresión en el que sus niveles de ARNm se incrementan en paralelo a la maduración del fruto (Dominguez-

Puigjaner y col., 1997; Medina-Escobar y col., 1997; Nunan y col., 2001). Su posible papel en los procesos de maduración de frutos está bastante menos documentado que el de las poligacturonasas. En el año 2002, Jiménez-Bermúdez y col. (2002) lograron silenciar la expresión de un gen de pectato liasa en fresa mediante tecnología antisentido y correlacionarlo con la producción en estas plantas de frutos significativamente más duros en el estadio rojo de maduración y un mejor comportamiento postcosecha de los mismos. Este fenotipo se observó a pesar de que en este material se han descrito 3 genes de pectato liasa que comparten el patrón de expresión (Benítez-Burraco y col., 2003). Sin embargo, la similitud de las tres secuencias génicas y el diseño de la secuencia antisentido permitió que en las plantas transgénicas la expresión de los tres genes quedara inhibida significativamente (Benítez-Burraco y col., 2003). Estos frutos, además de la mencionada mayor firmeza, poseían paredes celulares que se hinchaban menos *in vitro* y también una aparente menor solubilización de las pectinas (Jiménez-Bermúdez y col., 2002). Por tanto, este material transgénico es muy valioso para profundizar en la caracterización de los cambios en los polímeros pécticos presentes en las paredes de estos frutos mediante un análisis más profundo y ese es nuestro objetivo en este trabajo. Mostraremos resultados que evidencian el papel de la pectato liasa en la despolimerización y solubilización de las pectinas de la pared primaria y/o la lámina media y con ello reforzamos la necesidad de incluir a esas enzimas en los modelos que pretenden describir el desmantelamiento ordenado de la pared celular durante el proceso de maduración de frutos.

6.2.- Resultados

6.2.1.- Estabilidad temporal del fenotipo transgénico “Más Duro” y comparación del estado de maduración de los distintos genotipos estudiados

La Figura 6.1 A muestra la consistencia y estabilidad del fenotipo “Más Duro” en dos líneas transgénicas con la pectato liasa silenciada (Jiménez-Bermúdez y col., 2002) en comparación con una línea control no transgénica durante 4 años

consecutivos, del 2002 al 2005. Durante estos cuatro ciclos independientes de cultivo, las dos líneas transgénicas produjeron frutos significativamente más duros en estadio rojo (R). Este es el estadio en el que se centra el estudio y dado que el tiempo de maduración se podía ver afectado en los frutos transgénicos se usó como estimador de madurez el contenido de antocianina. En la Figura 6.1 B se muestran los resultados, los niveles de antocianinas fueron similares en las plantas utilizadas como plantas control y en las líneas transgénicas 23 y 39 y ligeramente mayor en la línea 14, indicando que los frutos transgénicos muestreados para el análisis de pared celular no eran más duros por estar su maduración más retrasada.

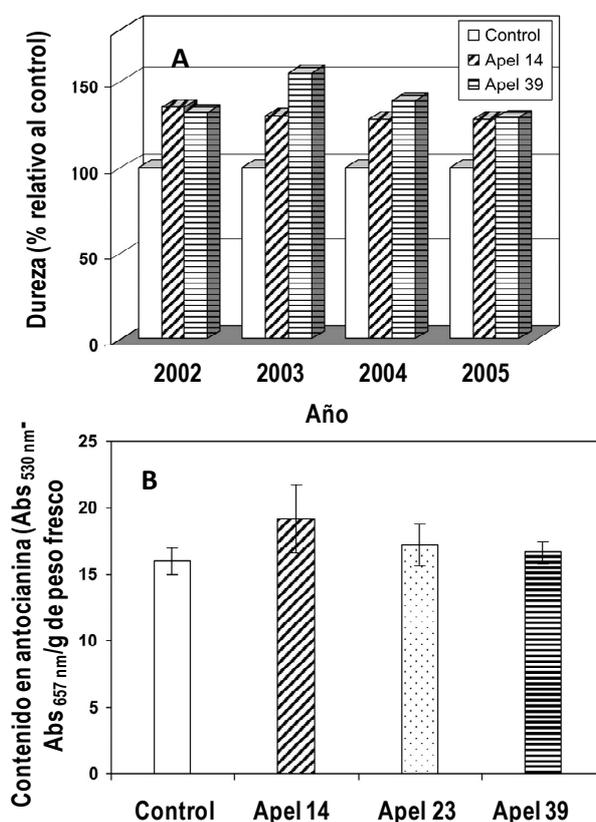


Figura 6.1. Dureza y niveles de antocianina de frutos control y frutos transgénicos con la pectato liasa silenciada (Apel). **A:** Dureza del control y de los frutos transgénicos Apel 14 y 39 cosechados en 4 ciclos de cultivo independientes. **B:** Contenido en antocianina de los frutos maduros usados para la extracción y análisis de la pared celular. En este caso, las medidas se corresponden a frutos controles y a las líneas transgénicas Apel 14, 23 y 39. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar.

6.2.2.- Extracción y fraccionamiento de la pared

El contenido de pared celular estimado como peso seco y referido a 100 gramos de fruto fresco osciló entre los 0,92 y los 1,43 gramos. El mayor valor correspondió a la línea transgénica 23, y fue estadísticamente diferente del obtenido en frutos controles ($P= 0,05$). El contenido de pared celular de las otras dos líneas transgénicas fue similar al que se obtuvo en el control siendo el valor medio de $1,0 \pm 0,1$ g por 100 g de peso fresco de fruto.

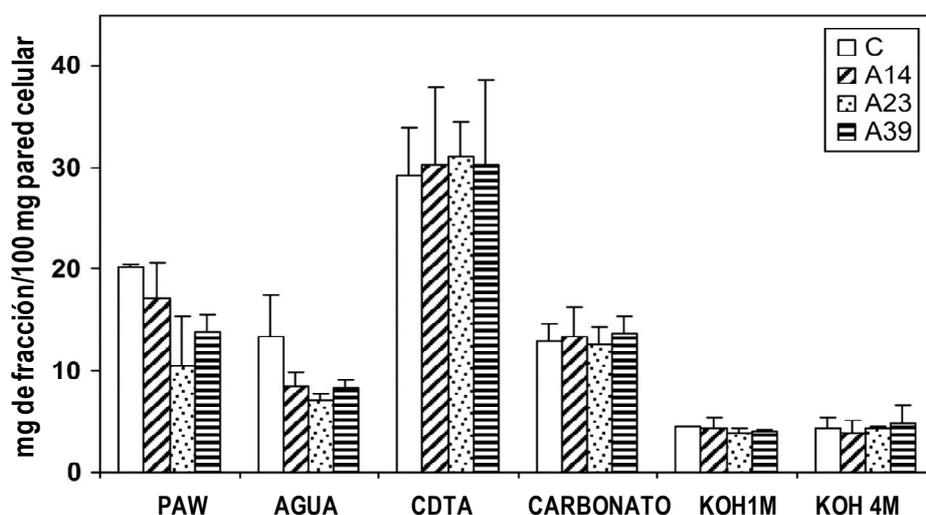


Figura 6.2. Rendimiento relativo del fraccionamiento secuencial de la pared celular incluyendo la fracción PAW a partir de frutos control (C) y tres líneas transgénicas independientes con la pectato liasa silenciada (Apel 14, 23 y 39). Las barras de error corresponden a desviaciones estándar.

Con el protocolo de extracción empleado, basado en el protocolo de Redgwell y col. (1992) ligeramente modificado como se indica en el capítulo 2 “Material y Métodos”, los polímeros de pared celular no sólo están presentes en los extractos de pared celular, sino que también se detectan en la fracción extraída con PAW. Por ello, en la Figura 6.2, junto al contenido de las distintas fracciones extraídas secuencialmente del residuo de pared celular, también se muestra el contenido de esta fracción PAW tras ser dializada y secada. A efectos comparativos, este contenido

se relativizó a 100 mg de pared celular, como el resto de fracciones presentadas. Los valores medios de contenido de fracción PAW fueron más bajos en las tres líneas transgénicas pero las diferencias fueron estadísticamente significativas sólo en las líneas 23 y 39 ($P= 0,05$). Se observa una tendencia similar cuando el contenido de PAW se relativiza al peso fresco del fruto.

Esa menor cantidad relativa de fracción PAW en las líneas transgénicas puede ser interpretada como un reflejo de una menor solubilización de polímeros de pared celular en estos frutos transgénicos, al menos en las líneas 23 y 39. En todos los genotipos estudiados el contenido de polímeros de la fracción PAW fue mayor en fruto rojo que en verde pero el incremento observado al comparar un estadio con el otro fue menor en los frutos transgénicos de media un 99% (128, 27 y 142% para las líneas Apel 14, 23 y 39, respectivamente) frente a un 427%, cuatro veces más, en la línea control. Este es otro dato que apoya la limitación de la solubilización (desmantelamiento) de la pared en los frutos transgénicos.

En lo que se refiere a las fracciones de pared, desde el punto de vista del rendimiento de extracción se puede deducir a partir de la Figura 6.2 que se pierde algo de material de pared. De hecho, el conjunto de todas las fracciones obtenidas, incluyendo el residuo que queda después de la extracción con KOH 4M (no representado en la Figura 6.2), suponen el $76 \pm 4\%$ (p/p) de la cantidad del peso inicial de pared celular usado para la extracción. Por tanto, tenemos una pérdida debida a la manipulación del material y los distintos pasos de fraccionamiento próximo al 25%. La fracción más abundante de pared es la solubilizada con CDTA 50 mM y no existen en ella diferencias entre los genotipos analizados. Sólo en la fracción extraída con agua se observan diferencias significativas entre el control y las 3 líneas transgénicas, siendo la cantidad de fracción significativamente mayor en el control. Esto se puede interpretar en el mismo sentido que lo hemos hecho al referirnos a la fracción PAW.

6.2.3.- Contenido de pectinas y solubilización

En todos los genotipos, el mayor contenido en ácidos urónicos (AU) se encontró en los extractos de PAW, con un valor medio más bajo en las tres líneas transgénicas, aunque estas diferencias sólo fueron estadísticamente significativas para la línea 23 (Figura 6.3 A). Entre las fracciones de pared celular los niveles mayores de AU estaban en la fracción CDTA y los más bajos se encontraban en la fracción de hemicelulosa KOH 4M.

La cantidad de pectinas (estimada como la cantidad de AU) fue significativamente mayor en la fracción CDTA y en la fracción CARBONATO de las paredes celulares de las 3 líneas transgénicas que la obtenida en las fracciones del control (Figura 6.3 A). Esta diferencia es relevante ya que hemos comentado previamente que, en términos de peso, estas dos fracciones son similares a las del control (Figura 6.2). Si se calculan las relaciones de las pectinas más solubles (fracción PAW y AGUA) respecto a las pectinas más unidas (fracción CDTA y CARBONATO) en los distintos genotipos, vemos que es significativamente mayor en el control (3,0) que en las transgénicas (1,8) y esta diferencia es aún mayor si la fracción soluble se compara sólo con la fracción covalentemente unida (CARBONATO) (8,2 en el control y 4,0 en las transgénicas).

Además de los ácidos urónicos, medimos en paralelo azúcares totales en las mismas fracciones pero no se encontraron diferencias significativas entre el control y las líneas transgénicas. Sí se observó, en cambio, que la relación AU/Azúcares totales fue mayor en las tres líneas transgénicas en las fracciones PAW, AGUA, CDTA, CARBONATO y KOH 1M. Esto indica que las fracciones de pared están enriquecidas en pectinas en el caso de los frutos transgénicos (Figura 6.3 B). La única excepción a esta tendencia fue la fracción CDTA de la línea transgénica 39.

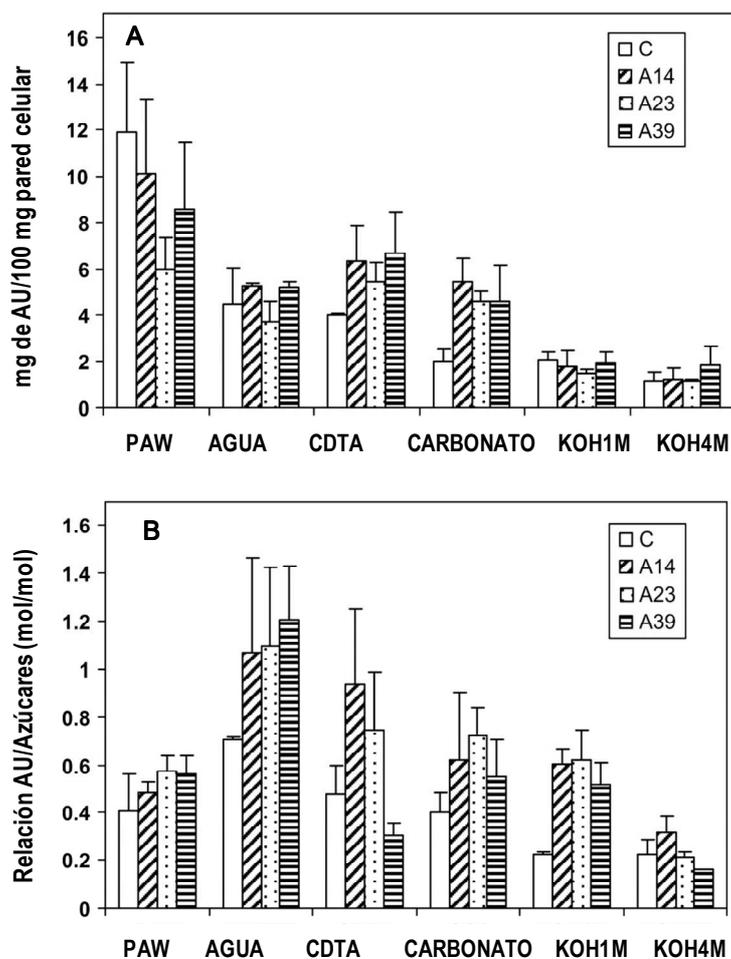


Figura 6.3 A: Contenido en ácidos urónicos (AU) de la fracción PAW y de las otras fracciones secuencialmente extraídas de la pared celular en frutos control (C) y tres líneas transgénicas independientes con la pectato liasa silenciada (Apel 14, 23 y 39). **B:** Relación de los AU respecto a los azúcares totales contenidos en estas mismas fracciones. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar.

El conjunto de estos resultados evidencian la existencia de una menor solubilización de las pectinas en las paredes extraídas de las líneas transgénicas con la pectato liasa silenciada. Esta interpretación además está apoyada por evidencias de índole microscópica (Figura 6.4).

En las micrografías de cortes de tejido de fruto de transgénicas se observa una tinción de pectinas más densa (más color rosado) entre las células del tejido cortical de frutos transgénicos que en el tejido del fruto control. Además, existen menos espacios intercelulares en el tejido de los frutos transgénicos, los cuales muestran más

zonas de contacto entre células que en los frutos control. Esta aparente mayor “adhesión” célula-célula en frutos transgénicos sugiere una mayor integridad de la lámina media que tiene una naturaleza eminentemente péctica en su composición.

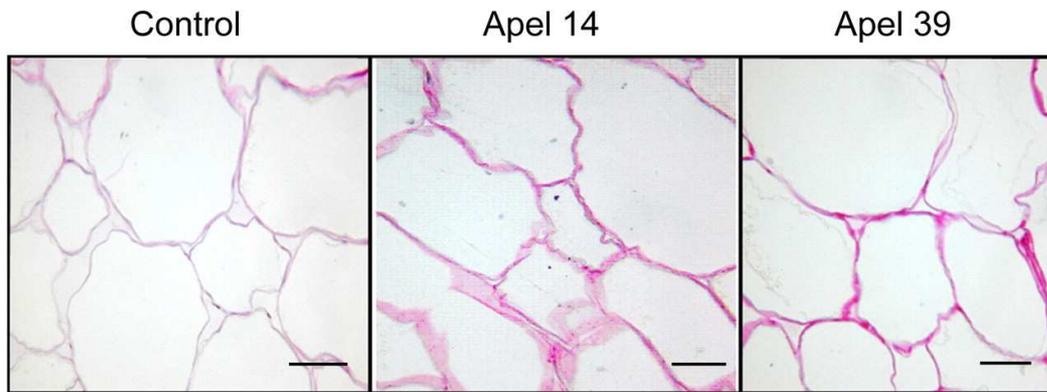


Figura 6.4. Secciones de tejido cortical de fruto maduro de control y de dos líneas transgénicas independientes, Apel 14 y 39, teñidas para la visualización de pectinas. Las barras representan 50 μm .

6.2.4.- Análisis de las fracciones solubles mediante cromatografía de filtración en gel

Los perfiles cromatográficos de los polímeros pécticos presentes en la fracción PAW y AGUA se muestran en la Figura 6.5. Como carácter general, los perfiles correspondientes a la fracción PAW presentan un pico principal asimétrico de polímeros con una masa molecular mayor de 500 KDa que cae hacia la derecha formando una cola de material de masas moleculares inferiores, extendiéndose prácticamente por todo el rango de separación de la columna. La comparación de los perfiles de los tres frutos transgénicos con el correspondiente al control sugiere un pequeño incremento en la masa molecular media de las pectinas más solubles de los frutos con la pectato liasa silenciada. Los tres perfiles de las muestras transgénicas, a pesar de presentar una forma en conjunto similar al control, aparecen ligeramente desplazados hacia la izquierda.

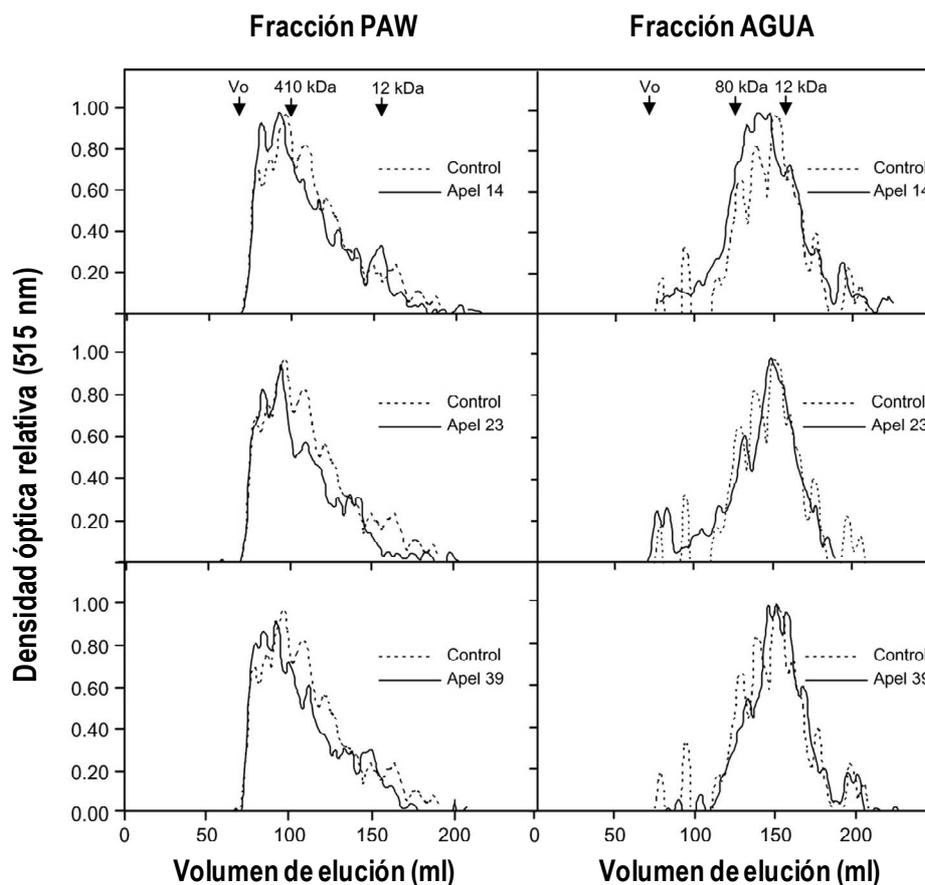


Figura 6.5. Perfiles cromatográficos de las fracciones PAW y AGUA de las paredes celulares de frutos control y de las tres líneas Apel independientes con la pectato liasa silenciada. Los perfiles se obtuvieron por cromatografía de filtración en gel usando Sepharosa CL-6B. A las fracciones se les midió el contenido en ácidos urónicos, normalizando el valor a la máxima absorbancia obtenida en cada perfil para facilitar las comparaciones cualitativas. El volumen de vacío y la calibración de la columna se realizaron mediante dextransos de masa molecular conocida y el volumen correspondiente a su pico de elución se indica con flechas en la parte superior de la figura.

La fracción AGUA de los distintos genotipos muestran en cambio una población de polímeros pécticos incluidos en un pico más simétrico que en el presente en las fracciones PAW. Estos polímeros eluyen mayoritariamente entre los volúmenes que van de 100 y 180 ml. La masa molecular media de estos picos es claramente inferior a la de las pectinas solubilizadas con PAW. Los perfiles de las cuatro muestras comparten un rango de elución similar, aunque en el control aparecen tres picos diferenciados, con masas moleculares entre los 20 y 80 KDa, que no se observan en

las líneas transgénicas. La mayoría de los poliuronidos solubilizados con agua migran con masas moleculares aparentes comprendidas entre los 20 y 50 KDa.

