

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA ENZIMA DE LA
PARED CELULAR XILOGLUCANO
ENDOTRANSGLUCOSILASA

EVA MIEDES VICENTE

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 20 de Juliol de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Juan Segura García del Ríó
- D. José Luis Acebes Arranz
- D. Juan Carlos Cabrera Pino
- D^a. Aida González Díaz
- D^a. María Gloria Revilla López

Va ser dirigida per:

D^a. Esther Pérez Lorences

©Copyright: Servei de Publicacions
Eva Miedes Vicente

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6950-0

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT  VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL

**Caracterización funcional
de la enzima de la
pared celular xiloglucano
endotransglucosilasa**

EVA MIEDES VICENTE

VNIVERSITAT E VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL



**Caracterización funcional
de la enzima de la
pared celular xiloglucano
endotransglucosilasa**

Memoria que se presenta para optar al grado de
Doctora en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por

EVA MIEDES VICENTE

2007

III

ESTER PÉREZ LORENCES, CATEDRÁTICA DE FISIOLOGÍA
VEGETAL DE LA UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

CERTIFICO:

Que la Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y en Biología, Dña. Eva Miedes Vicente, ha realizado bajo mi dirección el trabajo "*Caracterización funcional de la enzima de la pared celular xiloglucano endotransglucosilasa*", en el Departamento de Biología Vegetal de la Universitat de València, el cual presenta para optar al grado de Doctora en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Y para que así conste, extendiendo el presente certificado en Valencia, a 4 de Junio de 2007.

Ester Pérez Lorences
V

A MIS PADRES, FAMILIA Y AMIG@S

Un ladrillo más en la pared...

AGRADECIMIENTOS

* Agradezco la dirección de esta Tesis a Dña. Ester Pérez Lorences, Catedrática de Fisiología Vegetal de la Universitat de València.

* Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos de investigación:

- GV-D-AG-011-153-96.
- Ministerio de Ciencia y Tecnología: MCYT-BOS2001-2755.
- Ministerio de Educación y Ciencia: BFU2005-08770-C02.
- Consellería de Cultura, Educación y Ciencia. Generalitat Valenciana: Grupos 03/102.

* Agradezco la concesión de la beca de investigación predoctoral a la Generalitat Valenciana: CTBPRB/2002/377.

* Las estancias en centros foráneos fueron posibles gracias a la financiación de la Generalitat Valenciana:

- Estancia Santiago de Compostela 2004: CTESPRR/2004/044.
- Estancia Osaka (Japón) 2005: CTESPRR/2005/013.
- Estancia Santiago de Compostela 2006: AEF106/041.

* Agradezco el apoyo de los grupos de investigación donde se realizaron las estancias:

- Al grupo de Pared Celular, de la Universidad de Santiago de Compostela dirigido por el Dr. Ignacio Zarra, a la Dr. Gloria Revilla y a todo el equipo.
- Al grupo de Biología Celular, de Osaka City University (Osaka, Japón) dirigido por el Prof. Takayuki Hoson, al Dr. Kouichi Soga y a todo el equipo.

* Agradezco la cesión de las semillas de las plantas de tomate Money Maker silvestres y transgénicas al Dr. Sonnewald y a la Dra. Herbers, del Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) de Gatersleben (Alemania).

* Agradezco el apoyo a:

- Los grupos de investigación del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad Farmacia, Universitat de València.
- Al Servicio de Secuenciación y muy notablemente al servicio de Invernadero, del SCSIE.
- A la Colección Española de Cultivos Tipo.
- Al Dr. Juan Carlos Cabrera Pino, Laboratorio de Oligosacarinas, Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas en Cuba y al Dr. José Miguel Bernardo del Dpto. de Estadística Operativa de la Universitat de València.
- A los técnicos superiores de apoyo a la investigación: Natalia Alepuz, Chelo Baldo y M^a José Renart.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

* A mi FAMILIA. A mis PADRES que me enseñaron TODOS los VALORES de la vida y a que querer es poder. Gracias por inculcarme el anhelo de ser mejor cada día, siempre con nobleza de corazón. Tenéis el CUM LAUDEN como padres. A mis abuelicos, por sus oraciones. Gracias a mis tíos, primos y cuñados por su apoyo. Y como no, a mis HERMANAS, por quererme tanto. GRACIAS A TODOS.