6.2.5.- Análisis de las fracciones unidas a pared celular por cromatografía de filtración en gel

El solvente CDTA se usa para extraer polímeros pécticos iónicamente unidos a entre sí mediante enlaces en los que interviene el Ca^{2+} , los perfiles cromatográficos correspondientes a esta fracción de cada uno de los genotipos estudiados se muestran en la Figura 6.6. Los polímeros eluyen a lo largo de todo el rango de la columna aunque buena parte del perfil se encuentra por encima de los 2.000 KDa. La principal diferencia entre el control y las líneas transgénicas es la presencia de un pico de masa molecular elevada que eluye en el entorno de los 13 ml, ausente en las tres líneas transgénicas estudiadas. En el perfil del control además se diferencian claramente dos picos adicionales que eluyen a 18 y 23 ml y que no coinciden con los picos de las líneas 14, 23 y 39, especialmente el pico que eluye a 18 ml.

Los perfiles obtenidos con los poliuronidos solubilizados con CARBONATO (Figura 6.6, columna derecha) muestran la presencia de un primer pico que eluye entre 10 y 15 ml y que corresponde a pectinas de muy alto peso molecular. En las tres líneas transgénicas este primer pico tiene una masa molecular ligeramente superior a la que se deduce del perfil de la muestra control. Este pico es más importante cuantitativamente en las líneas 14 y 23. Se observa también un segundo grupo de polímeros pécticos (fracciones comprendidas entre los 15 y los 20 ml) en las tres líneas transgénicas que está ausente en el perfil del control, donde sólo se visualiza un pequeño hombro en esa zona. El conjunto de polímeros que eluyen entre los 20 y los 30 ml representa cuantitativamente, al menos, la mitad de los poliuronidos totales presentes en esta fracción y los perfiles de las líneas transgénicas sugieren que el procesamiento de las pectinas es distinto en estos frutos.

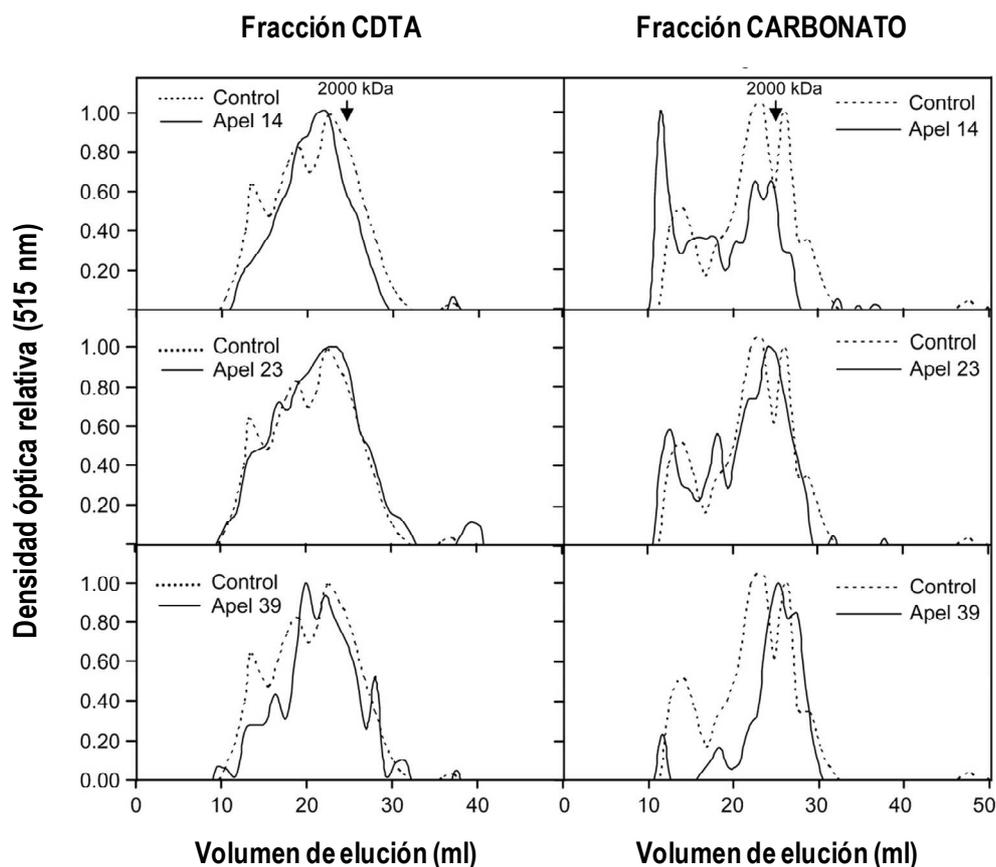


Figura 6.6. Perfiles cromatográficos de las fracciones CDTA y CARBONATO de las paredes celulares de frutos control y de las tres líneas Apel independientes con la pectato liasa silenciada. Los perfiles se obtuvieron por cromatografía de filtración en gel usando Sepharosa CL-2B. A las fracciones se les midió el contenido en ácidos urónicos, normalizando el valor a la máxima absorbancia obtenida en cada perfil para facilitar las comparaciones cualitativas. El volumen de elución para el azul de dextrano (2.000 kDa) se muestra en la parte superior de la figura.

De hecho, si comparamos los perfiles de la fracción CARBONATO con los de la fracción CDTA, llama la atención que las muestras transgénicas muestren picos resueltos a 13 y 18 ml, ausentes en control, y que se observe lo contrario en la fracción CDTA. Esto sugiere que el silenciamiento de las pectato liasas modifica el procesamiento de las pectinas de la pared primaria. Haciendo que determinado conjunto de polímeros aparezcan en la fracción de CARBONATO en los frutos transgénicos y que ello no ocurra en los frutos control quizá porque la pectato liasa sí haya actuado en estos frutos.

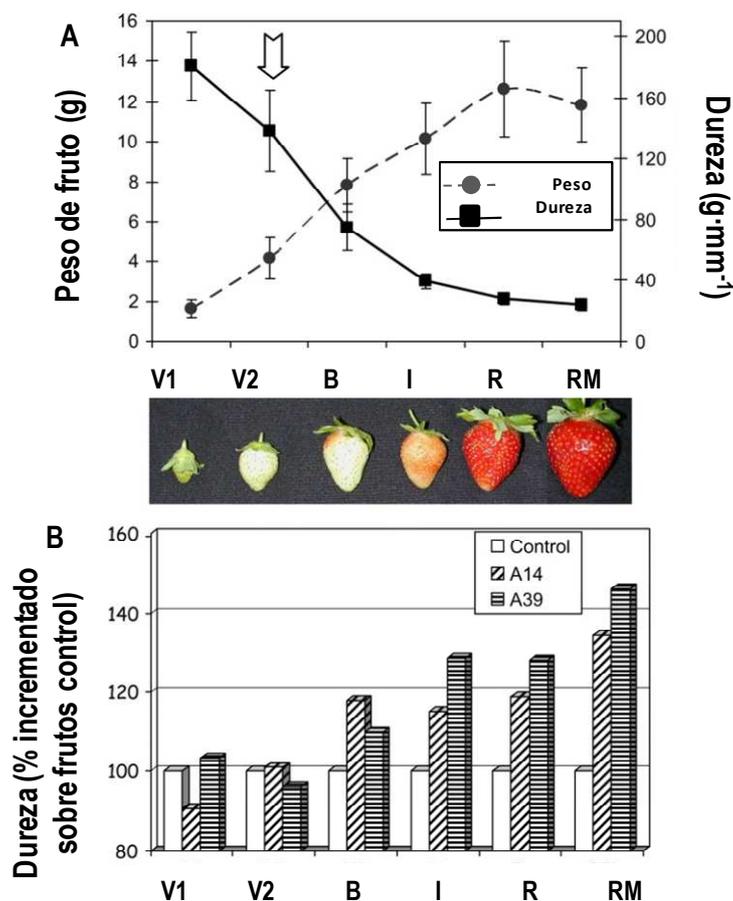


Figura 6.7. Peso y dureza de frutos de planta control y de dos líneas transgénicas durante el desarrollo del fruto. **A:** Peso del fruto y dureza de frutos control en diferentes estadios: V1, verde pequeño; V2, verde grande; B, blanco; I, intermedio (con al menos el 25% de la superficie roja; R, Maduro (totalmente rojo); y RM, sobremaduro (fruto maduro almacenado 3 días a 25°C en una cámara de crecimiento). **B:** Comparación porcentual de la dureza de frutos de las líneas Apel 14 y 39 con respecto a la dureza de los frutos control en cada uno de los estadios mencionados. La flecha del panel A indica el estadio después del cual las diferencias entre los frutos control y las dos líneas transgénicas evaluadas son significativas.

Para apoyar esta hipótesis se obtuvieron los perfiles cromatográficos de pectinas de la fracción CARBONATO de frutos verdes. Estos frutos fueron recolectados en el estadio previo al momento en que se observa un decremento de la dureza. Este reblandecimiento empieza normalmente a ponerse de manifiesto en la transición de fruto verde a blanco (Figura 6.7 A). De hecho, sólo se observan diferencias significativas en la dureza de los frutos, siendo mayor en las líneas transgénicas, con posterioridad a ese momento (Figura 6.7 B). Con este experimento se intenta poner de

manifiesto que las diferencias observadas en los cromatogramas de la fracción CARBONATO de frutos rojos son el resultado de un procesamiento distinto en la pared celular debido al silenciamiento de la pectato liasa durante la maduración. En contrapartida, los cromatogramas de las paredes de los distintos genotipos en fruto verde deberían ser similares y, por esta razón, se obtuvieron.

Los perfiles correspondientes a la fracción CARBONATO de fruto verde se muestran en la Figura 6.8. Los cromatogramas de los cuatro genotipos muestran dos picos bien definidos. El perfil de la línea Apel 39 se distingue un poco del resto por presentar un primer pico menos prominente que los que aparecen en los otras tres muestras. El primer pico eluye próximo a los 10 ml de la columna y su masa molecular es próxima a la del primer pico observado en los extractos de CARBONATO de plantas transgénicos en fruto rojo. El segundo pico formado por un conjunto de polímeros de menor masa molecular es más ancho e importante cuantitativamente que el primero y la masa molecular de su máximo es próxima a los 2.000 kDa.

Si comparamos estos perfiles con los de fruto rojo (Figura 6.6) lo que resulta evidente es la pérdida de importancia relativa del primer pico de polímeros pécticos, con volúmenes de elución entre los 8 y los 12 ml, frente al segundo grupo de polímeros que eluyen formando el segundo pico entre los 18 y los 30 ml. Conviene destacar que esta disminución es, desde el punto de vista cuantitativo, más importante en las fracciones de los frutos control, donde supone un 50%, en comparación con las líneas transgénicas Apel 14 y 23, donde este decremento sólo supone un 12 y un 23% respectivamente. Además, en fruto rojo, también destaca en las fracciones transgénicas la presencia de un pico entre los 15 y los 20 ml que está ausente en el perfil la fracción CARBONATO control.

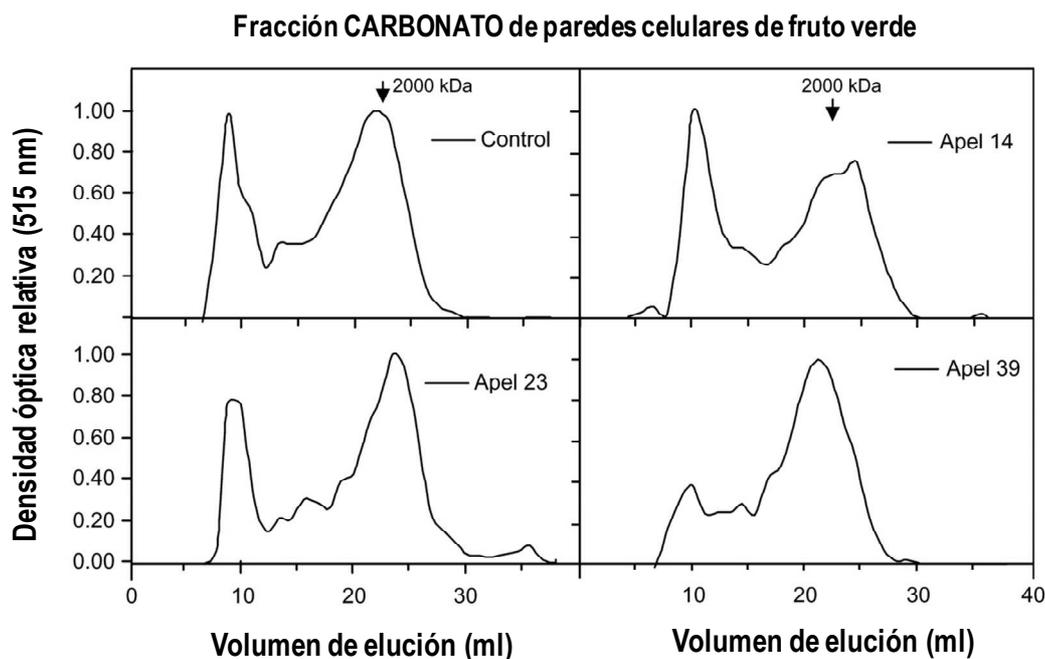


Figura 6.8. Perfiles cromatográficos de las fracciones CARBONATO de las paredes celulares de frutos verdes de plantas control y de tres líneas Apel independientes con la pectato liasa silenciada. Los perfiles se obtuvieron por cromatografía de filtración en gel usando Sepharosa CL-2B. A las fracciones se les midió el contenido en ácidos urónicos, normalizando el valor a la máxima absorbancia obtenida en cada perfil para facilitar las comparaciones cualitativas. El volumen de elución para el azul de dextrano (2.000 kDa) se muestra en la parte superior de la figura.

El hecho de que las fracciones enriquecidas en hemicelulosas extraídas con KOH también contuviesen pectinas (basado en sus niveles de ácidos urónicos (AU)) y que además existiesen diferencias en la relación AU/Azúcares totales entre el control y las tres líneas transgénicas (Figura 6.3 B) nos llevó a considerar la necesidad de obtener los cromatogramas de polímeros pécticos de las fracciones KOH 1M y KOH 4M (Figura 6.9). Los perfiles de KOH 1M para el control y las líneas Apel 14 y 23, sugieren que la presencia de pectinas en esta fracción es más bien residual pero la línea Apel 39 de nuevo presenta un comportamiento distinto al resto. En ella, la presencia péctica es cuantitativamente mayor presentando un perfil con valores de absorbancia claramente superiores y varios picos bien definidos.

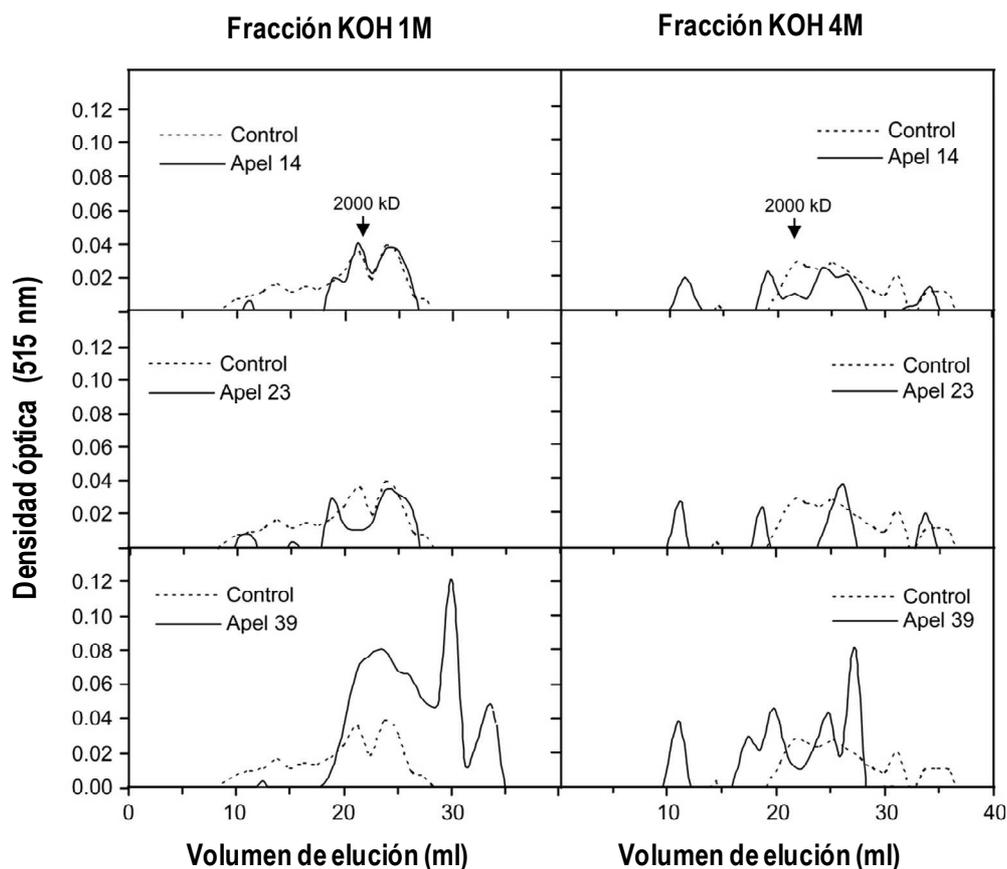


Figura 6.9. Perfiles cromatográficos de las fracciones KOH 1M y 4M de las paredes celulares de frutos control y de las tres líneas Apel independientes con la pectato liasa silenciada. Los perfiles se obtuvieron por cromatografía de filtración en gel usando Sepharosa CL-2B. A las fracciones se les midió el contenido en ácidos urónicos y se presentan los valores de densidad óptica a 515 nm directamente. El volumen de elución para el estándar azul de dextrano (2.000 kDa) se muestra en la parte superior de la figura.

En lo que se refiere a los cromatogramas de las fracciones de KOH 4M, la cantidad de pectinas fue baja y los picos residuales. Aun así, conviene destacar la existencia de picos residuales de masa molecular elevada en las tres líneas transgénicas que están ausentes en los perfiles control. Nos estamos refiriendo a los picos residuales que eluyen entre los 10 y 13 ml y a los que lo hacen entre los 18-20 ml. Estos polímeros pueden corresponder a los observados en la fracción CARBONATO de fruto ya que eluyen en la misma posición.

Cuando en estas mismas columnas se miden azúcares totales se obtiene el conjunto de cromatogramas que presentamos en la Figura 6.10. Estos cromatogramas presentan un pico muy mayoritario de azúcares en todas las muestras y columnas que es cuantitativamente más importante de forma destacada y consistente en las fracciones KOH 1M de los frutos control. De nuevo el comportamiento la línea Apel 39 es algo diferente al resto.

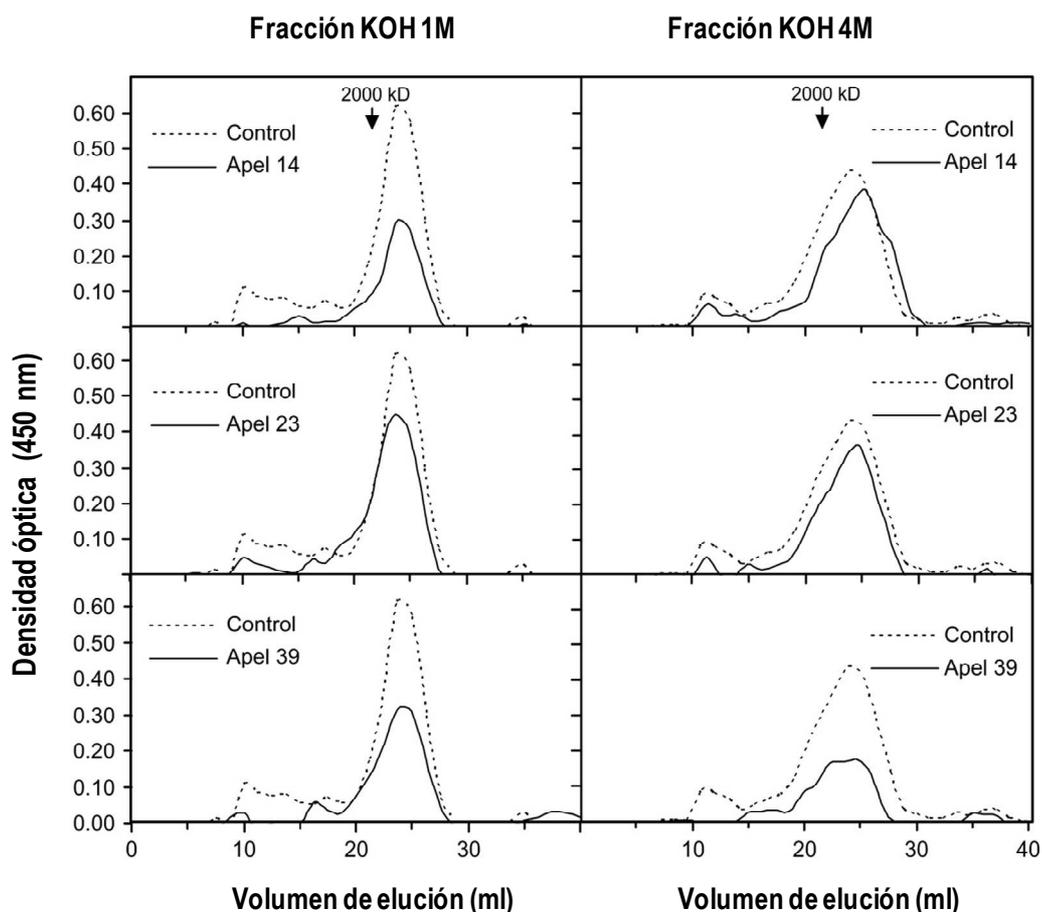


Figura 6.10. Perfiles cromatográficos de las fracciones KOH 1M y 4M de las paredes celulares de frutos control y de las tres líneas Apel independientes con la pectato liasa silenciada. Los perfiles se obtuvieron por cromatografía de filtración en gel usando Sepharosa CL-2B. A las fracciones se les midió el contenido de azúcares totales y se presentan los valores de densidad óptica a 450 nm directamente. El volumen de elución para el estándar azul de dextrano (2.000 kDa) se muestra en la parte superior de la figura.