* A los compañeros de laboratorios de todos estos años: Natalia, Cristina, Ester Sales, Begonya, Jesús, Javi, Abdel, Lorena, Paco, Sergio, Rodolph, Chelo, Emilio, Jorge, Laura, Luis, Neus, María, Fran, Alicia, Isabel y M^a José. A los extranjeros que estuvieron de estancia en nuestro grupo: M^a Luisa, Clarissa y al sex-symbol cubano J.C.

* A la gente de Santiago con la que compartí estancia en el laboratorio: María, Marían, Sonia, Poti, Roberto, Abelenda, Jorge y en especial a Natalia. Y con los que compartí tapas fuera del laboratorio: Alex, Oscar, Javi, Tino, Bibi, Berta, Xullo, Laura y Gonzalo y en especial a Matías. Vos fixestes que me namorara de Galicia. Moitas graziñas.

* Watashi ga coco ni tsuite cara, ninhasan wa watashi ga jibun no ie ni iruyouni, jibun ne cazoku to irukanoyouni sesshite kuremashita. Minasau no hitori hitori ga ninou to iu kumino subarashisa o takusan oshietekuremashita soshite watashi wa konokuri ga daisukini narimashita. Watashi no cocoro niwa corecaramo zutto minasauga imasu. Soshite zehi Supein ni asobini kite kudasai. Watashi o shiawase ni shitekurete, minasan jonto ni arigatou gozaimashita. 保尊隆享, 若林和幸, 曾我康, 足立拓也, 新井邦典, 小泉朋子, 奥田真季子, 松本翔平, 井上勇樹, 隈崎沙緒里 & 中野紗帆. Gracias Ana, por todos los abrazos y besos en tierras orientales.

- * A mis amigos de siempre: María, Berta, Sandra, Juanvi, Sergio, Paquito y Javi, porque os quiero. A los amigos de la Facultad: Paco, Ana, Yolanda, Marga, M^a Carmen, Tere y Juanjo. A mis nuevos amigos: Amalia, Belén y Ricardo, por compartir algo más que brújulas, ikebanas y tempura.
- * Al personal de laboratorio (y mucho más), Estrella y Carmina. A mis SOLES de administración, Consuelo y M^a José.
- * A la gente del JJ13. Ánimo con las jaulas, “¡guapis!”.
- * A todos los que se han cruzado en mi camino durante estos años, a sabiendas o no de que influían en mi vida y mi trabajo.
- * Muchos sabemos que la realización de la Tesis Doctoral arrebató el epicentro de nuestra existencia durante unos años de la vida, centralizando así, los sentimientos científicos. Y digo bien. Por esta razón, he de dar las GRACIAS a todas las personas que incondicionalmente formaron, forman y formarán parte de mi $\rho = a(1 + \cos \theta)$.

MUCHAS GRACIAS

Moitas graziñas

Thank you very much

Domo arigatou gozaimashita

ABREVIATURAS

AT: azúcares totales.

AU: ácidos urónicos.

CDTA: ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacético.

CMC: carboxi- metil-celulosa.

Ct: threshold cycle: número de ciclo de la reacción de PCR en Tiempo Real, en el cual la muestra alcanza un nivel estándar de fluorescencia, normalmente con valor 0,2.

EST: fragmento de secuencia expresada.

FID: detector de ionización de llama.

FTIR: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.

[³H]XXXG: heptasacárido del xiloglucano marcado con tritio.

MALDI-TOF MS: espectrometría de masas basada en la cuantificación del tiempo de vuelo de los iones que se producen durante la pérdida de absorción/ionización provocada por láser en una matriz sólida.

pb: pares de bases.

PCA: análisis de componentes principales.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PME: pectín metil-esterasa.

RMN: resonancia magnética nuclear.

RPL2: secuencia que codifica para la sub-unidad ribosómica 18S, utilizada como control interno en tomate.

SCSIE: servicio central de soporte a la investigación experimental.

SXTHs: familia de las xiloglucano endotransglucosilasas/hidrolasas de tomate.

TLC: cromatografía en capa fina.

Tm: temperatura de melting: temperatura a la cual el 50% de la secuencia de los oligosacáridos está hibridado con la secuencia específica del DNA.

Vo: volumen vacío.

XEH: xiloglucano endohidrolasa.

XET: xiloglucano endotransglucosilasa.

XET S: línea silvestre de tomates de la variedad Money Maker.

XET +: línea que sobre-expresa la isoenzima *S/XTH1* de tomates de la variedad Money Maker.

XET -: línea que tiene reprimida la expresión de la isoenzima *S/XTH1* de tomates de la variedad Money Maker.

XG: xiloglucano.

XGO: oligosacáridos del xiloglucano.

XTH: xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa.

- 
- 教授 保尊隆享 研究テーマ：
植物の成長調節機構
 - 助教授 若林和幸 研究テーマ：
植物細胞壁の構造と機能
 - 助手 曾我康一 研究テーマ：
環境要因による植物の成長と形態形成
 - 客員研究員 Eva Miedes 研究テーマ：
環境応答における XTH の機能
 - M2 足立拓也 研究テーマ：
植物の成長調節における XTH 遺伝子群の機能
 - M2 新井邦典 研究テーマ：
環境シグナルによる細胞壁合成の制御機構
 - M2 小泉朋子 研究テーマ：
植物の重力応答における膜ステロールの機能
 - M1 奥田真季子 研究テーマ：
浸透ストレス環境下における植物細胞壁の代謝調節機構
 - M1 松本翔平 研究テーマ：
植物の重力応答における微小管の機能
 - 4回生 井上勇樹 研究テーマ：
冠水による植物の成長抑制機構
 - 4回生 隈崎沙緒里 研究テーマ：
環境応答および成長調節における微小管結合タンパク質の機能
 - 4回生 中野紗帆 研究テーマ：
植物の成長調節におけるセルロース合成の意義

昔のメンバー 2005 年度

ÍNDICE

ÍNDICE

Introducción general	1
La pared celular vegetal: Escenario de cambios fisiológicos, genéticos y moleculares. Funciones	2
Composición de la pared celular primaria y secundaria de dicotiledóneas	4
Celulosa	5
Polisacáridos hemicelulósicos	6
Polisacáridos pécticos	8
Proteínas estructurales	10
Otros componentes	11
La maquinaria bioquímica y enzimática diseña la estructura de la pared celular vegetal	12
Modelos estructurales de la pared celular vegetal. Flexibilidad estructural de la pared celular vegetal	12
Enzimas de la pared celular	16
Transglucosilasas. Xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa. Retrato molecular, bioquímico, estructural y fisiológico	16
Hidrolasas: exo-glicanasas y endo-glicanasas	23
Poligalacturonasas	23
Pectín metil-esterasas	24
Oxidoreductasas: peroxidasas	24
La pared celular protagonista del crecimiento y expansión celular de la planta	24
Implicación de la pared celular en el ablandamiento de los frutos durante la maduración	30
Implicación de la pared celular en el ataque por patógenos	33
Objetivos y planteamiento trabajo	35

Capítulo I- Implicación de la xiloglucano endotransglucosilasa en el crecimiento de la plántula	39
Introducción	40
Materiales y métodos	44
Material vegetal	44
Cinética de crecimiento de hipocótilos y raíces de la línea silvestre (XET S) y las transgénicas (XET + y XET -)	45
Biomasa de hipocótilos y raíces	46
Extracción de mRNA. Síntesis de cDNA. PCR cuantitativo en tiempo real	46
Actividad xiloglucano endotransglucosilasa	49
Análisis de los oligosacáridos del xiloglucano por espectroscopía de masas (MALDI-TOF MS)	50
Estudio de la pared celular mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Análisis poblacional mediante componentes principales (PCA)	51
Extensibilidad de la pared celular de los hipocótilos	53
Crecimiento en estrés hídrico, salino y térmico	53
Resultados	55
Cinéticas de crecimiento del hipocótilo y de la raíz	55
Biomasa de los hipocótilos y raíces	56
Análisis de la expresión de <i>SXTH1</i> mediante PCR cuantitativo en tiempo real	58
Determinación de la actividad xiloglucano endotransglucosilasa	59
Estudio de la composición cualitativa del xiloglucano de la pared celular de hipocótilos mediante MALDI-TOF MS	60
Identificación de las poblaciones mediante la aplicación de PCA a los espectros FTIR de la pared celular de hipocótilos	65
Medida de la extensibilidad de hipocótilos	71
Evaluación del crecimiento frente a estrés hídrico, salino y térmico de los hipocótilos	73
Discusión	79