En relación a la naturaleza de los azúcares neutros de estas fracciones, un análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) de la fracción KOH 4M hidrolizada con ácido trifluoroacético (TFA) muestra que los azúcares neutros que predominan son la glucosa, la xilosa y la ramnosa, con una relación molar de 6:2,5:1, respectivamente. Ello supone, como se esperaba, una presencia cuantitativamente importante de xiloglucanos (hemicelulosas) pero también la existencia de ramnogalacturonanos (pectinas).

6.2.6.-Discusión

El principal objetivo de este trabajo era poner de manifiesto los cambios a nivel de pared celular asociados con el silenciamiento de la pectato liasa en frutos de fresa. Este objetivo complementaba el desarrollado en el trabajo previo de Jiménez-Bermúdez y col. (2002), donde ya mostramos que este silenciamiento se correlacionaba con un menor reblandecimiento de los frutos transgénicos en un estado de maduración similar (fruto rojo). En esa misma publicación se describía una caracterización muy preliminar de la pared celular que hemos ampliado en este trabajo con vistas a poner de manifiesto si esa mayor dureza de los frutos pudiera estar relacionada con un distinto procesamiento de la matriz péctica de sus paredes celulares.

Para ello, hemos aplicado un procedimiento de extracción secuencial que nos permite distinguir fracciones enriquecidas en pectinas dentro de un rango que va de menor a mayor afinidad (enlace) con la pared celular. Este rango de afinidades viene determinado por el orden temporal del protocolo de extracción: fracciones menos ligadas a la pared y, por tanto, más fácilmente extraíbles son obtenidas antes que aquellas con mayor afinidad que son extraídas después. Este procedimiento también permite proponer una localización más probable de las pectinas extraídas en lámina media o pared primaria en función del solvente empleado para solubilizar las pectinas, como comentamos más adelante.

Como ejemplo podemos citar la fracción extraída con Fenol:Acético:Agua, (PAW por sus siglas en inglés). De acuerdo con Fry (1988), “el PAW” es un mal solvente de polisacáridos pécticos por lo que se considera que las pectinas que aparecen en esta fracción se encontraban previamente solubles en la fracción líquida de la pared, en el apoplasto, por mecanismos que actúan *in vivo*. Estos mecanismos se consideran en buena medida ajenos al medio de extracción empleado (Redgwell y col., 1992; 1997a). En cambio, las extracciones con CDTA y carbonato sódico promueven respectivamente la solubilización y/o extracción de pectinas ligadas iónica y covalentemente a la pared celular como resultado del propio procedimiento, jugando un papel importante el solvente o tratamiento químico utilizado.

En lo que se refiere a los datos de la fracción PAW, la cantidad media de fracción obtenida respecto a la cantidad de pared celular utilizada es inferior en las tres líneas transgénicas estudiadas que en las muestras control. También es menor el contenido de ácidos urónicos de esta fracción en los extractos provenientes de las plantas transgénicas, pero no hubo diferencias estadísticas con respecto a los extractos control en la relación ácidos urónicos/azúcares totales (Figura 6.3 B). El proceso de solubilización *in vivo* de las pectinas es considerable en todos los genotipos ya que ésta es la fracción con más contenido péctico de las extraídas a pesar de que, como hemos mencionado, el tratamiento con PAW las solubiliza muy escasamente (Fry, 1988). Además de este hecho, conviene hacer notar que las medias del contenido son menores en las muestras transgénicas. Ello sugiere una menor solubilización péctica *in vivo* en estas líneas, aunque estadísticamente esta tendencia sólo es significativa en el caso de la línea Apel 23. Las diferencias no son sólo cuantitativas, también se observan ligeras diferencias en el grado de polimerización de los polímeros resueltos en los cromatogramas. En todos los genotipos, el pico principal de los perfiles se encontraba entre los 500 KDa y el volumen de vacío de la columna. Los perfiles obtenidos fueron muy similares a los obtenidos por Redgwell y col. (1997b) para frutos de fresa. Estos autores observaban un pequeño decremento en el peso medio de las pectinas solubles cuando se comparaba fruto inmaduro con maduro, nosotros observamos este pequeño decremento al comparar fruto transgénico con no

transgénico. Ello puede ser interpretado en el sentido de una menor despolimerización en las líneas silenciadas.

Por su parte, la fracción AGUA contiene polímeros fácilmente extraíbles que interactúan débilmente con otros componentes de la pared celular, pero que no son solubilizados con el PAW ya que las diferencias son evidentes al comparar los perfiles cromatográficos de ambas fracciones. Las masas moleculares medias de la fracción solubilizada con AGUA son claramente inferiores a las de las pectinas de la fracción PAW. Hay pequeñas diferencias entre los cromatogramas del control y las transgénicas pero consideramos más relevante el que la cantidad extraída de fracción AGUA en el control por unidad de peso de pared celular sea mayor y presente una baja relación ácidos urónicos/azúcares totales (Figura 6.3 B). Esto indica una mayor solubilización por el agua de los polímeros pécticos en la pared del control.

En lo que se refiere a las fracciones CDTA y CARBONATO, que representan fracciones enriquecidas en pectinas más ligadas a la pared, las diferencias fueron más relevantes. El contenido de AU de la fracción CDTA fue superior en las tres líneas transgénicas con un porcentaje medio de incremento del 52%. Por otro lado, existe un cierto consenso en torno a la idea de que las pectinas solubilizadas con CDTA corresponden con el homogalacturonano localizado *in vivo* en la lámina media (Redgwell y col., 1992; Lara y col., 2004). Junto al hecho de este mayor contenido en ácidos urónicos, nuestros resultados histológicos muestran una mayor tinción de pectinas en la lámina media en los cortes de frutos transgénicos que podría deberse a una menor solubilización y/o degradación de este componente en los frutos con la pectato liasa silenciada. Debemos mencionar que el trabajo previo (Jiménez-Bermúdez y col., 2002) incluía un caracterización preliminar de la pared celular de una de las líneas transgénicas en la que encontramos un menor contenido de polímeros pécticos solubilizados con CDTA. Sin embargo, esa fracción no se correspondería a la del presente trabajo ya que la obtención de paredes y el fraccionamiento fue diferente. La obtención de fracciones se inició a partir de un residuo insoluble en alcohol y los lavados y procesamientos de material fueron distintos. Probablemente la fracción soluble en quelante de aquel trabajo contenía también parte de las pectinas

solubilizadas en fracciones PAW y AGUA en el presente estudio, de ahí la falta de correspondencia entre aquél y este resultado. Es un hecho que al aplicar protocolos diferentes se obtienen resultados distintos (Redgwell y col., 1992; Rosli y col., 2004) y que también puede haber cambios en los polímeros extraídos como resultado de la propia metodología empleada (Mort y col., 1991; Rose y col., 2003; Brummell, 2006). Fue por ello que antes de este trabajo dedicamos esfuerzos y tiempo a probar distintos protocolos y buscar un procedimiento que fuese robusto y permitiera comparaciones con otros autores que hubieran publicado resultados en fresa (Redgwell y col., 1997b; Koh y Melton, 2002; Lara y col., 2004) (para detalles ver capítulo 4 “Elección y puesta a punto del protocolo de extracción y fraccionamiento de la pared celular”).

El análisis cromatográfico de la población de poliuronidos de las muestras de CDTA y CARBONATO también evidenció diferencias cuantitativas y cualitativas entre los perfiles control y los correspondientes a las muestras de las líneas transgénicas. Entre ellas, una mayor representación de poblaciones de polímeros de alta masa molecular en los perfiles de la fracción CARBONATO, especialmente evidente en el caso de la línea Apel 14. También sugerimos que la comparación de los perfiles de la fracción CDTA y CARBONATO puede interpretarse en el sentido de un diferente procesamiento en las líneas transgénicas. Esta sugerencia se fundamenta en el hecho de que determinados grupos de polímeros aparezcan en los cromatogramas de fracciones más ligadas en el caso de las muestras transgénicas. El dato en concreto es que el perfil de la fracción CDTA de la muestra control presenta dos picos, con máximos en los 13 y 18 ml, que son residuales o no aparecen como tales en las muestras transgénicas. Sin embargo, encontramos picos con estos mismos máximos en los perfiles de la fracción CARBONATO de las muestras Apel 14, 23 y, parcialmente, en Apel 39, donde estos picos aparecen claramente en la fracción KOH 4M. Es decir, parece que las familias de los polímeros de alta masa molecular representadas en estos picos bien diferenciados se solubilizaran en menor medida en las líneas transgénicas y por eso aparecen en fracciones más ligadas a la pared.

Nuestra hipótesis es que el silenciamiento de la pectato liasa ha disminuido la despolimerización de las fracciones pécticas más fuertemente unidas y/o ha alterado

las interacciones y procesamiento entre distintos componentes estructurales de esta matriz resultando el conjunto de estos efectos en una menor solubilización de pectinas. Este resultado se puede explicar cómo causado directamente por una menor actividad pectato liasa *in muro* en sitios específicos y/o ser también resultado de la menor acción de otras enzimas de pared celular que encuentren más dificultades para acceder a esqueletos pécticos específicos en las líneas transgénicas. Estas otras enzimas podrían ser la poligalacturonasa y la pectin metilesterasa. Ello podría explicar las diferencias mencionadas en la masa molecular media de los polímeros pécticos y la presencia de picos con volúmenes de elución similares en distintas fracciones.

También se debe considerar que la acumulación de poliurónidos no se detiene durante la maduración del fruto de fresa (Huber, 1984). Por tanto, no se puede descartar que el silenciamiento de la pectato liasa interfiera el ensamblaje de estos poliurónidos recién incorporados afectando la composición y arquitectura de la pared en los frutos maduros transgénicos. Por otro lado, la inmunolocalización de la pectato liasa con anticuerpos policlonales muestra que la expresión ocurre en la pared celular primaria de células parenquimáticas del receptáculo (Benítez-Burraco y col., 2003) pero nuestros resultados a nivel de microscopía muestran también que la pérdida de lámina media está limitada en las líneas transgénicas lo que sugiere que este componente de la pared es también un lugar de actuación de la pectato liasa. Además, en relación a la cuestión de la adhesión celular, conviene destacar que un estudio donde se evalúa la adhesión celular en células parenquimáticas de raíz de remolacha sugiere que los polímeros pécticos presentes en la fracción CARBONATO son también importantes para mantener las uniones célula a célula (Marry y col., 2006). Este último resultado encaja bien con la menor despolimerización y solubilización observada en esa fracción en el presente estudio ya que ello se podría correlacionar con una mayor adhesión.

Nuestros resultados también muestran un contenido hemicelulósico menor en las líneas transgénicas de la fracción KOH 1M y KOH 4M que, de acuerdo al análisis de azúcares, están enriquecidas en xiloglucanos. Además, en los cromatogramas de la fracción KOH 4M de las líneas transgénicas se observa un ligero decremento de la

masa molecular media del pico de hemicelulosas, principalmente en Apel 14. Este efecto inesperado del silenciamiento de la pectato liasa en el contenido de polímeros de xiloglucanos no es fácil de explicar, aunque no es nuevo, ya que existen referencias de efectos pleiotrópicos similares (Brummell y col., 1999). Este resultado pone de manifiesto la complejidad del metabolismo de la pared celular donde la cooperación e interacción entre las enzimas que procesan la pared y las redes de polisacáridos que la constituyen son determinantes y deben ser muy tenidos en cuenta (Rose y Bennett, 1999; Vicente y col., 2007).

En resumen, hemos demostrado que la mayor dureza de los frutos en estadio rojo de tres líneas transgénicas independientes con una fuerte supresión en la expresión de la pectato liasa se correlaciona consistentemente con un metabolismo péctico modificado, así como en diferencias en la interacción entre los polímeros presentes en la pared y en la adhesión entre las células parenquimáticas de estos frutos. Estos resultados, junto a los aportados por Rosli y col. (2004) y Villarreal y col. (2008), sugieren que las enzimas implicadas en la despolimerización de las pectinas juegan un papel más importante de lo que se creía en el reblandecimiento del fruto de fresa. Además, este estudio pone de manifiesto que la pectato liasa, bastante menos estudiada que otras enzimas pectinolíticas como la poligalacturonasa y la pectin metilesterasa, es un miembro importante del equipo de pectinasas que actúan sinérgicamente en el desmantelamiento de la pared celular.

Desde el momento de la realización de este trabajo hasta el de la confección de la memoria escrita, nuestro grupo de investigación y otros interesados en el tema han completado la caracterización fenotípica de estas plantas y han ampliado el número de enzimas estudiadas funcionalmente. Esto ha permitido documentar más cambios asociados con la sobreexpresión o el silenciamiento de distintos genes, tanto a nivel del fenotipo de los frutos y sus procesados, como del componente péctico de sus paredes celulares.

En lo que se refiere a la pectato liasa, Youssef y col. (2009), mediante una construcción que pretendía la sobreexpresión de este gen en el mismo cultivar, obtuvieron plantas en las que la expresión estaba, sin embargo, co-suprimida. La

limitación de la expresión fue menor que la de las plantas silenciadas de nuestro estudio y ello se tradujo a nivel fenotípico en frutos más duros que los controles pero algo más blandos que los analizados en este trabajo, confirmando por tanto nuestros resultados con una construcción génica distinta en frutos transgénicos obtenidos independientemente. Otros trabajos han ampliado la caracterización fenotípica de los frutos con la pectato liasa silenciada poniendo de manifiesto un comportamiento textural diferente durante el almacenamiento postcosecha y también de los productos obtenidos al procesar frutos. En lo que se refiere a lo primero, los frutos transgénicos almacenados a 5°C durante una semana fueron más duros que los controles al principio y final del periodo de almacenaje, siendo además su tasa de reblandecimiento diaria menor (García-Gago y col., 2009). A nivel de procesamiento para mermeladas, las obtenidas de frutos transgénicos mantenían fragmentos de frutos de mayor tamaño y más firmes que las obtenidas de frutos controles (Sesmero y col., 2007). Esto se considera un factor de calidad en este tipo de productos. En cuanto a los zumos obtenidos de estos frutos, fueron más viscosos que los obtenidos de frutos controles y ello se asoció a un mayor contenido de partículas grandes en la fracción sólida de este producto (Sesmero y col., 2009). Estos resultados apoyan la consistencia del papel propuesto para la pectato liasa en el dismantelamiento del componente péctico de la pared y las consecuencias que ello tiene en la textura de los frutos y sus procesados. A nivel estructural, también se ha realizado un gran esfuerzo para incrementar las evidencias experimentales en favor de nuestra hipótesis. De hecho, nuestra interpretación de los resultados obtenidos con las columnas de cromatografía se ha confirmado en buena medida usando la microscopía de fuerza atómica (conocida como AFM por sus siglas en inglés). Esta técnica permite la caracterización topográfica de muy distintos tipos de muestras biológicas con un mínimo procesamiento “sintiéndolas más que viéndolas”. Fue inicialmente descrita por Binnig y col. (1987) y empleada posteriormente con muestras de pectinas (Kirby y col., 1995). La resolución que permite es de nivel nanoestructural y nuestro grupo la ha empleado para caracterizar las distintas fracciones pécticas a las que nos hemos estado refiriendo en esta memoria. Permite obtener imágenes de cadenas aisladas, ramificaciones y agregados micelares presentes en las distintas muestras. La técnica

se aplicó con éxito a las fracciones CDTA y CARBONATO de nuestro material no transgénico y se empleó en paralelo una caracterización cualitativa de estas fracciones mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (Posé y col., 2012). Esta última técnica evidenció algunas pequeñas diferencias espectrales en el rango de longitudes de onda comprendido entre los 1.200 y los 900 cm^{-1} indicativas de que la fracción CARBONATO estaba posiblemente enriquecida en ramnogalacturonano I, tal y como hemos sugerido previamente en esta memoria. En ambas fracciones, la población de cadenas visualizadas mediante AFM mostraba una distribución log normal con medianas significativamente diferentes, 85 vs 65 nm, para las fracciones CDTA y CARBONATO, respectivamente. Un nueve por ciento de las cadenas presentes en ambas fracciones estaban ramificadas, aunque en la fracción CARBONATO era más frecuentemente la presencia de más de una ramificación por cadena. La longitud de las ramificaciones también fue mayor en el caso de la fracción CDTA. En las muestras de ambas fracciones se visualizó de forma consistente y repetida la presencia de unas estructuras no lineales denominadas agregados micelares, también observados en otros trabajos (Morris y col., 2009). Una vez optimizadas las condiciones para aplicar la técnica y para realizar el tratamiento de los resultados obtenidos, se aplicó a las fracciones extraídas de los frutos con la pectato liasa silenciada (Posé y col., 2015). Las medianas de las longitudes de las cadenas aisladas fueron mayores en los frutos transgénicos que en las muestras de frutos controles, siendo las diferencias significativas en la fracción CDTA. Esto apoyaría la menor despolimerización de estas fracciones, algo que nosotros sugerimos para la fracción CARBONATO basándonos en los resultados cromatográficos. Si bien hay que indicar que la filtración en gel diferencia más en nuestras muestras el comportamiento de grupos de polímeros que de cadenas aisladas. Además, las imágenes de AFM también mostraban que las cadenas de la fracción CARBONATO estaban más ramificadas y había una mayor presencia de agregados micelares. Esto pone en evidencia que el silenciamiento de la pectato liasa modifica, no sólo la longitud de las cadenas, sino su nivel de ramificación y el nivel de agregación observado en las muestras. Este conjunto de resultados estructurales apoya también el papel propuesto

para la pectato liasa en el desmantelamiento de la matriz péctica que ocurre durante el reblandecimiento de los frutos de fresa.

Otras enzimas que comparten con la pectato liasa el hecho de actuar sobre las cadenas de homogalacturonano son la pectin metilesterasa (PME) y la poligalacturonasa (PG). Como ya detallamos en el capítulo de introducción, la actividad pectin metilesterasa es necesaria para que puedan actuar la pectato liasa y la poligalacturonasa, ya que ambas requieren fragmentos de homogalacturonanos demetilados. En *Fragaria vesca*, la sobreexpresión de uno de los cuatro genes identificados de PME en la fresa cultivada provocó una disminución del 20% en la metilación de las pectinas solubles y extraídas con CDTA (Osorio y col., 2008). El perfil cromatográfico de la fracción CARBONATO de las dos líneas transgénicas analizadas mostró, en contra de lo esperado, que la masa molecular media de los polímeros pécticos fuese mayor que la observada en la fracción control correspondiente. En este caso, a diferencia de lo que ocurre en nuestras plantas, este hecho no se correlacionó con un aumento de la firmeza de los frutos que sí mostraron una mayor tolerancia a la infección por *Botrytis cinerea*. En parte, ello podría ser consecuencia de un efecto barrera de la pared celular pero los autores del trabajo correlacionaron más bien este hecho con la expresión constitutiva en los frutos transgénicos de los genes de patogénesis. Por último, se propuso que esta expresión constitutiva era inducida por una mayor presencia de oligogalacturónidos de pequeño tamaño (OGAs) en las plantas transgénicas a causa de la sobreexpresión de la PME. En lo que se refiere a la poligalacturonasa, como comentamos en el capítulo introductorio, nuestro grupo ha caracterizado los frutos de plantas de fresa con el gen FaPg1 silenciado (Quesada y col., 2009). Estos frutos fueron más duros que los de plantas controles y, también, que los frutos con la pectato liasa silenciada descritos en el presente trabajo. Los frutos transgénicos también mostraron un mejor comportamiento postcosecha (Quesada y col., 2009; García-Gago y col., 2009), al igual que ocurría con nuestros frutos. Otros autores, en *Fragaria chiloensis*, han demostrado que los niveles de expresión de PG correlacionan positivamente con el reblandecimiento (Figueroa y col., 2008). En lo que se refiere al procesamiento de las pectinas en los frutos con la PG silenciada, se ha visto que el menor reblandecimiento de nuevo se correlacionó con una menor

solubilización de las pectinas y una mayor proporción de pectinas en la fracción CARBONATO (Quesada y col., 2009). Las paredes celulares obtenidas de los frutos transgénicos se hinchaban menos *in vitro* y las cromatografías de filtración en gel de las fracciones CDTA y CARBONATO mostraron en los dos casos un desplazamiento de los picos presentes hacia menores volúmenes de elución en comparación con los cromatogramas controles (Posé y col., 2013). Esto es indicativo de masas moleculares medias mayores de los grupos de polímeros en el caso de los frutos transgénicos, siendo posiblemente resultado de una menor despolimerización de las pectinas en estas muestras. El perfil de la muestra CDTA transgénica mostró los tres picos que también aparecen en las muestras control, a diferencia de lo observado en nuestros perfiles para las muestras con la pectato liasa silenciada. Esto sugiere que, aunque ambas enzimas actúan sobre cadenas de homogalacturonano demetiladas, sus lugares de actuación *in muro* no son coincidentes. Pareciendo que en el caso de la PG la actuación es menos localizada. En esta dirección apuntan también las pruebas estructurales obtenidas mediante AFM (Posé y col., 2015). Las medianas de las cadenas aisladas visualizada en la muestras de la PG silenciada son significativamente mayores que las de muestras control en el caso de la fracción CDTA y CARBONATO. Sin embargo, sólo era así en el caso de la fracción CARBONATO de las muestras con la pectato liasa silenciada. Sin ser estadísticamente significativo, estas medianas de las muestras de frutos con la PG silenciada son numéricamente mayores que las de fracciones con la pectato liasa silenciada. Las muestras con la PG silenciada también mostraron una mayor complejidad estructural a nivel de la existencia de ramificaciones en las cadenas. Los porcentajes de cadenas con ramificaciones fueron prácticamente del 18% en ambas fracciones (PG silenciada). En controles y muestras Apel de la fracción CDTA, sólo un 7,2% de cadenas estaban ramificadas y en la fracción CARBONATO estos valores fueron del 9,4% (control) y del 14,3% (Apel). También fue superior el porcentaje de cadenas que presentaban más de una ramificación en las plantas con la PG silenciada, en ambas fracciones, y esto sólo se observó en la fracción CARBONATO para las muestras Apel (Posé y col., 2015). Poniendo de manifiesto que los cambios observados en las plantas con la pectato liasa silenciada son más evidentes en la

fracción CARBONATO (pared primaria) que en la fracción CDTA (lámina media), mientras que se observaban cambios significativos en las dos fracciones cuando las muestras provenían de frutos con la poligalacturonasa silenciada.

Las pectinasas no sólo actúan sobre el homogalacturonano, sino que también son importantes los efectos de su actividad enzimática en el ramnogalacturonano I (RGI). Especialmente, las que se dan en las ramificaciones laterales de galactanos y arabinanos que se encuentran enlazadas a los residuos de ramnosa del disacárido que constituye la unidad estructural básica del esqueleto de RGI. Como comentamos en el capítulo introductorio, la galactosa y la arabinosa son los azúcares neutros que más disminuyen durante la maduración del fruto de fresa y esa pérdida se corresponde con la digestión de las cadenas laterales mencionadas. Esta pérdida también se ha relacionado con el incremento de la solubilización de las pectinas durante la maduración de los frutos (Koh y Melton, 2002; Brummell, 2006). Entre las enzimas involucradas en este desmantelamiento están las β -galactosidasas y las α -arabinofuranosidasas (Rosli y col., 2009; Figueroa y col., 2010). En el caso concreto de las β -galactosidasas, se habían descritos en fresa tres genes con una expresión compleja en fruto (Trainotti y col., 2001). De ellos, sólo el denominado Fa β Gal1 mostró valores de expresión más elevados en fruto maduro. Más recientemente, se ha descrito un cuarto gen, Fa β Gal4, cuyo silenciamiento por nuestro grupo de trabajo ha permitido la obtención de dos líneas, de un total de nueve líneas independientes transgénicas, que manifestaron a nivel fenotípico un incremento de la dureza de los frutos del 30% con respecto a frutos controles (Paniagua y col., 2015). Este gen se expresa preferentemente en el receptáculo de frutos maduros, estando regulado positivamente por el ácido abscísico y negativamente por auxinas. A nivel de la caracterización de las paredes de estos frutos, se encontró un incremento de las pectinas presentes en la fracción CARBONATO, como ocurre en el caso de las plantas con la pectato liasa y la poligalacturonasa silenciadas. La cantidad de galactosa en las paredes extraídas fue un 30% superior que en las paredes de plantas control, siendo especialmente evidente en la fracción KOH 1M. Esto podría sugerir que estas pectinas con galactanos pueden estar interaccionando de algún modo con la matriz de xiloglucanos de la pared. Estos resultados son una evidencia experimental de que el

desmantelamiento de las cadenas laterales de galactanos juega un papel en la solubilización de las pectinas. El silenciamiento de otras β -galactosidasas también se ha evaluado en tomate pero los resultados obtenidos a nivel de reblandecimiento no han sido tan concluyentes debido a una compleja expresión temporal de los distintos genes de β -galactosidasa silenciados y no silenciados en estos frutos (Smith y col., 2002; Moctezuma y col., 2003; Paniagua y col., 2015). El efecto del silenciamiento de la β -galactosidasa en el reblandecimiento puede ser indirecto, causado por la limitación del acceso a zonas de actuación de otras enzimas, como la pectato liasa y la poligalacturonasa, que serían las verdaderas responsables del reblandecimiento. De todos modos, no se puede descartar un efecto directo en la firmeza de los frutos, ya que en guisante el incremento de cadenas de galactanos que ocurre en la última fase del desarrollo de los cotiledones se traduce en un incremento de la firmeza del tejido (McCartney y col., 2000). Otra enzima silenciada transitoriamente en fresa que actúa sobre RGI y con efecto en la solubilización de pectinas asociadas a la lámina media es la ramnogalacturonasa liasa 1 (FaRGLyase1) (Molina-Hidalgo y col., 2013). Para explicar su actuación en lámina media se propone también un efecto indirecto similar al comentado anteriormente. Aunque, una posibilidad alternativa sería asumir el modelo de pared celular propuesto por Vincken y col. (2003) que considera a RGI el esqueleto péctico principal al que se anclan cadenas de homogalacturonano. En este modelo, el desmantelamiento de RGI por actuación de la RG-liasa tendría consecuencias evidentes en la lámina media ya que las cadenas de homogalacturonano dejarían de estar ancladas a la pared primaria, donde se encuentra la cadena principal de RGI, y sería más fácil su solubilización.

Además de estas pectinasas, también se ha silenciado en frutos de fresa dos endo-glucanasas FaEG1 (Wooley y col., 2001) y FaEG3 (Mercado y col., 2010) sin que ello tuviera efecto en la firmeza de los frutos en los dos casos. En el caso de las plantas de FaEG3, a nivel de pared celular se observó que las líneas silenciadas contenían más hemicelulosa y esta era de una masa molecular media ligeramente superior a la extraída de frutos controles (Mercado y col., 2010). También se obtuvieron plantas doblemente silenciadas, frente a la endoglucanasa FaEG3 y la pectato liasa (Youssef y col., 2013) y los resultados a nivel de firmeza de fruto fueron

similares a los que se obtenían silenciando sólo con la pectato liasa. Por último, indicar que esta aproximación funcional también se ha empleado para silenciar una expansina, FaExp2, en fresa (García-Gago y col., comunicación personal) sin observar que este silenciamiento tuviera efecto en la firmeza de los frutos, aunque bastantes de las líneas obtenidas eran poco vigorosas y tenían un crecimiento limitado. Lo que sugiere que FaExp2 puede estar más involucrada en regular el crecimiento que en firmeza.

El conjunto de estas aproximaciones funcionales indican que el desmantelamiento de las pectinas, a nivel del homogalacturonano y/o del ramnogalacturonano I, con distintas enzimas actuando de forma temporal y espacialmente coordinada explica, al menos en parte, el reblandecimiento del fruto de fresa. Los resultados que emplean el análisis funcional mediante transgénesis en fresa y manzana (Atkinson y col., 2012) no son coincidentes con los obtenidos en otros modelos, como el del tomate. A pesar de este hecho, durante años se ha asumido que los resultados obtenidos en este último fruto eran generalizables, algo que nuestros resultados y los de otros autores han puesto en cuestión.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CAPÍTULO 7. Conclusiones



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

7.- Conclusiones

1.- De los tres protocolos evaluados, dos basados en procedimientos publicados y el tercero una modificación de ellos, optamos por adoptar la metodología de extracción propuesta por Redgwell y col., (1992). Basamos esta elección en que su rendimiento, preservación de las fracciones y facilidad de comparación con otros trabajos publicados iguala o supera a los otros dos.

2.- La cantidad de pared celular por peso de fruto extraída en estadio rojo es ocho veces inferior a la presente en fruto verde y esta tendencia se mantiene en todo el fraccionamiento posterior. En cambio, el porcentaje de pectinas presentes en la pared se duplica pasando de un 30% en fruto verde a un 60% en rojo. Las paredes en fruto rojo también presentan una mayor capacidad de hinchamiento *in vitro*.

3.- Las fracciones más enriquecidas en pectinas en fruto rojo son la fracción AGUA y CDTA lo que se puede interpretar como una solubilización de este componente que es paralela a una ligera despolimerización, también observada en la fracción CARBONATO. En estadio rojo, las fracciones hemicelulósicas (KOH 1 y 4M) se encuentran enriquecidas en azúcares neutros y también sufren una despolimerización en su componente de mayor masa molecular.

4- El silenciamiento de la pectato liasa en estadio rojo provoca una reducción en la solubilización de los polímeros pécticos y una limitación en la despolimerización de las pectinas, especialmente evidente en las unidas covalentemente. Como un efecto colateral, también se observa una disminución del principal componente hemicelulósico presente en los perfiles cromatográficos. Por tanto, el silenciamiento contrarresta parte de los procesos de desmantelamiento de la pared celular que ocurren en los frutos rojos no transgénicos y, probablemente, este hecho esté relacionado con la mayor dureza de los frutos silenciados.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CAPÍTULO 8.

Bibliografía



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

8.- Bibliografía

Abeles, F. B., & Takeda, F. (1990). Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. *Scientia Horticulturae*, 42(4), 269-275.

Ahmed, A. E. R., & Labavitch, J. M. (1978). A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *Journal of Food Biochemistry*, 1(4), 361-365.

Albregts, E. E., & Howard, C. M. (1982). Effect of fertilizer rate on number of malformed strawberry fruit. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 95, 323-324.

Al-Jamali, A. F. (1973). Cell wall enzymes and senescence in strawberry fruits. Tesis Doctoral, Purdue University.

Archer, S. A., & Fielding, A. H. (1979). Polygalacturonase isoenzymes of fungi involved in the breakdown of sulphited strawberries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30(7), 711-723.

Atkinson, R. G., Sutherland, P. W., Johnston, S. L., Gunaseelan, K., Hallett, I. C., Mitra, D., Brummell D.A, Schröder, R., Jason W Johnston, J.W. & Schaffer, R. J. (2012). Down-regulation of POLYGALACTURONASE1 alters firmness, tensile strength and water loss in apple (*Malus x domestica*) fruit. *BMC plant biology*, 12(1), 129.

Barceló, M., El-Mansouri, I., Mercado, J. A., Quesada, M. A., & Alfaro, F. P. (1998). Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54(1), 29-36.

Barnes, M. F., & Patchett, B. J. (1976). Cell wall degrading enzymes and the softening of senescent strawberry fruit. *Journal of food science*, 41(6), 1392-1395.

Bartual Pastor, R., Marsal Peset, J.I., López Aranda, J.M., Medina Minguez, J.J., Miranda Enamorado, L., Sánchez Sevilla, J.F., Soria Navarro, C., Ariza Fernández, M.T., Villalba Anaya, R., Gil Ariza, D., Gálvez Farfán, J., Clavero Ramírez, I., Chomé Fuster, P.M., Martínez Treceño Ayuso, A. (2006). Variedades de Fresa, registro de variedades comerciales. En: Chomé Fuster, P.(ed.). *Oficina española de variedades vegetales*. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Madrid, España.

Benítez-Burraco, A., Blanco-Portales, R., Redondo-Nevado, J., Bellido, M. L., Moyano, E., Caballero, J. L., & Muñoz-Blanco, J. (2003). Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *Journal of Experimental Botany*, 54(383), 633-645.

Bennett, A. B., & DellaPenna, D. (1987). Polygalacturonase: its importance and regulation in fruit ripening. p. 89-107. En: W. Thompson, E. Nothnagel, and R. Huffaker (eds). *Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology*. American Society of Plant Physiologist, Rockville, MD.

Binnig, G., Gerber, C., Stoll, E., Albrecht, T. R., & Quate, C. F. (1987). Atomic resolution with atomic force microscope. *EPL (Europhysics Letters)*, 3(12), 1281.

Brady, C. J. (1987). Fruit Ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 38, pp 155-78.

Branzanti, E. C. (1989). *La fresa. Mundi-Prensa, España.*

Brett, C. T., & Waldron, K. W. (1996). The molecular components of the wall. *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*, 4-43.

Brummell, D. A. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, 33(2), 103-119.

Brummell, D. A., & Harpster, M. H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. In *Plant Cell Walls* (pp. 311-340). Springer Netherlands.

Brummell, D. A., & Labavitch, J. M. (1997). Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates. *Plant Physiology*, 115(2), 717-725.

Brummell, D. A., Harpster, M. H., Civello, P. M., Palys, J. M., Bennett, A. B., & Dunsmuir, P. (1999). Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *The Plant Cell*, 11(11), 2203-2216.

Brummell, D. A., Lashbrook, C. C., & Bennett, A. B. (1994). Plant endo-1, 4-beta-D-glucanases: Structure, properties, and physiological function. In ACS symposium series (USA).

Buchanan, B. B., & Jones, R. L. (2000). Biochemistry & molecular biology of plants (Vol. 40). American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD.

Bustamante, C. A., Civello, P. M., & Martínez, G. A. (2009). Cloning of the promoter region of β -xylosidase (FaXyl1) gene and effect of plant growth regulators on the expression of FaXyl1 in strawberry fruit. *Plant Science*, 177(1), 49-56.

Bustamante, C. A., Rosli, H. G., Añón, M. C., Civello, P. M., & Martínez, G. A. (2006). β -Xylosidase in strawberry fruit: isolation of a full-length gene and analysis of its expression and enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. *Plant Science*, 171(4), 497-504.

Carpita N., McCann M. (2000). The cell wall. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (Eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA, pp 52-108.

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. *The Plant Journal*, 3(1), 1-30.

Castillejo, C., de la Fuente, J. I., Iannetta, P., Botella, M. Á., & Valpuesta, V. (2004). Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of FaPE1, a ripening-specific isoform. *Journal of Experimental Botany*, 55(398), 909-918.

Chagnon, M., Gingras, J., & DeOliveira, D. (1993). Complementary aspects of strawberry pollination by honey and indigenous bees (Hymenoptera). *Journal of Economic Entomology*, 86 (2), 416-420.

Chan, H. T., & Tam, S. Y. (1982). Partial Separation and Characterization of papaya endo-and exo-polygalacturonase. *Journal of Food Science*, 47(5), 1478-1483.

Civello, P. M., Powell, A. L., Sabehat, A., & Bennett, A. B. (1999). An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology*, 121(4), 1273-1279.

Coombe, B. G. (1976). The development of fleshy fruit. *Annual Review of Plant Physiology*, 27:507-528.

Cosgrove, D. J. (2000a). Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1), 109-124.

Cosgrove, D. J. (2000b). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802), 321-326.

Dana, M. N. (1980). The strawberry plant and its environment. En: 33-44. ISO 690

Darrow G. M. (1966). *The strawberry: History, breeding and physiology*. Holt, Rinehart and Winston.

Davies, K. M., Hobson, G. E., & Grierson, D. (1988). Silver ions inhibit the ethylene-stimulated production of ripening-related mRNAs in tomato. *Plant, Cell & Environment*, 11(8), 729-738.

Dennis, F.G. (1984). Fruit development. In: M.B., Tesar (ed.). *Physiological basis of crop growth and development* (pp. 265-288). Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy Crop Science Society

Dominguez-Puigjaner, E., Llop, I., Vendrell, M., & Prat, S. (1997). A cDNA clone highly expressed in ripe banana fruit shows homology to pectate lyases. *Plant Physiology*, 114(3), 1071-1076.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

Dumville, J. C., & Fry, S. C. (2000). Uronic acid-containing oligosaccharins: their biosynthesis, degradation and signalling roles in non-diseased plant tissues. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1), 125-140.

Dumville, J. C., & Fry, S. C. (2003). Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymic mechanism of fruit softening. *Planta*, 217(6), 951-961.

EI-Zoghbi, M. (1994). Biochemical changes in some tropical fruits during ripening. *Food Chemistry*, 49(1), 33-37.

Faedi, W., Mourgues, F., & Rosati, C. (2002). Strawberry breeding and varieties: situation and perspectives. *Acta Horticulturae* 567, 51-59.

FAOSTAT: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>

Figuroa, C. R., Pimentel, P., Gaete-Eastman, C., Moya, M., Herrera, R., Caligari, P. D., & Moya-León, M. A. (2008). Softening rate of the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit reflects the expression of polygalacturonase and pectate lyase genes. *Postharvest Biology and Technology*, 49(2), 210-220.

Figuroa, C. R., Rosli, H. G., Civello, P. M., Martínez, G. A., Herrera, R., & Moya-León, M. A. (2010). Changes in cell wall polysaccharides and cell wall degrading enzymes during ripening of *Fragaria chiloensis* and *Fragaria × ananassa* fruits. *Scientia Horticulturae*, 124(4), 454-462.

Folta, K. M., & Davis, T. M. (2006). Strawberry genes and genomics. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(5), 399-415.

Fry S. C. (2000). *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*. Reprint edition. Blackburn Press, Caldwell, New Jersey.

Fry, S. C. (1988). *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*. Longman Group Limited.

García-Gago, J.A., López-Aranda, J.M., Muñoz-Blanco, J., Toro, F. J., Quesada, M.A., Pliego-Alfaro, F., Mercado, J.A. (2009) Postharvest behaviour of transgenic strawberry with polygalacturonase or pectate lyase genes silenced. *Acta Horticulturae* 842, 573-576.

Giusti, M. M., Rodríguez-Saona, L. E., & Wrolstad, R. E. (1999). Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4631-4637.

Given, N. K., Venis, M. A., & Gierson, D. (1988). Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta*, 174(3), 402-406.

Gizis, E. J. (1963). The isolation and characterization of the pectic enzymes and the pectic substances of the Northwest strawberry.

Goulao, L. F., & Oliveira, C. M. (2008). Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 19(1), 4-25.

Gross, K. C., & Sams, C. E. (1984). Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry*, 23(11), 2457-2461.

Hadfield, K. A., & Bennett, A. B. (1998). Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiology*, 117(2), 337-343.

Hannum, S. M. (2004). Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(1), 1-17.

Harrison, E. P., McQueen-Mason, S. J., & Manning, K. (2001). Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany*, 52(360), 1437-1446.

Hatfield, R., & Nevins, D. J. (1986). Characterization of the hydrolytic activity of avocado cellulase. *Plant and Cell Physiology*, 27(3), 541-552.

Havis, A. L. (1943). A developmental analysis of the strawberry fruit. *American Journal of Botany*, 311-314.

Henrissat, B., Heffron, S. E., Yoder, M. D., Lietzke, S. E., & Journak, F. (1995). Functional implications of structure-based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily. *Plant Physiology*, 107(3), 963-976.

Hobson, G. E. (1967). Phenolase activity in tomato fruit in relation to growth and to various ripening disorders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18(11), 523-526.

Hobson, G. E., Nichols, R., Davies, J. N., & Atkey, P. T. (1984). The inhibition of tomato fruit ripening by silver. *Journal of Plant Physiology*, 116(1), 21-29.

Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., & Schilperoort, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid.

Huber, D. J. (1983). Polyuronide degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108, 405-409.

Huber, D. J. (1984). Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *Journal of Food Science*, 49(5), 1310-1315.

Huber, D. J. (1991). Acidified phenol alters tomato cell wall pectin solubility and calcium content. *Phytochemistry*, 30(8), 2523-2527.

Huber, D. J., & O'Donoghue, E. M. (1993). Polyuronides in avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening. *Plant Physiology*, 102(2), 473-480.

Ishimaru, M., & Kobayashi, S. (2002). Expression of a xyloglucan endo-transglycosylase gene is closely related to grape berry softening. *Plant Science*, 162(4), 621-628.

Jarvis, M. C. (1984). Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant, Cell & Environment*, 7(3), 153-164.

Jarvis, M. C., Briggs, S. P. H., & Knox, J. P. (2003). Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell & Environment*, 26(7), 977-989.

Jiménez-Bermúdez, S. (2005) Modificación de la textura del fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) mediante transformación con los genes pectato liasa, celulasa o poligalacturonasa en antisentido. Tesis doctoral. Universidad de Málaga.

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 Physiology*, 128(2), 751-759.

Kader, A. A. (1991). Quality and its maintenance in relation to the postharvest physiology of strawberry. En: *The strawberry into the 21st century*. Timber Press, Portland, OR, 145-151.

Kader, A.A., (1992). Quality and its maintenance in relation to the postharvest physiology of strawberry. En: Luby, J.J., Dale, A. (Eds.). *The Strawberry into the 21st Century*. Timber Press, Portland, OR, pp. 145-152.