Capítulo II- Implicación de la xiloglucano endotransglucosilasa en el crecimiento de la planta	85
Introducción	86
Materiales y métodos	90
Material vegetal	90
Cultivo de la línea silvestre (XET S) y las transgénicas (XET + y XET -) de <i>Solanun lycopersicum</i> L. variedad Money Maker en invernadero	90
Cinética de crecimiento en altura y foliar	94
Biomasa vegetal. Productividad	95
Extracción de mRNA. Síntesis de cDNA. PCR cuantitativo en tiempo real	95
Actividad xiloglucano endotransglucosilasa	96
Análisis de los oligosacáridos del xiloglucano mediante espectroscopía de masas (MALDI-TOF MS)	96
Crecimiento en estrés salino	96
Resultados	97
Estudio de las características relativas al crecimiento y elongación celular: cinéticas de crecimiento, biomasa y productividad	97
Análisis de la expresión de <i>SXTH1</i> mediante PCR cuantitativo en tiempo real	105
Determinación de la actividad xiloglucano endotransglucosilasa	106
Estudio de la composición cualitativa del xiloglucano de plantas mediante MALDI-TOF MS	108
Evaluación del crecimiento de la planta frente a estrés salino	113
Discusión	115

Capítulo III- Implicación de la xiloglucano endotransglucosilasa en la dureza de los frutos	119
Introducción	120
Materiales y métodos	124
Material vegetal	124
Caracterización de los estadios de desarrollo	124
Cinética de crecimiento	125
Extracción de mRNA. Síntesis de cDNA. PCR cuantitativo en tiempo real	125
Actividad xiloglucano endotransglucosilasa soluble	125
Actividad $\beta(1\rightarrow4)$ glucanasa de los estadios de desarrollo	126
Evaluación de la firmeza de los frutos	126
Extracción de paredes celulares y fraccionamiento de polisacáridos hemicelulósicos	126
Análisis de la composición de las fracciones hemicelulósicas por cromatografía de exclusión molecular	127
Análisis de oligosacáridos del xiloglucano por espectroscopía de masas (MALDI-TOF MS)	128
Resultados	128
Caracterización de los estadios de desarrollo	128
Cinética de crecimiento del fruto	130
Estudio de la expresión de la <i>SXTH1</i> mediante PCR cuantitativo en tiempo real de los frutos	131
Cuantificación de la actividad xiloglucano endotransglucosilasa soluble	133
Análisis de la actividad $\beta(1\rightarrow4)$ glucanasa en frutos	134
Análisis de la dureza de los frutos	136
Análisis de la composición de la pared celular del fruto	137
Análisis cualitativo del xiloglucano de frutos por espectroscopía de masas	144
Discusión	146

Capítulo IV- Implicación de la xiloglucano endotransglucosilasa durante la infección de frutos por <i>Penicillium expansum</i> Link. A.	151
Introducción	152
Materiales y métodos	154
Material vegetal	154
Infección de <i>Malus domestica</i> L. y <i>Solanum lycopersicum</i> L. variedad Canario con <i>Penicillium expansum</i> Link. A.	154
Infección fúngica de frutos	154
Actividades enzimáticas de la pared celular de manzanas y tomates durante la infección fúngica	155
Análisis de los polisacáridos de la pared celular durante la infección fúngica	159
Análisis de la composición de las fracciones por cromatografía de exclusión molecular durante la infección fúngica	161
Determinación de azúcares neutros por cromatografía de gases (GLC)	162
Estudio de la infección fúngica sobre frutos silvestres y transgénicos de <i>Solanum lycopersicum</i> L. variedad Money Maker	162
Caracterización de los estadios de infección fúngica interna y externamente	162
Actividad xiloglucano endotransglucosilasa durante la infección	162
Análisis de la expresión de las <i>SXTHs</i> en frutos de tomate transgénicos durante la infección por <i>Penicillium expansum</i> Link. A.	163
Búsqueda y análisis <i>in silico</i> de las secuencias <i>SXTHs</i> obtenidas de las bases de datos	163
Extracción de mRNA. Síntesis de cDNA. PCR cuantitativo en tiempo real	165

Resultados	165
Infección de frutos de <i>Malus domestica</i> L. variedad Golden y <i>Solanun lycopersicum</i> L. variedad Canario con <i>Penicillium</i> <i>expansum</i> Link. A.	165
Cuantificación de las actividades enzimáticas de la pared celular en manzana y tomate durante la infección fúngica	165
Análisis de la pared celular de los frutos de manzana y tomate durante la infección	174
Estudio de la infección fúngica sobre frutos silvestres y transgénicos de <i>Solanun lycopersicum</i> L. variedad Money Maker	183
Cuantificación de la evolución de la infección	183
Evaluación de la infección fúngica	184
Cuantificación de la actividad xiloglucano endotransglucosilasa durante la infección en tomates silvestres y transgénicos	185
Análisis de la expresión de las <i>SXT</i> THs en frutos de tomate transgénicos durante la infección por <i>Penicillium expansum</i> Link. A.	187
Diseño de cebadores discriminantes para el estudio de los genes pertenecientes a la familia de <i>SXT</i> THs durante la infección de tomate	187
Expresión de las <i>SXT</i> THs mediante PCR cuantitativo en tiempo real en tomates maduros Money Maker y Canario	196
Evolución de la expresión de las <i>SXT</i> THs mediante PCR cuantitativo en tiempo real durante la infección en tomate Money Maker y Canario. Análisis de la actividad xiloglucano endotransglucosidasa	197
Discusión	203

Capítulo V- Implicación del etileno sobre regulación de la actividad xiloglucano endotransglucosilasa en frutos	209
Introducción	210
Materiales y métodos	211
Material vegetal	211
Medida de etileno durante la maduración y la post-cosecha de los frutos de tomate de la variedad Money Maker por cromatografía de gases	212
Medida del etileno durante la infección en frutos de tomate de la variedad Money Maker y de variedad Canario	212
Tratamiento de los frutos con etileno	213
Actividad xiloglucano endotransglucosilasa soluble	213
Extracción de mRNA. Síntesis de cDNA. PCR cuantitativo en tiempo real	214
Resultados	214
Valoración del etileno durante el desarrollo de los frutos	214
Evolución del etileno post-cosecha	215
Valoración del etileno en frutos de tomate de la variedad Money Maker y en la variedad Canario durante la infección fúngica	216
Tratamiento con etileno de frutos de tomate de la variedad Money Maker y Canario	218
Firmeza de los frutos de tomate de la variedad Money Maker tratados con etileno	220
Análisis de la expresión de las <i>S/XTHs</i> mediante PCR cuantitativo en tiempo real y de la actividad xiloglucano endotransglucosilasa en frutos de tomate de la variedad Money Maker tratados con etileno	221
Análisis de la expresión de las <i>S/XTHs</i> mediante PCR cuantitativo en tiempo real y de la actividad xiloglucano endotransglucosilasa en frutos de tomate de la variedad Canario tratados con etileno	224
Discusión	227