Kanellis, A. K., & Kalaitzis, P. (1992). Cellulase occurs in multiple active forms in ripe avocado fruit mesocarp. *Plant Physiology*, 98(2), 530-534.

Kirby, A. R., Gunning, A. P., Morris, V. J., & Ridout, M. J. (1995). Observation of the helical structure of the bacterial polysaccharide acetan by atomic force microscopy. *Biophysical journal*, 68(1), 360.

Knee, M., Sargent, J. A., & Osborne, D. J. (1977). Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany*, 28(2), 377-396.

Koch, J. L., & Nevins, D. J. (1989). Tomato fruit cell wall I. Use of purified tomato polygalacturonase and pectinmethylesterase to identify developmental changes in pectins. *Plant Physiology*, 91(3), 816-822.

Koh, T. H., & Melton, L. D. (2002). Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biology and Technology*, 26(1), 23-33.

Koh, T. H., Melton, L. D., & Newman, R. H. (1997). Solid-state ¹³C NMR characterization of cell walls of ripening strawberries. *Canadian Journal of Botany*, 75(11), 1957-1964.

Kramer, M., Sanders, R., Bolkan, H., Waters, C., Sheeny, R. E., & Hiatt, W. R. (1992). Postharvest evaluation of transgenic tomatoes with reduced levels of polygalacturonase: processing, firmness and disease resistance. *Postharvest Biology and Technology*, 1(3), 241-255.

Lara, I. (2013). Bases bioquímicas y fisiológicas de la maduración. En: *Postcosecha de pera, manzana y melocotón.*, Ediciones Mundi-Prensa, Inmaculada VIÑAS, Inmaculada RECASENS, Josep USALL, Jordi Graell (Eds), pp.75-115.

Lara, I., García, P., & Vendrell, M. (2004). Modifications in cell wall composition after cold storage of calcium-treated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 34(3), 331-339.

Lefever, G., Vieuille, M., Delage, N., Monteclerc, J., & Bompeix, G. (2004). Characterization of cell wall enzyme activities, pectin composition, and technological criteria of strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch). *Journal of food science*, 69(4), FCT221-FCT226.

Lincoln, J. E., Cordes, S., Read, E., & Fischer, R. L. (1987). Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(9), 2793-2797.

Lis, E. K., & Antoszewski, R. (1979). Modification of the strawberry receptacle accumulation ability by growth regulators. *Photosynthesis and Plant Development*, 263-270.

Llop-Tous, I., Domínguez-Puigjaner, E., Palomer, X., & Vendrell, M. (1999). Characterization of two divergent endo- β -1, 4-glucanase cDNA clones highly expressed in the nonclimacteric strawberry fruit. *Plant Physiology*, 119(4), 1415-1422.

Manning, K. (1998). Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta*, 205(4), 622-631.

Manning, K., (1993). Soft fruit. In: Seymour, G.B., Taylor, J.E., Tucker, G.A. (Eds.), *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman and Hall, Cambridge, UK, pp. 347-377.

Marín-Rodríguez, M. C., Orchard, J., & Seymour, G. B. (2002). Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2115-2119.

Marry, M., Roberts, K., Jopson, S. J., Huxham, I. M., Jarvis, M. C., Corsar, J., Robertson E. & McCann, M. C. (2006). Cell-cell adhesion in fresh sugar-beet root parenchyma requires both pectin esters and calcium cross-links. *Physiologia Plantarum*, 126(2), 243-256.

Matas, A.J., Rodríguez, V., Sánchez, L., Paniagua, C., Posé, S, García-Gago, J.A., Blanco-Portales, R., Muñoz-Blanco, J., Mercado, J.A. (2015). Down-regulation of a pectin acetyltransferase gene modifies strawberry fruit cell wall pectin structure and increases fruit firmness. *Current Research in Plant Physiology (XIV Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal)*. Ed. Fenoll, C. Escobar, M. Martín and M. Mena.1(1) pp. 320.

McCartney, L., Ormerod, A. P., Gidley, M. J., & Knox, J. P. (2000). Temporal and spatial regulation of pectic (1 \rightarrow 4)- β -d-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. *The Plant Journal*, 22(2), 105-113.

McFeeters, R. F., Bell, T. A., & Fleming, H. P. (1980). An endo-polygalacturonase in cucumber fruit 1. *Journal of Food Biochemistry*, 4(1), 1-16.

McNeil, M., Darvill, A. G., Fry, S. C., & Albersheim, P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual review of biochemistry*, 53(1), 625-663.

McQueen-Mason, S. J., & Cosgrove, D. J. (1995). Expansin mode of action on cell walls (analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding). *Plant Physiology*, 107(1), 87-100.

McQueen-Mason, S., & Cosgrove, D. J. (1994). Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(14), 6574-6578.

Medina-Escobar, N., Cárdenas, J., Moyano, E., Caballero, J. L., & Muñoz-Blanco, J. (1997). Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Molecular Biology*, 34(6), 867-877.

Mercado, J. A., Pliego-Alfaro, F., & Quesada, M. A. (2007). I. 12 Strawberry. Edited by T. Nagata (Managing Editor) H. Lörz, 309.

Mercado, J. A., Pliego-Alfaro, F., & Quesada, M. A. (2011). Fruit shelf life and potential for its genetic improvement. *Breeding for fruit quality*, 81-104.

Mercado, J. A., Trainotti, L., Jiménez-Bermúdez, L., Santiago-Doménech, N., Posé, S., Donolli, R., Barceló, M., Casadoro, G., Pliego-Alfaro, F. & Quesada, M. A. (2010). Evaluation of the role of the endo- β -(1, 4)-glucanase gene FaEG3 in strawberry fruit softening. *Postharvest Biology and Technology*, 55(1), 8-14.

Moctezuma, E., Smith, D. L., & Gross, K. C. (2003). Antisense suppression of a β -galactosidase gene (TB G6) in tomato increases fruit cracking. *Journal of experimental botany*, 54(390), 2025-2033.

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× ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. *Journal of experimental botany*, 64(6), 1471-1483.

Moore, J. N., Brown, G. R., & Brown, E. D. (1970). Comparison of factors influencing fruit size in large-fruited and small-fruited clones of strawberry. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 95, 827-31.

Morris, V. J., & Belton, P. S. (1982). Influence of the cations sodium, potassium and calcium on the gelation of iota-carrageenan. *Progress in Food and Nutrition Science*, 6, 55-66.

Morris, V. J., Gromer, A., & Kirby, A. R. (2009). Architecture of intracellular networks in plant matrices. *Structural Chemistry*, 20(2), 255-261.

Mort, A. J., Moerschbacher, B. M., Pierce, M. L., & Maness, N. O. (1991). Problems encountered during the extraction, purification, and chromatography of pectic fragments, and some solutions to them. *Carbohydrate Research*, 215(1), 219-227.

Nakamura, S., & Hayashi, T. (1993). Purification and Properties of an Extracellular Endo-1, 4-r β -Glucanase from Suspension-Cultured Poplar Cells. *Plant and Cell Physiology*, 34(7), 1009-1013.

Neal, G. E. (1965). Changes occurring in the cell walls of strawberries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 16(10), 604-611.

Nogata, Y., Ohta, H., & Voragen, A. G. J. (1993). Polygalacturonase in strawberry fruit. *Phytochemistry*, 34(3), 617-620.

Nogata, Y., Yoza, K. I., Kusumoto, K. I., & Ohta, H. (1996). Changes in molecular weight and carbohydrate composition of cell wall polyuronide and hemicellulose during ripening in strawberry fruit. *Progress in Biotechnology*, 14, 591-596.

Nunan, K. J., Davies, C., Robinson, S. P., & Fincher, G. B. (2001). Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta*, 214(2), 257-264.

Ohmiya, Y., Samejima, M., Shiroishi, M., Amano, Y., Kanda, T., Sakai, F., & Hayashi, T. (2000). Evidence that endo-1, 4- β -glucanases act on cellulose in suspension-cultured poplar cells. *The Plant Journal*, 24(2), 147-158.

Olias, J. M., Sanz, C., Rios, J. J., & Perez, A. G. (1995). Substrate specificity of alcohol acyltransferase from strawberry and banana fruits. In ACS symposium series (USA).

Osorio, S., Castillejo, C., Quesada, M. A., Medina-Escobar, N., Brownsey, G. J., Suau, R., Heredia, A., Botella, M.A. & Valpuesta, V. (2008). Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). *The Plant Journal*, 54(1), 43-55.

Palomer, X., Llop-Tous, I., Vendrell, M., Krens, F. A., Schaart, J. G., Boone, M. J., Van der Valk, H. & Salentijn, E. M. (2006). Antisense down-regulation of strawberry endo- β -(1, 4)-glucanase genes does not prevent fruit softening during ripening. *Plant Science*, 171(5), 640-646.

Paniagua, C., Blanco-Portales, R., Barceló-Muñoz, M., García-Gago, J. A., Waldron, K. W., Quesada, M. A., Muñoz-Blanco J. & Mercado, J. A. (2015). Antisense down-regulation of the strawberry β -galactosidase gene Fa β Gal4 increases cell wall galactose levels and reduces fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, erv462.

Paniagua, C., Posé, S., Morris, V. J., Kirby, A. R., Quesada, M. A., & Mercado, J. A. (2014). Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Annals of botany*, 114(6), 1375-1383.

Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., & York, W. S. (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The Plant Journal*, 20(6), 629-639.

Perkins-Veazie, P. (1995). Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural reviews*, 17(8), 267-297.

Perkins-Veazie, P., & Huber, D. J. (1987). Growth and ripening of strawberry fruit under field conditions. *Proceedings of the Florida State Horticulture Society*, 100 pp 253-256.

Picton, S., & Grierson, D. (1988). Inhibition of expression of tomato-ripening genes at high temperature. *Plant, Cell & Environment*, 11(4), 265-272.

Posé, S., García-Gago, J. A., Santiago-Doménech, N., Pliego-Alfaro, F., Quesada, 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.

Posé, S., Kirby, A. R., Mercado, J. A., Morris, V. J., & Quesada, M. A. (2012). Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydrate Polymers*, 88(3), 882-890.

Posé, S., Kirby, A. R., Paniagua, C., Waldron, K. W., Morris, V. J., Quesada, M. A., & Mercado, J. A. (2015). The nanostructural characterization of strawberry pectins in pectate lyase or polygalacturonase silenced fruits elucidates their role in softening. *Carbohydrate polymers*, 132, 134-145.

Posé, S., Paniagua, C., Cifuentes, M., Blanco-Portales, R., Quesada, M. A., & Mercado, J. A. (2013). Insights into the effects of polygalacturonase FaPG1 gene silencing on pectin matrix disassembly, enhanced tissue integrity, and firmness in ripe strawberry fruits. *Journal of experimental botany*, 64(12), 3803-3815.

Pressey, R., & Avants, J. K. (1973). Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. *Plant Physiology*, 52(3), 252-256.

Pressey, R., & Avants, J. K. (1975). Modes of action of carrot and peach exopolygalacturonases. *Phytochemistry*, 14(4), 957-961.

Pressey, R., & Avants, J. K. (1976). Pear polygalacturonases. *Phytochemistry*, 15(9), 1349-1351.

Pressey, R., & Reger, B. J. (1989). Polygalacturonase in pollen from corn and other grasses. *Plant science*, 59(1), 57-62.

Pua, E. C., Ong, C. K., Liu, P., & Liu, J. Z. (2001). Isolation and expression of two pectate lyase genes during fruit ripening of banana (*Musa acuminata*). *Physiologia Plantarum*, 113(1), 92-99.

Quesada, M. A., Blanco-Portales, R., Posé, S., García-Gago, J. A., Jiménez-Bermúdez, S., Muñoz-Serrano, A., Caballero, J.L., Pliego-Alfaro, F., Mercado, J.A. & Muñoz-Blanco, J. (2009). Antisense down-regulation of the FaPG1 gene reveals an unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening. *Plant Physiology*, 150(2), 1022-1032.

Redgwell, R. J., & Fischer, M. (2002). Fruit texture, cell wall metabolism and consumer perceptions. *Fruit quality and its biological basis*. Sheffield: Sheffield Academic Press, 46-88.

Redgwell, R. J., Fischer, M., Kendal, E., & MacRae, E. A. (1997a). Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta*, 203(2), 174-181.

Redgwell, R. J., MacRae, E., Hallett, I., Fischer, M., Perry, J., & Harker, R. (1997b). In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta*, 203(2), 162-173.

Redgwell, R. J., Melton, L. D., & Brasch, D. J. (1992). Cell Wall Dissolution in Ripening Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*): Solubilization of the Pectic Polymers. *Plant Physiology*, 98(1), 71-81.

Redgwell, R.J. & Fischer, M. (2001) Fruit texture, cell wall metabolism and consumer perceptions. In: *Fruit Quality and its Biological Basis* (ed. Knee, M.). CRC Press LLC, Boca Raton, FL

Redondo-Nevado, J., Moyano, E., Medina-Escobar, N., Caballero, J. L., & Muñoz-Blanco, J. (2001). A fruit-specific and developmentally regulated endopolygalacturonase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler). *Journal of Experimental Botany*, 52(362), 1941-1945.

Rhodes M.J.G. (1980). The maturation and ripening of fruits. In *Senescence in Plants* K. V. Thimann Press, Ed. Boca Raton FL: CRC Press, pp. 157-205.

Rose, J. K. (2003). The plant cell wall (Vol. 8). CRC Press.

Rose, J. K., & Bennett, A. B. (1999). Cooperative disassembly of the cellulose-xylloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science*, 4(5), 176-183.

Rose, J. K., Catalá, C., González-Carranza, Z. H., & Roberts, J. A. (2003). Cell wall disassembly. *Annual Plant Reviews*, 8, 264-324.

Rose, J. K., Hadfield, K. A., Labavitch, J. M., & Bennett, A. B. (1998). Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiology*, 117(2), 345-361.

Rose, J. K., Lee, H. H., & Bennett, A. B. (1997). Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(11), 5955-5960.

Rose, J.K., Saladié, M. and Catala, C. (2004) The plot thickens: new perspectives of primary cell wall modification. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 296–301.

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 Physiology and Biochemistry*, 42(10), 823-831.

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 Physiology and Biochemistry*, 47(4), 272-281.

Saladié, M., Matas, A. J., Isaacson, T., Jenks, M. A., Goodwin, S. M., Niklas, K. J., Xiaolin, R., Labavitch, J.M., Shackel, K.A., Fernie, A.R., Lytovchenko, A., O'Neill, M.A., Watkins C.B. & Rose, J. K. (2007). A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology*, 144(2), 1012-1028.

Salentijn, E. M., Aharoni, A., Schaart, J. G., Boone, M. J., & Krens, F. A. (2003). Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. *Physiologia Plantarum*, 118(4), 571-578.

Santiago-Doménech, N., Jiménez-Bemúdez, S., Matas, A. J., Rose, J. K., Muñoz-Blanco, J., Mercado, J. A., & Quesada, M. A. (2008). Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening. *Journal of experimental botany*, 59(10), 2769-2779.

Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Plant Biology*, 61(1), 263.

Senanayake, Y. D. A., & Bringham, R. S. (1967). Origin of *Fragaria* polyploids. I. Cytological analysis. *American Journal of Botany*, 221-228.

Sesmero, R., Mitchell, J. R., Mercado, J. A., & Quesada, M. A. (2009). Rheological characterisation of juices obtained from transgenic pectate lyase-silenced strawberry fruits. *Food Chemistry*, 116(2), 426-432.

Sesmero, R., Quesada, M. A., & Mercado, J. A. (2007). Antisense inhibition of pectate lyase gene expression in strawberry fruit: characteristics of fruits processed into jam. *Journal of Food Engineering*, 79(1), 194-199.

Seymour, G. B., Lasslett, Y., & Tucker, G. A. (1987). Differential effects of pectolytic enzymes on tomato polyuronides in vivo and in vitro. *Phytochemistry*, 26(12), 3137-3139.

Sheehy, R. E., Kramer, M., & Hiatt, W. R. (1988). Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(23), 8805-8809.

Sjulin, T. M. (2003). The North American small fruit industry 1903-2003. II. Contributions of public and private research in the past 25 years and a view to the future. *Hort Science*, 38(5), 960-967.

Smith, C. J. S., Watson, C. F., Ray, J., Bird, C. R., Morris, P. C., Schuch, W., & Grierson, D. (1988). Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes.

Smith, C. J., Watson, C. F., Morris, P. C., Bird, C. R., Seymour, G. B., Gray, J. E., Arnold, C., Tucker, G.A., Schuch, W., Harding, S. & Grierson, D. (1990). Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Molecular Biology*, 14(3), 369-379.

Smith, D. L., Abbott, J. A., & Gross, K. C. (2002). Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant physiology*, 129(4), 1755-1762.

Taylor NG (2008) Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. *New Phytologist* 178, 239-252

Tello-Marquina, J. C., Paez-Sánchez, J. I., Vega, J. M., Duhart, M. E., & González, L. (1996). Notas sobre el estado sanitario de los fresones españoles. *Horto Información*, 74, 23-25.

Tieman, D. M., & Handa, A. K. (1994). Reduction in pectin methylesterase activity modifies tissue integrity and cation levels in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits. *Plant Physiology*, 106(2), 429-436.

Tieman, D. M., Harriman, R. W., Ramamohan, G., & Handa, A. K. (1992). An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *The Plant Cell*, 4(6), 667-679.

Tigchelaar EC, McGlasson WB, Buescher RW. (1978). Genetic regulation of tomato fruit ripening. *HortScience*, 13, 508-513.

Trainotti, L., Spinello, R., Piovan, A., Spolaore, S., & Casadoro, G. (2001). β -Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 52(361), 1635-1645.

Trainotti, L., Spolaore, S., Pavanello, A., Baldan, B., & Casadoro, G. (1999). A novel E-type endo- β -1, 4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits. *Plant Molecular Biology*, 40(2), 323-332.

Tucker, G. A., Robertson, N. G., & Grierson, D. (1982). Purification and changes in activities of tomato pectinesterase isoenzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(4), 396-400.

Tucker, G. A., Schindler, C. B., & Roberts, J. A. (1984). Flower abscission in mutant tomato plants. *Planta*, 160(2), 164-167.

Tucker, G.A. and D. Grierson. (1987). Fruit ripening, p. 265-317. In: D.D. Davies (cd.). *The biochemistry of plants vol. 12*. Academic, New York.

Urbanowicz, B. R., Bennett, A. B., del Campillo, E., Catalá, C., Hayashi, T., Henrissat, B., Höfte, H., McQueen-Mason, S.J., Paterson, S.E., Shoseyov, O. & Rose, J. K. (2007). Structural organization and a standardized nomenclature for plant endo-1, 4- β -glucanases (cellulases) of glycosyl hydrolase family 9. *Plant Physiology*, 144(4), 1693-1696.

Van den Hoogen, B. M., Van Weeren, P. R., Lopes-Cardozo, M., van Golde, L. M., Barneveld, A., & van de Lest, C. H. (1998). A microtiter plate assay for the determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 257(2), 107-111.

Vicente, A. R., Saladie, M., Rose, J. K., & Labavitch, J. M. (2007). The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(8), 1435-1448.

Villarreal, N. M., Rosli, H. G., Martínez, G. A., & Civello, P. M. (2008). Polygalacturonase activity and expression of related genes during ripening of strawberry cultivars with contrasting fruit firmness. *Postharvest Biology and Technology*, 47(2), 141-150.

Vincken, J. P., Schols, H. A., Oomen, R. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G., & Visser, R. G. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant physiology*, 132(4), 1781-1789.

Wakabayashi, K. (2000). "Changes in Cell Wall Polysaccharides During Fruit Ripening." *Journal of Plant Research* 113 1111: pp 231-237.

Woodward, J. R. (1972). Physical and chemical changes in developing strawberry fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23(4), 465-473.

Woolley, L. C., James, D. J., & Manning, K. (2001). Purification and properties of an endo- β -1, 4-glucanase from strawberry and down-regulation of the corresponding gene, cel1. *Planta*, 214(1), 11-21.

Yang, S. F., Liu, Y., & Lau, O. L. (1985). Regulation of ethylene biosynthesis in ripening apple fruits. En, V International Symposium on Growth Regulators in Fruit Production 179 (pp. 711-720).

Yoshida, O., Nakagawa, H., Ogura, N., & Sato, T. (1984). Effect of heat treatment on the development of polygalacturonase activity in tomato fruit during ripening. *Plant and Cell Physiology*, 25(3), 505-509.

Youssef, S. M., Amaya, I., López-Aranda, J. M., Sesmero, R., Valpuesta, V., Casadoro, G., Blanco-Portales R., Pliego-Alfaro F., Quesada M.A. & Mercado, J. A. (2013). Effect of simultaneous down-regulation of pectate lyase and endo- β -1, 4-glucanase genes on strawberry fruit softening. *Molecular breeding*, 31(2), 313-322.

Youssef, S. M., Jiménez-Bermúdez, S., Bellido, M. L., Martín-Pizarro, C., Barceló, M., Abdal-Aziz, S. A., Caballero J.L., López-Aranda J. M, Pliego-Alfaro F., Muñoz J., Quesada M.A., Mercado J.A. (2009). Fruit yield and quality of strawberry plants transformed with a fruit specific strawberry pectate lyase gene. *Scientia Horticulturae*, 119(2), 120-125.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CAPÍTULO 9.