Discusión general	229
Conclusiones	237
Referencias bibliográficas	241
Referencias bibliográficas	242
Referencias de páginas de internet	276
Normativa específica	277
Anexo I- Metodología general	279
Determinación de ácidos urónicos	280
Determinación de azúcares totales	280
Determinación de xiloglucano	281
Determinación de azúcares reductores	281
Determinación de azúcares neutros por cromatografía de gases	282
Cuantificación de proteínas	283
Sustratos para la actividad XET	283
Obtención de xiloglucano parcialmente purificado	283
Obtención de oligosacáridos del xiloglucano. Identificación por cromatografía líquida de capa fina	283
Marcaje e identificación de oligosacáridos del xiloglucano con [³ H]	284
Análisis bayesiano de datos	284
Anexo II- El cultivo del tomate	287
Origen	288
Taxonomía y morfología	288
Importancia económica y distribución geográfica	289
Tipos de tomates comercializados	290
Requerimientos edafoclimáticos	292
Particularidades del cultivo	293
Plagas y enfermedades	299

Alteraciones del fruto	300
Recolección	302
Post-cosecha	302
Comercialización	306
Valor nutricional	307

INTRODUCCIÓN GENERAL



La pared celular vegetal: escenario de cambios fisiológicos, genéticos y moleculares. Funciones

Cuando en Agosto de 1665 Robert Hooke dibujó la “Observación XVIII”, que más tarde se publicaría en el libro *Micrographía* (relato de 50 observaciones microscópicas y telescópicas con detallados dibujos <http://es.wikipedia.org/wiki/Micrograph%C3%Ada>), no sabía que estaba utilizando por primera vez la palabra célula para designar las celdillas poliédricas que en realidad describían las paredes celulares de las células de una lámina de corcho. No supo demostrar lo que estas celdillas significaban como constituyentes de los seres vivos, pero este hecho nos ha permitido observar y conservar el primer dibujo de las paredes celulares que hoy estudiamos.

La **pared celular primaria** es una estructura semirrígida y muy organizada, de entre 0.1 a 10 μm de grosor, que rodea al protoplasto externamente y que constituye una de las características diferenciadoras de las células pertenecientes al Reino Planta. Otorga resistencia mecánica, a la vez que plasticidad, regulando la forma y el volumen de las celulares vegetales, de modo que define su morfología, estructura y función a lo largo de su desarrollo (Bacic *et al.*, 1988). La pared celular primaria está compuesta, principalmente, por una red tridimensional de microfibrillas de celulosa, embebida en una matriz ligeramente ácida, que cuenta con un 65% de agua, polisacáridos, glicoproteínas, compuestos fenólicos e iones.

La **biosíntesis** de la pared celular comienza en la telofase de la división celular, cuando, a nivel del fragmoplasto, una acumulación y fusión de vesículas del aparato de Golgi cargadas con polisacáridos pécticos forman la lámina media, mientras que las membranas de las vesículas formarán el plasmalema de las células hijas (Smith, 2001). Entre la lámina media y el plasmalema, es donde tiene lugar el depósito de las microfibrillas de celulosa desde los complejos celulosa sintasa anclados en la membrana (Doblin *et al.*, 2002; Saxena y Brown, 2005). También se depositan los polisacáridos hemicelulósicos y glicoproteínas, excretados desde el Golgi, y que formarán la pared celular primaria. Esta es la

única estructura extracelular que mantiene la capacidad de dividirse y/o elongarse, ya que cuando se pierde esta capacidad, se produce un depósito en la parte interna de nuevas capas de material (lignina y suberina generalmente) cuya composición obedece al tejido u órgano del que vaya a formar parte la célula, como, por ejemplo, en los tejidos conductores. Además, las microfibrillas de celulosa adquieren una conformación más orientada, de modo que la pared se hace más gruesa y rígida, resultando la pared celular secundaria.

La pared es una estructura dinámica implicada en numerosos procesos que determinan, tanto las capacidades de las células para adaptarse a su medio, como para realizar su función dentro de un organismo. Por ello, es notable el elevado número de diferencias registradas, no sólo a nivel evolutivo entre los diferentes taxones, sino también a nivel celular dentro del mismo individuo, incluso entre polisacáridos estructurales o en proteínas asociadas a dicha pared (McNeil *et al.*, 1984; Cosgrove, 2005).

La pared celular ejerce una serie de **funciones** que son necesarias para la vida de