Anexos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Anexo I



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

RESEARCH PAPER

Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening

Nieves Santiago-Doménech¹, Silvia Jiménez-Bemúdez¹, Antonio J. Matas¹, Jocelyn K. C. Rose², Juan Muñoz-Blanco³, José A. Mercado¹ and Miguel A. Quesada^{1,*}

¹ Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain

² Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, NY 14850, USA

³ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain

Received 25 January 2008; Revised 20 April 2008; Accepted 21 April 2008

Abstract

Cell wall disassembly in softening fruits is a complex process involving the cumulative action of many families of wall-modifying proteins on interconnected polysaccharide matrices. One strategy to elucidate the *in vivo* substrates of specific enzymes and their relative importance and contribution to wall modification is to suppress their expression in transgenic fruit. It has been reported previously that inhibiting the expression of pectate lyase genes by antisense technology in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) fruit resulted in prolonged fruit firmness. This suggested that pectin depolymerization might make a more important contribution to strawberry fruit softening than is often stated. In this present study, three independent transgenic lines were identified exhibiting a greater than 90% reduction in pectate lyase transcript abundance. Analyses of sequential cell wall extracts from the transgenic and control fruit collectively showed clear quantitative and qualitative differences in the extractability and molecular masses of populations of pectin polymers. Wall extracts from transgenic fruits showed a reduction in pectin solubility and decreased depolymerization of more tightly bound polyuronides. Additional patterns of differential extraction of other wall-associated pectin subclasses were apparent, particularly in the sodium carbonate- and chelator-soluble polymers. In addition, microscopic studies revealed that the typical ripening-associated loss of cell–cell adhesion was substantially reduced in the transgenic fruits. These results indicate that

pectate lyase plays an important degradative role in the primary wall and middle lamella in ripening strawberry fruit, and should be included in synergistic models of cell wall disassembly.

Key words: Cell wall, *Fragaria*, fruit ripening, pectate lyase, pectinases, strawberry.

Introduction

The ripening of fleshy fruits is commonly accompanied by pronounced softening, which has been mechanistically linked with both enzyme-mediated (Brummell and Harpster, 2001; Brummell, 2006) and non-enzymatic (Dumville and Fry, 2003) cell wall degradation. Recent evidence suggests that ripening-related changes in fruit cell turgor pressure also have a critical influence on fruit firmness (Saladié *et al.*, 2007), but to date far more studies have focused on changes in wall composition, architecture, and associated wall-modifying proteins (Vicente *et al.*, 2007). A number of specific changes in wall structure appear common to most ripening fruits and a general model for cell wall disassembly can be widely applied. However, more detailed studies of wall metabolism have revealed clear examples of interspecific variability (Brummell and Harpster, 2001; Rose *et al.*, 2003). Some of these can be correlated with differences in the texture of the ripe fruit that can, for example, be classified as soft and melting, or crisp.

Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) is included in a group of fruits that develop a soft melting texture during growth and ripening. This coincides with numerous

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: quefe@uma.es

modifications of the primary cell wall and degradation of the middle lamella, including an increase in pectin solubilization, depolymerization of xyloglucan, and cell wall swelling (Redgwell *et al.*, 1997b; Koh and Melton, 2002). The swelling phenomenon in turn correlates *in vitro* with pectin metabolism and possibly loosening of the xyloglucan–cellulose network *in vivo* (Redgwell *et al.*, 1997b; Brummell, 2006). A number of other studies have reported particular aspects of wall restructuring in ripening strawberry fruit (e.g. Lara *et al.*, 2004; Rosli *et al.*, 2004) and, in addition to the widely reported increase in pectin solubilization, several have described hemicellulose depolymerization (Huber, 1984; Nogata *et al.*, 1996; Rosli *et al.*, 2004). It has been suggested that cellulose is not degraded during strawberry ripening and thus may not play a significant role in fruit softening (Koh *et al.*, 1997; Koh and Melton, 2002) and recent reports showed that the inhibition of several endoglucanase genes [from glycosyl hydrolase family 9 (GH9)] did not perceptibly affect fruit firmness (Woolley *et al.*, 2001; Palomer *et al.*, 2006). However, it should be noted that assays to evaluate cellulose levels have typically targeted only levels of crystalline cellulose and significant degradation of paracrystalline cellulose may occur (Rose *et al.*, 2003), which is much more difficult to measure. Moreover, the *in vivo* substrates of plant GH9 enzymes have still not been determined (Urbanowicz *et al.*, 2007) and the mismatch between substrates and enzyme activities in this case clearly complicates data interpretation.

By contrast, relatively more is known about the enzymology of ripening-related pectin modification and, as discussed by Koh and Melton (2002) and references herein, pectin solubilization can be ascribed to a range of different processes: pectin depolymerization; loss of calcium stabilized pectin gel structure (Knee *et al.*, 1977; Lara *et al.*, 2004); cleavage of linkages between pectins and hemicellulose (Nogata *et al.*, 1996); and disentanglement of pectin complexes following the hydrolysis of arabinan and possibly also galactan side chains (Redgwell *et al.*, 1997a; Trainotti *et al.*, 2001; Koh and Melton, 2002). Of these processes, pectin depolymerization has sometimes been considered of minor importance in ripening strawberry fruit, due to the limited degree of depolymerization compared with that seen in some other fruits, which is consistent with the low or undetectable polygalacturonase (PG) activity (Huber, 1984; Nogata *et al.*, 1996; Brummell, 2006). However, other studies have detected more substantial depolymerization of certain pectin fractions (Rosli *et al.*, 2004), and a recent paper described a soft-fruited strawberry cultivar (cv. Toyonaka) with high PG activity (Villareal *et al.*, 2007).

Another enzyme that may contribute to ripening-related pectin degradation is pectate lyase, which catalyses the cleavage of unesterified galacturonosyl linkages by a β -elimination reaction (Marín-Rodríguez *et al.*, 2002).

Several pectate lyase genes have been identified in different fruits, with expression patterns increasing during ripening (Domínguez-Puigjaner *et al.*, 1997; Medina-Escobar *et al.*, 1997; Nunan *et al.*, 2001), but in general far less is known about pectate lyase activity, localization, regulation, or contribution to pectinolysis than PG (Brummell and Harpster, 2001). It has been reported previously that inhibiting the expression of a strawberry pectate lyase gene by antisense transformation resulted in firmer fruits with an extended post-harvest shelf-life (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002). Three fruit-specific pectate lyase genes with similar expression patterns have been described (Benítez-Burraco *et al.*, 2003), and introduction of the antisense transgene resulted in the suppression of all three in ripe fruits (Benítez-Burraco *et al.*, 2003). This therefore represents a potentially valuable experimental system in which to better understand the contribution of pectate lyases to ripening-related pectin degradation. A preliminary study of the cell wall composition of the pectate lyase antisense fruits suggested a lower degree of cell wall swelling and possibly pectin solubilization (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002), but a detailed analysis of wall structure was not described. The goal of this present analysis was to extend the study and evaluate more fully the consequences of pectate lyase suppression on strawberry fruit cell wall architecture and, particularly, the pectin polymer network. Data are presented that support a role for pectate lyase in pectin depolymerization and solubilization in the cell wall and/or middle lamella, and it is suggested that these enzymes should be included in models of synergistic ripening-related cell wall disassembly.

Materials and methods

Plant material, growth conditions, and firmness measurements

Control, non-transformed strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch. cv. Chandler) plants and three independent transgenic pectate antisense lyase lines (Apel 14, Apel 23, and Apel 39; described in Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002) were grown in a screenhouse under natural light. Transgenic ripe fruits showed a strong reduction in pectate lyase mRNA levels, ranging from 90% in Apel 14 to 99% in Apel 23 and Apel 39. Fruits were harvested at different developmental stages [small green, G1; large green, G2; white, W; turning (meaning at least 25% surface red), T; totally red ripe fruit, R; and overripe fruit (ripe fruits stored 3 d at 25 °C in a growth chamber), OR], frozen in liquid nitrogen, and stored at –25 °C until used. Firmness was measured in fresh fruits using a hand penetrometer with 3.1 or 9.6 mm² end surface area cylindrical probes, puncturing twice, on opposite sides, per fruit. A minimum of 25 fruits per developmental stage was measured. Anthocyanin content was assayed in ripe fruits as previously described (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002) and expressed as the difference of absorbance between 530 nm and 657 nm per gram fresh weight.

Cell wall isolation

Cell walls from green (G2) or ripe (R) fruits were isolated according to Redgwell *et al.* (1992), with some minor modifications. Briefly,

10–15 fruits were powered in liquid nitrogen and 20 g homogenized in 40 ml of PAW (phenol:acetic acid:water, 2:1:1, w:v:v). The homogenate was centrifuged at 4000 g for 15 min and the supernatant filtered through Miracloth (Merck, Bioscience, Nottingham, UK). The pellet was resuspended in 20 ml of water and the supernatant recovered as above. This step was performed twice. All supernatants were combined and dialysed (mol. wt cut-off 8000) against distilled water for 5 d at 4 °C. After dialysis, the PAW extract was centrifuged at 23 000 g for 20 min, and the supernatant was concentrated in a rotary evaporator to ~5 ml, and finally freeze dried. This extract constitutes the PAW fraction. The residue from the first centrifugation, containing the cell wall material (CWM), was incubated overnight in 20 ml 90% DMSO to solubilize starch. The extract was then centrifuged at 4000 g, the pellet washed twice with 20 ml distilled water, and the CWM recovered after freeze drying. A minimum of three independent extractions per line and developmental stage were performed.

Cell wall fractionation

The CWM was sequentially extracted with water, 50 mM *trans*-1,2-diaminocyclohexane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (CDTA) in 50 mM sodium acetate (pH 6), followed by 100 mM Na₂CO₃ containing 0.1% NaBH₄ to provide pectin-enriched fractions, and then with 1 M KOH and 4 M KOH to generate hemicellulose-enriched fractions. The procedure was as follows: CWM from the three extractions was pooled and 90 mg was incubated overnight in 45 ml of distilled water on an orbital shaker. The extract was then centrifuged at 6000 g for 15 min and then the process was repeated with another 45 ml of water. The supernatants were combined, filtered through a GF/C (Whatman, UK) glass-fibre filter, and dialysed against water in the same conditions as described for PAW extract. After dialysis the extract was concentrated with a rotary evaporator and finally freeze dried. Water-insoluble residue was washed twice with distilled water and extracted with the next reagent, following the same procedure to obtain the CDTA-, Na₂CO₃-, and KOH-soluble fractions. At least three independent fractionations were performed per CWM sample.

The uronic acid (UA) content in the different fractions was estimated using the assay of Blumenkrantz and Asboe-Hansen (1973), as modified by Van den Hoogen *et al.* (1998), and total sugars by the orcinol-sulphuric method (Dubois *et al.*, 1956).

Anatomical sections of fruit parenchyma

Small cortical tissue fragments were obtained from ripe fruits of control and transgenic lines, a minimum of five independent fruits per genotype being processed. Cortical tissue corresponded to cylinders obtained from the zone of maximum diameter of the fruits. Tissue samples were fixed in Bouin reagent (Panreac Química, Spain) for 24 h and dehydrated in an increasing concentration series of ethanol:water to 95%. Embedding was performed in Histo-resin (Histo-resin Embedding Kit, Leica) following the manufacturer's instructions. When polymerized, 4-µm-thick sections were obtained with a microtome, mounted on glass slides, and stained with 0.2 g l⁻¹ ruthenium red for 2 h.

Size exclusion chromatography

A manually poured column (0.8×95 cm) of Sepharose CL-6B (Sigma-Aldrich Química SA, Spain) was used to fractionate the polymers presents in the PAW and water fractions. Gel medium was equilibrated with 0.2 M acetate buffer, pH 5, and cell wall extracts (10–14 mg) were dissolved in 1 ml buffer, loaded on the column, and eluted at 14 ml h⁻¹. Two millilitre fractions were collected and assayed for UA and total sugar contents. Similarly, manually poured columns (0.5×45 cm) of Sepharose CL-2B were

used to fractionate material in the CDTA, Na₂CO₃, and the two KOH fractions. In the case of the CDTA extract, gel medium was equilibrated in the same buffer as above, but for the other extracts the columns were equilibrated with TRIS-HCl 0.1 M buffer, pH 8.5. Samples were dissolved in equilibration buffer (6–8 mg ml⁻¹) and 200 µl loaded on the column, then eluted at a 14 ml h⁻¹ flow rate. One millilitre fractions were collected and assayed for UA and total sugar contents.

Neutral sugar composition of the polymers present in the 4 M KOH extract was determined by GC-MS of their alditol acetates following hydrolysis in 2 M trifluoroacetic acid as described in Fry (1988).

Statistical analyses

The SPSS software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for all the statistical analyses. Mean comparisons between control and transgenic samples were performed using a *t*-test, $\alpha=0.05$. When data did not fulfil the requirement for this parametric test, a Mann-Whitney *U*-test was employed to determine differences. Unless stated otherwise, data are presented as means and the bar represents standard deviations.

Results

Stability of the phenotype and ripening stage

Figure 1A shows the consistency and stability of the 'firmer fruit' phenotype that was previously reported for pectate lyase antisense transgenic strawberry lines (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002). During several growing seasons, transgenic fresh fruits were consistently significantly firmer than control fruits during ripening. The present study focused on the cell walls of red ripe (R) fruit at harvest and so special care was taken when sampling the fruits to avoid differences in ripening stage which might influence the results. Figure 1B shows the mean values for anthocyanin content, which was used to monitor ripening in control and transgenic fruits. Anthocyanin levels were similar in control and transgenic lines 23 and 39, and slightly higher in line 14, indicating that transgenic fruits sampled for cell wall analysis were harvested at equivalent ripening stages.

Cell wall yield and fractionation

Cell wall content (dry mass CWM) per 100 g of fruit fresh weight ranged from 0.92 g to 1.43 g. The highest value (transgenic line 23) was statistically different from the control ($P=0.95$) while the other two transgenic lines were similar to control fruits (average = 1.0±0.1 g per 100 g fresh fruit weight). Cell wall polymers were not only present in the CWM extract but were also detected in the PAW fraction, and so, after dialysis and drying, the content of this fraction was related to cell wall weight and presented together with the amounts of the different fractions that were sequentially extracted from the CWM (Fig. 2) The mean values of PAW contents were lower in the three transgenic lines and the differences were statistically significant for lines 23 and 39. A similar trend

was observed when the PAW contents were related to fresh fruit weight. This lower content of PAW fraction can be interpreted as reflecting lower solubilization of cell wall polymers in the transgenic fruits. In all the genotypes the PAW fraction polymer content was higher in red than

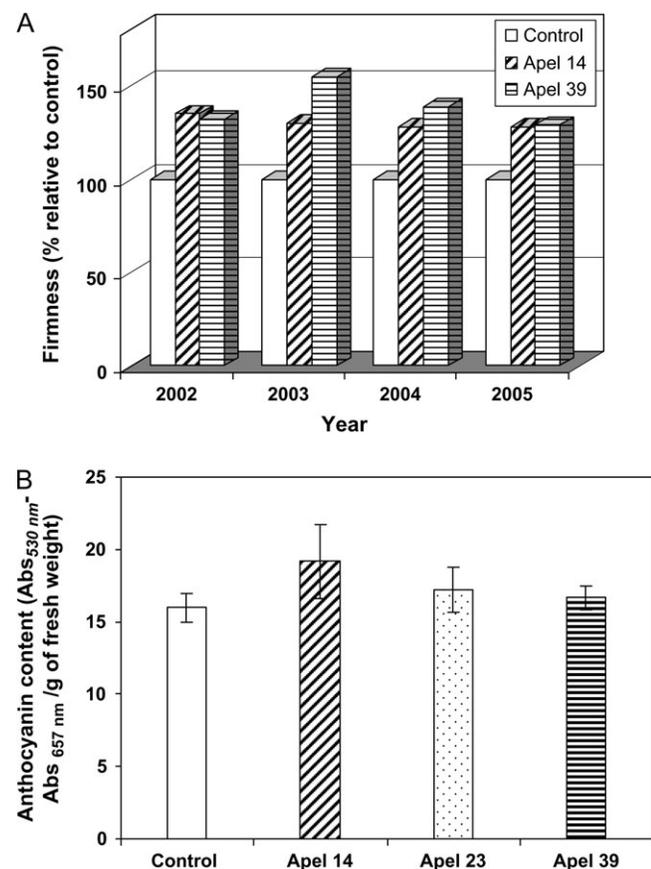


Fig. 1. Firmness and anthocyanin content of control and transgenic Apel fruits. (A) Firmness of control and transgenic fruits, Apel 14 and 39, at harvest in four growing seasons. (B) Anthocyanin contents of ripe fruits used for cell wall extraction and analysis. Measurements correspond to control and transgenic fruits from lines 14, 23, and 39.

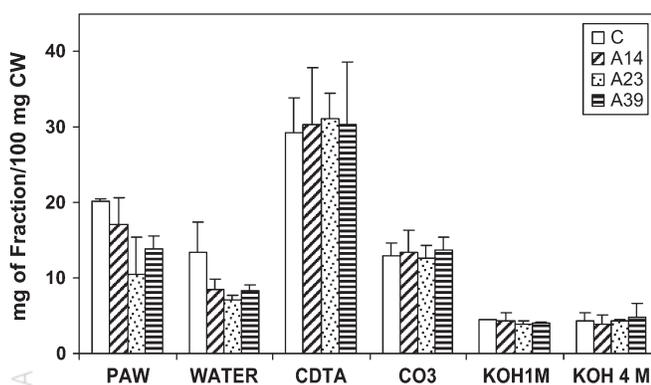


Fig. 2. Yield of fractions after sequential extraction of the cell wall material (CW) isolated from fruits of control (C) and transgenic Apel lines.

in green fruit, but the ripening-related increase was less in the transgenic lines (128%, 27%, and 142% for Apel lines 14, 23, and 39, respectively) than in the control fruit (427%), which further supports the idea of a lower solubilization in the transgenic fruits.

Figure 2 also shows the yield of the different CWM fractions. The pool of all the fractions obtained, including the remaining material after 4 M KOH extraction, represented on average $76 \pm 4\%$ (w/w) of the initial cell wall weight used for sequential extraction, suggesting low losses during processing. The most abundant fraction was the CWM solubilized with 50 mM CDTA. Statistical differences between control and the three transgenic lines were only observed for the water-extracted fraction, where the amount was higher from the control cell walls.

Pectin content and solubilization

In all the genotypes, the highest content of UA was found in the PAW extracts, with mean values lower for the three transgenic lines, although the differences were only statistically significant for line 23 (Fig. 3A). Among the various cell wall fractions, the highest UA levels were

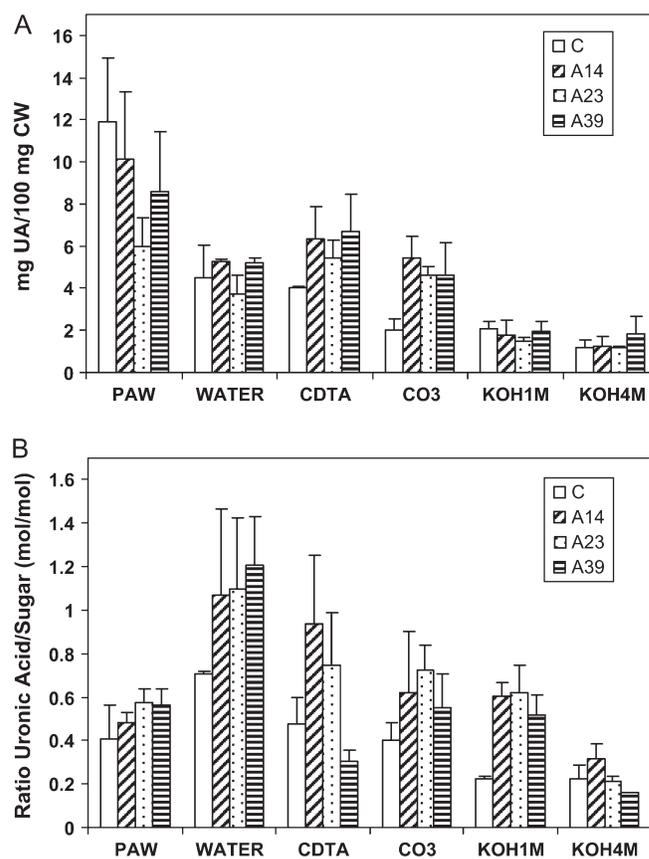


Fig. 3. (A) Uronic acid (UA) contents in PAW and other sequentially extracted fractions of the cell wall material (CW) isolated from control (C) and three independent transgenic Apel lines. (B) Ratio of UA relative to total sugar contents in these fractions.

present in the CDTA fraction and the lowest amounts in the 'hemicellulosic' 4 M KOH fraction. The amount of pectin (inferred from UA abundance) was significantly higher in the CDTA and sodium carbonate (CO₃) extracts from the cell wall of all three transgenic lines than from those of the control fruits (Fig. 3A). It is noteworthy that the weights of these two fractions were not quantitatively different between control and transgenic lines in Fig. 2. The ratio of more soluble (PAW+water fractions) to bound (CDTA+CO₃ fractions) pectins was significantly higher in the control (3.0) than the transgenic lines (1.8), and this difference was even higher if the soluble fraction was related to the covalently bound fraction (CO₃) alone (8.2 and 4.0 in control and transgenic lines, respectively). Total sugars were also measured in the different cell wall fractions but no significant differences were found between control and transgenic lines (results not shown). Interestingly, the UA/sugar ratios were higher for the three transgenic lines in PAW, water, CDTA, carbonate, and 1 M KOH fractions, indicating that the cell wall fractions were enriched with pectins in the case of transgenic fruits (Fig. 3B). The only exception to this trend was in the CDTA fraction of the Apel 39 line. Collectively, these results suggest a lower pectin solubilization in the transgenic Apel lines.

This interpretation of decreased pectin solubilization was supported by microscopic evidence (Fig. 4) since a denser pectin staining was observed between cells in cortical tissues from transgenic fruits than in control fruits. Additionally, fewer intercellular spaces were observed in the transgenic fruit tissues, whose cells showed greater cell adherence than those in sections from control fruit. This apparently greater cell to cell adhesion in the transgenic samples suggests a greater integrity of the pectin-rich middle lamella.

Analysis of the soluble fractions by gel permeation chromatography

The profiles of the pectic polymers present in the PAW and water fractions are shown in Fig. 5. Size exclusion chromatography revealed that the PAW-soluble polyuronides formed a main peak of polymers with molecular mass >500 kDa, together with a tail of lower molecular-

mass material extending throughout the separation range of the column. Comparisons of profiles from the three transgenic fruits with the control sample suggested a slight increase in the average molecular mass of the soluble pectin in the transgenic samples. A more symmetrical population of water-solubilized polymers eluted mostly between 100 ml and 180 ml in all the genotypes, with an average molecular mass that was clearly lower than those solubilized with PAW. The profiles appeared similar, although three distinct peaks were observed in the control sample between approximately 20 kDa and 80 kDa, which were not resolved in the transgenic lines. The majority of the water-solubilized polyuronides migrated with apparent masses of 20–50 kDa.

Analysis of the bound fractions by gel permeation chromatography

A CDTA solvent was used, ostensibly to extract polymers that were ionically bound to the cell wall, and the resulting polyuronide profiles for the different genotypes are shown in Fig. 6 (left side). Polymers eluted throughout much of the fractionation range of the column, with most exhibiting a mass in excess of 2000 kDa. The main difference between control and transgenic lines was the presence of a substantial peak of high molecular-weight material in the control line, which was not apparent in wall extracts from the transgenic fruits. Two additional peaks were present in the control fraction (eluting at 18 ml and 23 ml) that were not evident in lines 14, 23, and 39.

The profiles obtained for polyuronides solubilized with Na₂CO₃ (CO₃ fraction; Fig. 6, right side) showed the presence of a first peak eluting between 10 ml and 15 ml which corresponds to very high molecular-weight pectic polymers. The three transgenic lines showed a slight increase in the average molecular weight of this first peak and it was sharper and more pronounced in lines 14 and 23. A second group of pectic polymers (fractions eluting between 15 ml and 20 ml) was present in the three transgenic lines and essentially absent in the control, although a small shoulder was observed. The pool of polymers eluting between 20 ml and 30 ml represented at least 50% of the polyuronides present in this fraction and the profiles of the transgenic lines suggest that pectin processing is different in these fruits. It was observed that the CO₃ fractions from the transgenic fruit had peaks (resolved at 13 ml and 18 ml) that were not present in the control fruit CO₃ profiles, but that similarly eluting peaks were differentially present in the control fruit CDTA fraction. It should also be noted that in the CO₃ transgenic profiles the elution time of the first peak suggested a higher molecular mass. These observations could be conceptually related with a reduced pectin depolymerization as a result of pectate lyase silencing. To gain further support for this hypothesis, the pectin profiles of the CO₃ fraction were

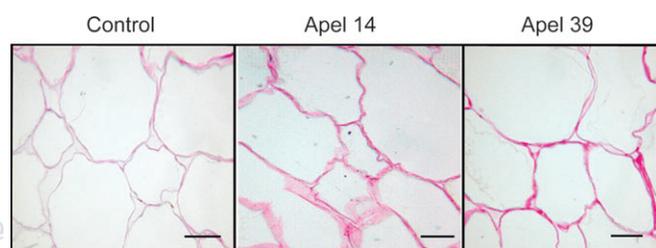


Fig. 4. Sections of cortical fruit tissue at the ripe stage of control and two independent transgenic lines, Apel 14 and 39, stained for pectin visualization. Bars represent 50 μ m.

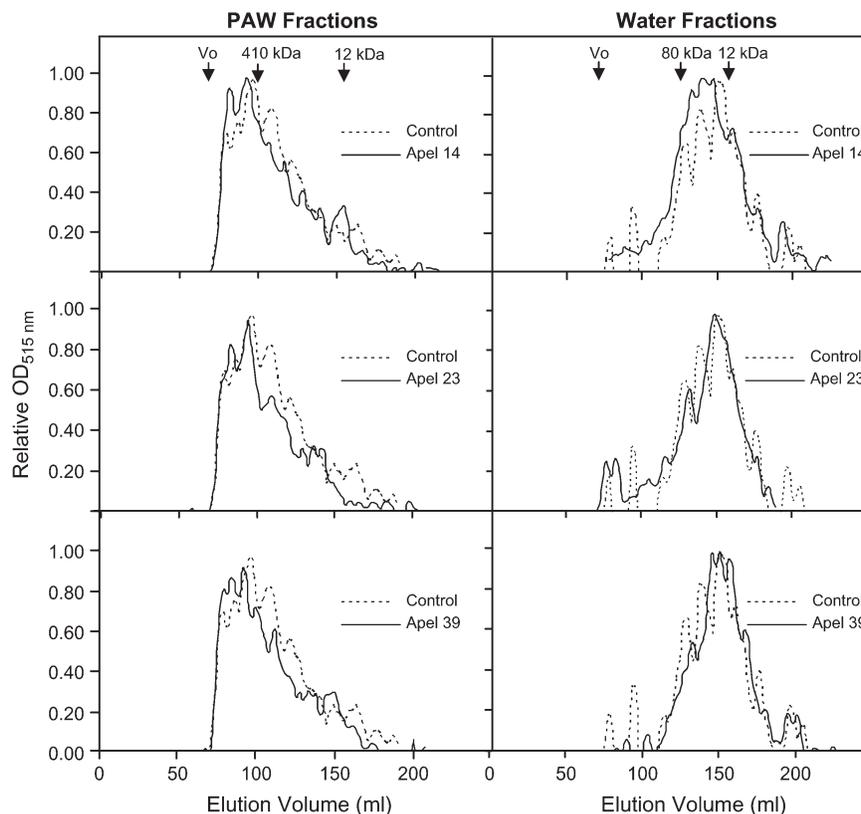


Fig. 5. Molecular mass profiles of polyuronides extractable by PAW and water from fruit cell walls of control and three independent Apel transgenic lines. Profiles were obtained by size exclusion chromatography on Sepharose CL-6B. Fractions were assayed for uronic acid content. Uronic acid content of the fractions was normalized to the maximum absorbance value obtained in each profile. Dextran standards were used for void volume determination and column calibration, as indicated by arrows on the figure.

analysed from green fruits collected prior to the decrease in firmness that occurs in the transition from green to white fruits (Fig. 7A). Increased fruit firmness was only observed in the transgenic fruits after this transition (Fig. 7B), and it was reasoned that the differences in cell wall must be minor at the green stage, and would not be related to the effects of the transgene, since the expression of the pectate lyases is ripening specific. The profiles obtained for the CO3 fractions from the cell wall of green fruits are shown in Fig. 8. The extracts from all four genotypes had two predominant populations of polyuronides, one of which eluted close to the first range mentioned for red fruits with a peak maximum at 10 ml, while the second of which comprised medium molecular-weight polymers. As expected, the profiles from the control and transgenic lines were similar, although line 39 had proportionally less high molecular-weight material. A comparison of the CO3 profiles from green fruits (Fig. 8) with those from red fruits (Fig. 6) revealed a reduction of the first peak (eluting between 8 ml and 12 ml) relative to the second (eluting between 18 ml and 30 ml) in both the control and transgenic lines 14 and 23 during ripening. However, these decreases were much more evident in extracts from the control fruits (50%) than from the transgenic lines

(12% and 9% for lines 14 and 23, respectively). Additionally, the profiles of cell walls obtained from red transgenic fruits showed the presence of a pool of polymers eluted between 15 ml and 20 ml that was absent in the control cell wall of red fruits (Fig. 6).

The KOH extracts were enriched in hemicellulose but also contained pectins, based on the levels of UA, and differences were observed in the UA/total sugar ratio between the control and the three transgenic lines (Fig. 3B). The profiles obtained for UA content in these two fractions in red fruits are shown in Fig. 9. The 1 M KOH profiles for control, line 14, and line 23 suggested relatively low amounts of residual polymers, but line 39 again exhibited different characteristics with significantly higher absorbance values and several well-defined peaks. Although the amount of pectin was low in the 4 M KOH fractions, the profiles indicated the presence of high molecular-weight polymers in the three transgenic lines that were absent in the control profile (10–13 ml and 18–20 ml elution volumes). These polymers may correspond to those observed in the CO3 fractions as they eluted in the same position.

Analyses of total sugar levels in the same fractions of the two KOH extracts (Fig. 10) revealed consistent

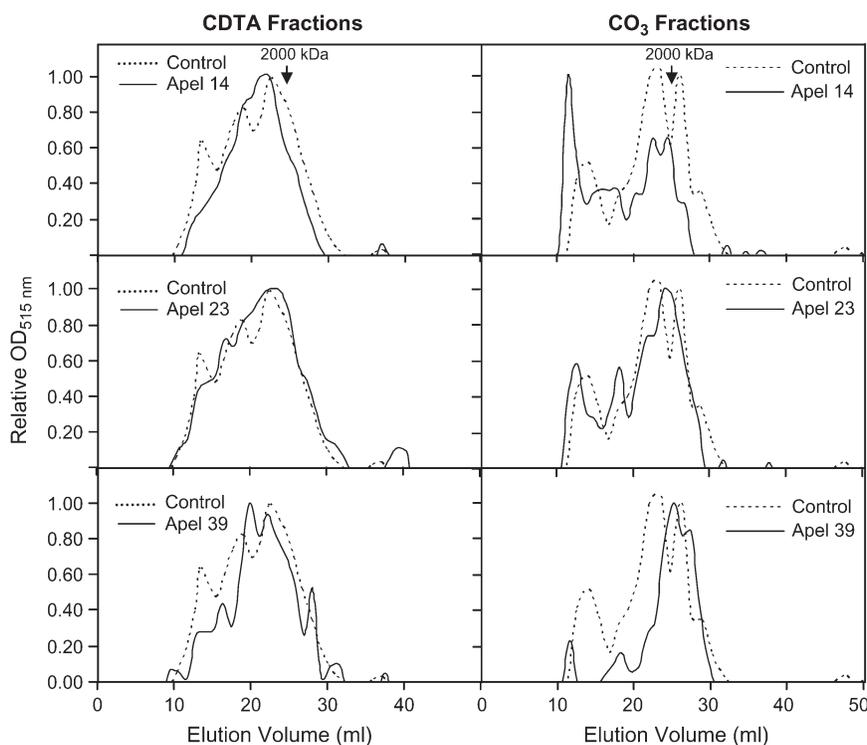


Fig. 6. Molecular mass profiles of polyuronides extractable by CDTA and sodium carbonate from fruit cell walls of control and three independent Apel transgenic lines. Profiles were obtained by size exclusion chromatography on Sepharose CL-2B. Fractions were assayed for uronic acid content. Uronic content of the fractions was normalized to the maximum absorbance value obtained in each profile. The elution volume for the blue dextran standard (2000 kDa) is shown on the figure.

quantitative differences in that the peak heights were lower in the transgenic lines. An analysis of TFA-hydrolysable neutral sugars in the 4 M KOH fraction by GC-MS showed that glucose, xylose, and rhamnose predominated (with a molar ratio of 6:2.5:1, respectively) suggesting, as expected, a substantial enrichment in xyloglucan, but also the presence of rhamnogalacturonan pectins.

Discussion

The goal of this study was to characterize the effects on the strawberry fruit cell wall of suppressing the expression of ripening-related pectate lyase, and to relate pectin metabolism to the previously reported prolonged fruit firmness of the transgenic fruits. A sequential series of solvents was used to obtain fractions enriched in pectins that differed in how readily they were extracted. This approach can indicate their relative affinity with the wall and middle lamella, and thus provide an indirect measure of pectin macromolecular disassembly. For example, PAW is considered a poor solvent for pectic polysaccharides (Fry, 1988) unless they have been solubilized by *in vivo* processes within the wall (Redgwell *et al.*, 1992, 1997b), while CDTA and sodium carbonate (CO₃) are typically used to enrich for pectins that are

ionically or covalently bound into the wall matrix, respectively.

The amount of material in the PAW fraction relative to the total cell wall was lower in all three transgenic lines, as was the UA content, although the ratio of UA:total sugars was not statistically different from the control fruit (Fig. 3). Additionally, the Apel lines showed less of a ripening-related increase in polysaccharide levels in the PAW fraction (Fig. 2) as well as an increase in average polymer size (Fig. 5). Similar results were obtained with the water-soluble fraction, which also contains more readily extractable polymers that interact relatively weakly with other cell wall components. The polyuronide molecular-weight profiles were similar in the control and transgenic profiles (Fig. 5), but the higher amount of material in the control water fraction (Fig. 2), which was pectin rich, based on the increased UA:total sugar ratio (Fig. 3), further suggests that pectins were less soluble from walls of the transgenic fruits.

Conversely, the CDTA and CO₃ fractions comprise polymers that show a greater wall association. Clear quantitative differences between control and transgenic fruits were observed in the CDTA-soluble ionically bound pectin fraction (Fig. 3). This fraction is believed to be particularly enriched in homogalacturonan pectin from the middle lamella (Redgwell *et al.*, 1992; Lara *et al.*, 2004)

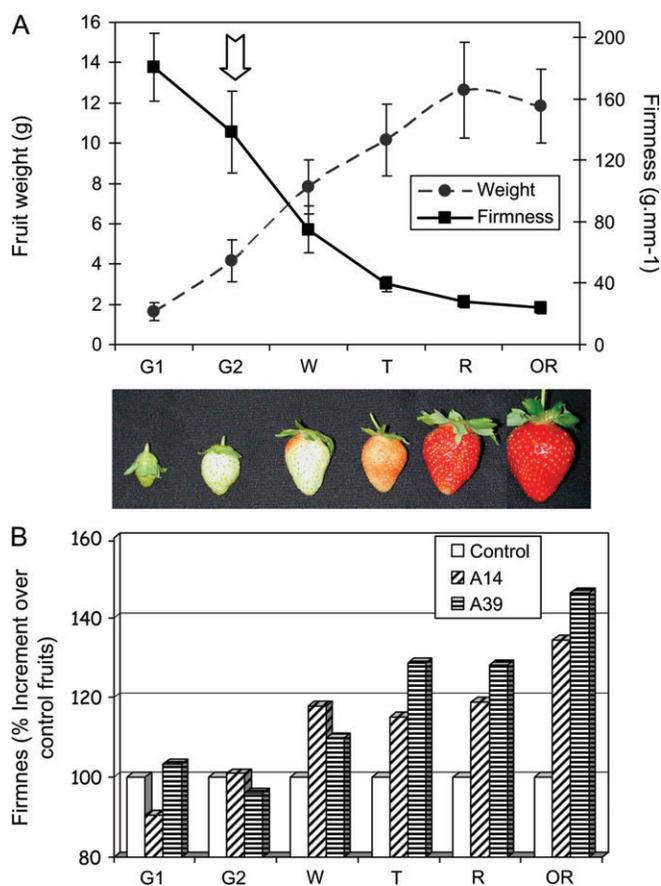


Fig. 7. Fruit weight and firmness of control and transgenic lines during fruit development. (A) Fruit weight and firmness of control fruits at different stages: small green, G1; large green, G2; white, W; turning (meaning at least 25% surface red), T; totally red ripe fruit, R; and overripe fruit (ripe fruits stored 3 d at 25 °C in a growth chamber, OR). (B) Effect of antisense down-regulation of pectate lyase on fruit firmness during these developmental stages. In this case, the values of firmness are expressed as a percentage of control untransformed fruits. The arrow indicates the stage after which differences between control fruits and the two transgenic lines become significant.

and, relative to control cell walls, the UA content of this fraction was on average 52% higher in the three transgenic lines. Microscopic analyses also suggested reduced degradation of the middle lamella in the transgenic fruits (Fig. 4). In a preliminary study of the Apel cell walls using a different extraction protocol, a lower amount of CDTA-soluble polyuronides had previously been found in one of the transgenic lines (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002). However, in that case, the starting material for the sequential extraction was an alcohol-insoluble residue, and it is likely that the chelator-soluble fraction contained pectins that were partitioned between the PAW and water fractions in the present study; hence the discrepancy.

Chromatographic analyses of the polyuronide populations in the CDTA and CO₃ fractions also suggested qualitative and quantitative differences between the control and transgenic fruits. The levels of high molecular-

weight polymers in the CO₃ fraction were substantially higher in Apel 14 and somewhat greater in the other two transgenic lines, and as described in Results, some peaks were differentially seen in the CDTA and CO₃ profiles. For example, the CDTA control fruit extract had a profile with two peaks of high molecular-mass polymers (elution volumes 13 ml and 18 ml), which were diminished or absent in the transgenic profiles. However, peaks at similar elution volumes were extracted with Na₂CO₃ (Apel 14, Apel 23, and partially in Apel 39) or 4 M KOH (Apel 39). This suggests differential processing of the pectic polymers in the transgenic lines resulting in a lower solubilization of the highest molecular-mass group of polymers.

The substantial quantitative and qualitative changes in the various cell wall fractions found to occur in Na₂CO₃- and KOH-solubilized fractions lead to the proposal of a model whereby pectate lyase silencing leads to decreased depolymerization of the strongly bound pectins fractions, alters the interactions between various components of the pectic matrix, and increases the solubility of a subset of pectins. This may be either a direct consequence of reducing pectate lyase activity, or also indirectly by altering the action of other pectinolytic enzymes, such as PG and pectin methylesterase, for example by influencing access to their substrates. It is also noted that polyuronide accumulation continues during strawberry fruit ripening (Huber, 1984), and so it is possible that suppressing pectate lyase expression could affect wall composition and architecture by perturbing normal wall assembly. Immunolocalization studies have suggested that pectate lyase proteins are present in the primary walls of strawberry receptacle parenchyma cells (Benítez-Burraco *et al.*, 2003), but the microscopy results shown here (Fig. 4) indicate that degradation of the middle lamella is significantly reduced in the transgenic fruits, which suggests that this is also the site of pectate lyase action. Moreover, a recent study of cell-cell adhesion in root parenchymatous tissue suggested that Na₂CO₃-soluble pectic polymers play an important role (Marry *et al.*, 2006), which is congruent with the reduced depolymerization and solubilization of this wall fraction in the transgenic strawberry lines.

The cell wall analyses also suggested a decreased content of hemicelluloses in the three transgenic lines in the 1 M KOH fractions, which according to sugar composition analysis was likely to be rich in xyloglucan, and a similar decrease and reduction in polymer average molecular weight in the 4 M KOH fractions. It is not immediately obvious why suppressing the expression of a pectinase would affect the xyloglucan polymer profile; however, there are precedents for such pleiotropic effects (e.g. Brummell *et al.*, 1999). Such results underline the complexity of wall metabolism, the cooperative action of wall-modifying enzymes and the interactions that exist

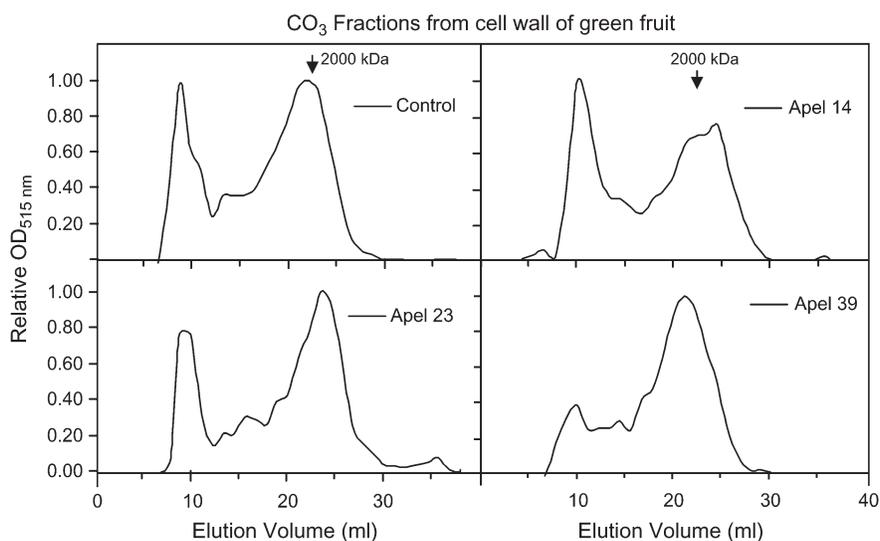


Fig. 8. Molecular mass profiles of polyuronides extractable by sodium carbonate from cell walls of control and transgenic green fruits. Profiles were obtained by size exclusion chromatography on Sepharose CL-2B. Fractions were assayed for uronic acid content. Uronic content of the fractions was normalized to the maximum absorbance value obtained in each profile. The elution volume for the blue dextran standard (2000 kDa) is shown on the figure.

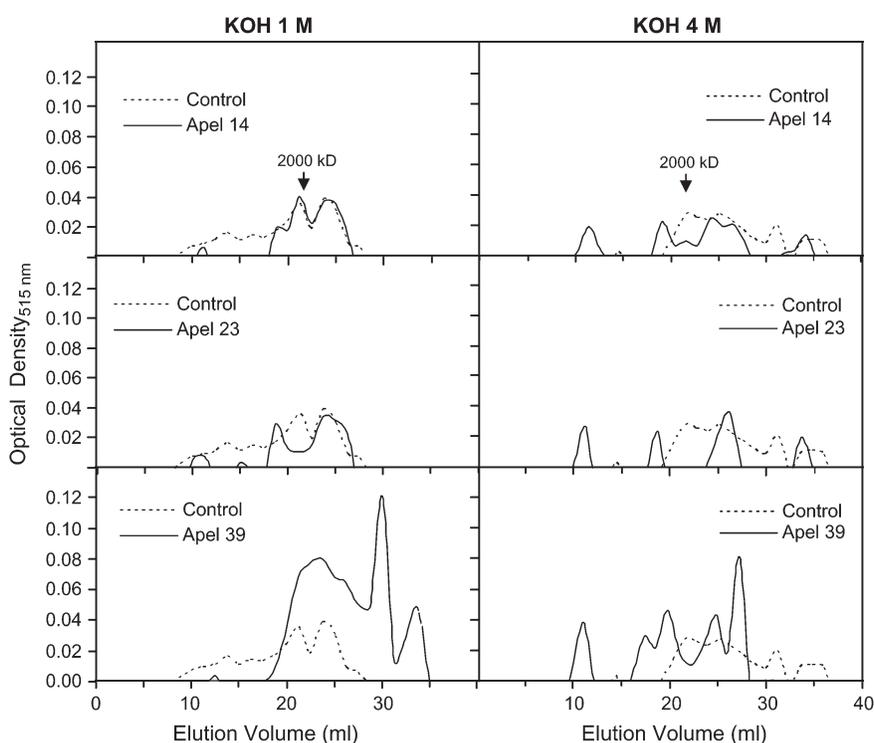


Fig. 9. Molecular mass profiles of polyuronides extractable by 1 M and 4 M KOH from fruit cell walls of control and three independent Apel transgenic lines. Profiles were obtained by size exclusion chromatography on Sepharose CL-2B. Fractions were assayed for uronic acid content and presented as optical density values at 515 nm. The elution volume for the blue dextran standard (2000 kDa) is shown on the figure.

between the major cell polysaccharide networks (Rose and Bennett, 1999; Vicente *et al.*, 2007).

In summary, it has been demonstrated that the increased firmness of three independent transgenic lines of strawberry fruit exhibiting strong suppression of pectate lyase

genes is correlated with consistent differences in pectin metabolism, polymeric interactions, and cell-cell adhesion. These results, as well as those reported by Rosli *et al.* (2004) and Villareal *et al.* (2007), suggest that enzymes involved in pectin depolymerization play a more

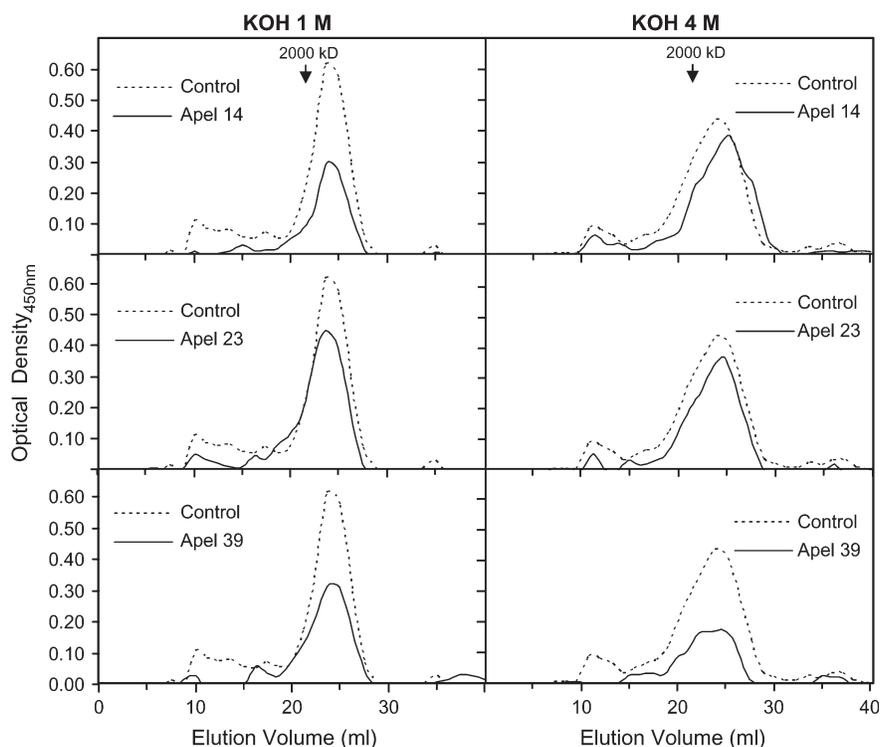


Fig. 10. Molecular mass profiles of cell wall polymers extractable by 1 M and 4 M KOH from fruit of control and three independent Apel transgenic lines. Profiles were obtained by size exclusion chromatography on Sepharose CL-2B. Fractions were assayed for total sugar content and presented as optical density values at 450 nm. The elution volume for the blue dextran standard (2000 kDa) is shown on the figure.

significant role in strawberry fruit softening than previously appreciated. Furthermore, this study emphasizes that pectate lyase, although far-less studied than other pectinolytic enzymes such as PG and pectin methylesterase, is an important member of the likely synergistic suite of pectinases that contribute to cell wall disassembly.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and Feder EU Funds (grant reference: AGL2005-08128). The authors thank Dr Fernando Pliego-Alfaro for his kind support and suggestions during research work and preparation of the manuscript. We thank Dr Jose M López-Aranda (IFAPA, Centro de Churriana, Málaga, Spain) for his support and advice on growing the plants. We thank Mari C Molina for her work in plant growth and maintenance.

References

- Benítez-Burraco A, Blanco-Portales R, Redondo-Nevado J, Bellido ML, Moyano E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J. 2003. Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria×ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *Journal of Experimental Botany* **54**, 633–645.
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* **41**, 1392–1395.
- Brummell DA. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* **33**, 103–119.
- Brummell DA, Harpster MH. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **47**, 311–340.
- Brummell DA, Harpster MH, Civello PM, Palys JM, Bennett AB, Dunsmuir P. 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *The Plant Cell* **11**, 2203–2216.
- Domínguez-Puigjaner E, Llop I, Vendrell M, Prat SA. 1997. cDNA clone highly expressed in ripe banana fruit shows homology to pectate lyases. *Plant Physiology* **114**, 1071–1076.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Biochemistry* **28**, 350–356.
- Dumville JC, Fry SC. 2003. Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymatic mechanism of fruit softening. *Planta* **217**, 951–961.
- Fry SC. 1988. *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*. Caldwell, NJ: The Blackburn Press.
- Huber DJ. 1984. Strawberry fruit softening – the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *Journal of Food Science* **49**, 1310–1315.
- Jiménez-Bermúdez S, Redondo-Nevado J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL, López-Aranda JM, Valpuesta V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA. 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiology* **128**, 751–759.
- Knee M, Sargent JA, Osborne DJ. 1977. Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany* **28**, 377–396.

- Koh TH, Melton LD.** 2002. Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biology and Technology* **26**, 23–33.
- Koh TH, Melton LD, Newman RH.** 1997. Solid-state ^{13}C NMR characterization of cell walls of ripening strawberries. *Canadian Journal of Botany* **75**, 1957–1964.
- Lara I, García P, Vendrell M.** 2004. Modifications in cell wall composition after cold storage of calcium-treated strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* **34**, 331–339.
- Marín-Rodríguez MC, Orchard J, Seymour GB.** 2002. Pectate lyase, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2115–2119.
- Marry M, Roberts K, Jopson SJ, Huxham IM, Jarvis MC, Corsar J, Robertson E, McCann MC.** 2006. Cell-cell adhesion in fresh sugar-beet root parenchyma requires both pectin esters and calcium-links. *Physiologia Plantarum* **126**, 243–256.
- Medina-Escobar N, Cárdenas J, Moyano E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J.** 1997. Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Molecular Biology* **34**, 867–877.
- Nogata Y, Yosa K, Kusumoto K, Ohta H.** 1996. Changes in the molecular weight and carbohydrate composition of cell wall polyuronide and hemicellulose during ripening in strawberry fruit. In: Visser J, Voragen AGJ, eds. *Pectins and pectinases*. Amsterdam: Elsevier Science, 591–596.
- Nunan KJ, Davies C, Robinson SP, Fincher GB.** 2001. Expression patterns of cell wall modifying enzymes during grape berry development. *Planta* **214**, 257–264.
- Palomer X, Llop-Tous I, Vendrell M, Krens FA, Schaart JG, Boone MJ, van der Valk H, Salentijn EMJ.** 2006. Antisense down-regulation of strawberry endo-[beta]-(1,4)-glucanase genes does not prevent fruit softening during ripening. *Plant Science* **171**, 640–646.
- Redgwell RJ, Fischer M, Kendall E, MacRae EA, Perry J, Harker R.** 1997a. Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* **203**, 174–181.
- Redgwell RJ, MacRae EA, Hallett I, Fischer M, Perry J, Harker R.** 1997b. *In vivo* and *in vitro* swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta* **203**, 162–173.
- Redgwell RJ, Melton LD, Brasch DJ.** 1992. Cell-wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) – solubilization of the pectic polymers. *Plant Physiology* **98**, 71–81.
- Rose JKC, Bennett AB.** 1999. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science* **4**, 176–183.
- Rose JKC, Catalá C, Gonzalez-Carranza ZH, Roberts JA.** 2003. Cell wall disassembly. In: Rose JKC, ed. *The plant cell wall*. *Annual Plant Reviews*, vol. 8. Oxford: Blackwell Publishing, 264–324.
- Rosli HG, Civello PM, Martínez GA.** 2004. Changes in cell wall composition of three *Fragaria×ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 823–831.
- Saladié M, Matas AJ, Isaacson T, et al.** 2007. A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology* **144**, 1012–1028.
- Trainotti L, Spinello R, Piován A, Spolaore S, Casadoro G.** 2001. β -Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1635–1645.
- Urbanowicz BR, Bennett AB, Catalá C, et al.** 2007. Structural organization and a standardized nomenclature for plant endo-1,4- β -glucanases of glycosyl hydrolase family 9. *Plant Physiology* **144**, 1693–1696.
- Van den Hoogen BM, van Weeren PR, Lopes-Cardozo M, van Golde LMG, Barneveld A, van de Lest CHA.** 1998. A microtiter plate assay for the determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* **257**, 107–111.
- Vicente AR, Saladié M, Rose JKC, Labavitch JM.** 2007. The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**, 1435–1448.
- Villareal NM, Rosli HG, Martínez GA, Civello PM.** 2007. Polygalacturonase activity and expression of related genes during ripening of strawberry cultivars with contrasting fruit firmness. *Postharvest Biology and Technology* **47**, 141–150.
- Woolley LC, James DJ, Manning K.** 2001. Purification and properties of an endo-beta-1,4-glucanase from strawberry and down regulation of the corresponding gene, Cel 1. *Planta* **214**, 465–473.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



XV REUNIÓN DE LA
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
FISIOLOGÍA VEGETAL

&

VIII CONGRESO
HISPANO - LUSO

Palma de Mallorca
16 - 20 Septiembre 2003

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Estudio comparativo de metodologías de extracción y fraccionamiento de paredes de frutos de fresa

Santiago-Doménech N, Sesmero R, Jiménez-Bermúdez S, Mercado JA, Quesada MA
Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n 29071
Málaga, España

El procesamiento de la pared de los frutos constituye una parte esencial de su proceso de maduración. En el caso de la fresa, estos cambios son muy importantes llegando el fruto a adquirir una estructura semilíquida, siendo la desaparición de las pectinas de la lámina media una de las causas. El seguimiento de los cambios que ocurren en la pared durante la maduración y, en concreto, en su fracción péctica son esenciales para caracterizar adecuadamente este proceso. Los estudios previos en fresa utilizan protocolos distintos que dan lugar a fracciones que no siempre son fáciles de comparar. El objetivo de nuestro trabajo ha sido el comparar extracciones previamente utilizadas en frutos de fresas en nuestro material (Cv Chandler) para ver coincidencias y diferencias y poder elegir la más adecuada. En segundo lugar se ha iniciado la caracterización por filtración en gel de las fracciones obtenidas en estas extracciones.

Hemos trabajado con frutos de fresa en estado rojo y el material se ha extraído siguiendo los protocolos de Redgwell et al. (1992), y Huber et al. (1993). Hemos probado también una modificación de la propuesta de Huber, incluyendo una filtración previa a la suspensión en etanol al 80%, con el fin de obtener una fracción de pectinas solubles comparable a la que obtiene Redgwell en el lavado inicial del tejido.

La cantidad de residuo de pared obtenida por gramo de fruto fue de 7 a 8 mg de pared, en el mismo rango que lo obtenido previamente por otros autores. Sin embargo, la modificación que introdujimos dificultó la extracción obteniéndose tan sólo 2.7 mg/g, debido a filtraciones que provocaron pérdidas de material. Por tanto, esta modificación complica mucho la extracción. Los ácidos urónicos presentes en los residuos de pared fueron similares en las extracciones de Huber y Redgwell superando los 200 µg/mg (µg de ácidos urónicos por mg de pared) e inferior en la modificada (155µg/mg). En nuestro caso, la fracción denominada PAW (soluble en Fenol-Acético y Agua) obtenida en el protocolo de Redgwell alcanzó los 1.51 mg/g de fruto y la fracción correspondiente de la versión modificada de Huber 1.29. La cantidad de ácidos urónicos en el primer caso fue inferior a la obtenida por otros autores previamente en fresa, mientras que estuvo en el mismo orden en el caso de la modificación. En los tres protocolos, el residuo seco de la pared se siguió extrayendo mediante la adición de agua, CDTA (quelante de calcio) y carbonato sódico. En el caso del protocolo de Huber, la cantidad de residuo obtenido en la fracción extraída con agua es mayor, probablemente debido al hecho de que este protocolo no incluye el paso previo de los otros dos casos anteriores. En los tres casos, la fracción cuantitativamente más importante fue la de CDTA, seguida de la extraída con carbonato sódico, ambas suponen más del 65% del total de la pared. La fracción de CDTA fue la que presenta una mayor cantidad de ácidos urónicos, que también fueron elevados en la fracción extraída con agua con el método de Huber. Hemos iniciado la caracterización de estas fracciones en las columnas de filtración en gel.

Podríamos decir que cualquiera de los dos protocolos, el de Redgwell o el de Huber podría sernos útiles, ya que los porcentajes obtenidos son muy similares en cuanto a peso de fracciones y cantidad de poliuronidos. La modificación probada quedaría descartada.

R.J. Redgwell et al. *Plant Physiol.* (1992) 98:71-81

D.J. Huber et al. *Plant Physiol.* (1993) 102: 473-480

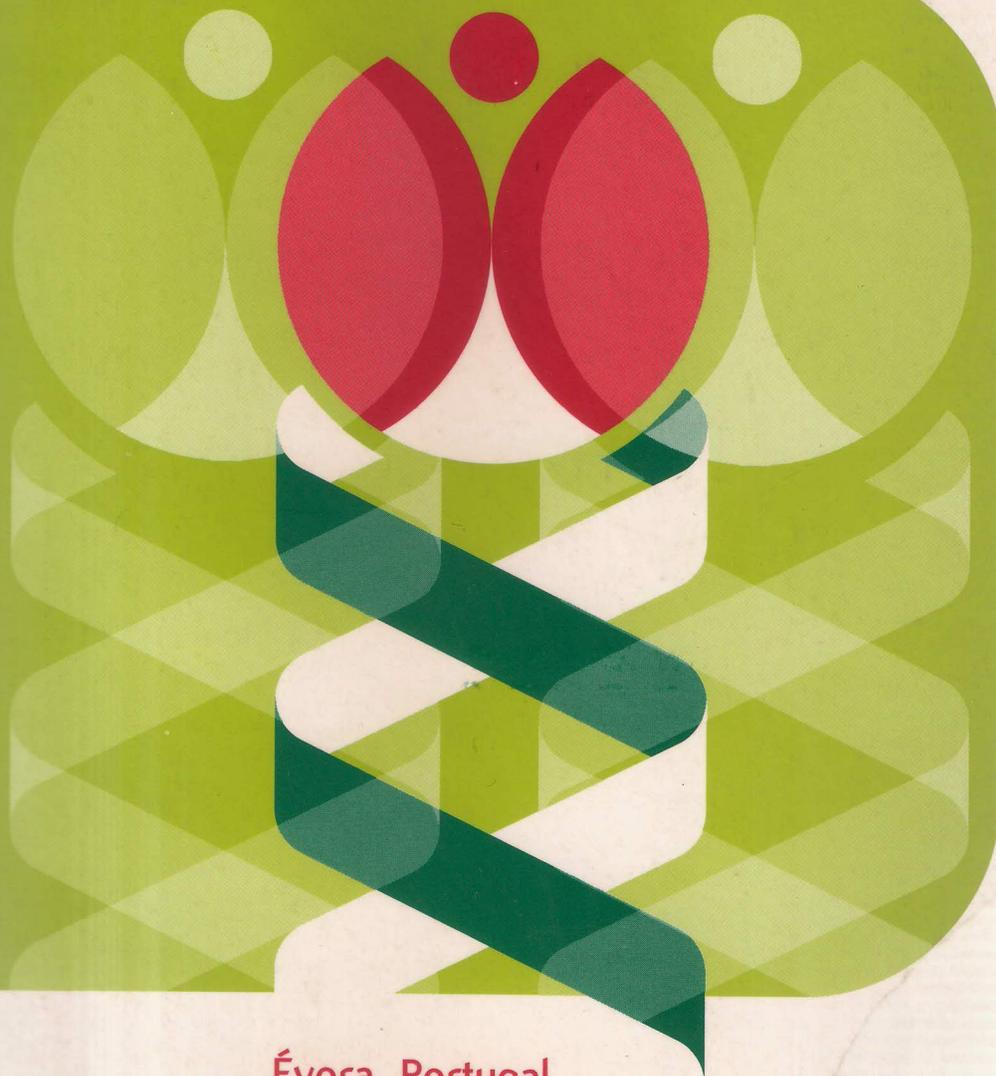




UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

IX | Congresso Luso Espanhol
De Fisiologia Vegetal

XVI | Reunión Nacional de la Sociedad
Española de Fisiología Vegetal



Évora, Portugal
18-21 Setembro 2005

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE LA PECTATO LIASA EN LAS PECTINAS EXTRAIDAS DE FRUTO MADURO DE FRESA

Santiago-Doménech N. , Mercado J.A., Matas A.J., Quesada M.A.

Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal). Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga, España.

El fruto de fresa sufre un importante reblandecimiento durante su maduración. Parece que la solubilización y/o despolimerización de las pectinas de la pared celular pueden ser las causas del fenómeno, aunque la evidencia experimental es escasa. En el presente trabajo evaluamos de que modo el silenciamiento del gen pectato liasa afecta ambos procesos. En plantas con el gen silenciado se ha comprobado que existe un incremento en la firmeza de los frutos transgénicos con respecto al control en estadio rojo (Jiménez-Bermúdez et al, 2002, Plant physiology, Vol 128: 751-759). El análisis realizado de la solubilización y del tamaño de los polímeros pécticos de la pared celular está basado en protocolos previos optimizados para nuestro material.

Los resultados obtenidos indican una menor solubilización de la pared en las plantas transgénicas debido a que las fracciones más fácilmente extraíbles (la fracción fenol/acético/agua (PAW) y la fracción agua) representan un mayor porcentaje en las plantas control que en las transgénicas. Ello es indicativo de una mayor solubilización de la pared en las plantas control.

El análisis de la despolimerización se realizó por cromatografía de filtración en gel. En la fracción de pectinas más soluble tanto PAW como agua, el tamaño de los polímeros han sido similares en controles y transgénicos.

En la fracción de pectinas unidas por enlace iónico (fracción CDTA) no se observan tampoco diferencias significativas en cuanto a tamaño de las pectinas. Sin embargo, en las pectinas unidas covalentemente (extraídas mediante tratamiento con carbonato) se observa una menor despolimerización en el caso de las plantas transgénicas.

La evidencia en este sentido apunta la posibilidad de que en el caso de la fresa y en lo que se refiere a la actuación de pectato liasa es posible que la despolimerización de las pectinas juegue un papel significativo en la solubilización de la pared celular, a diferencia de lo que se ha observado en otros sistemas experimentales.





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA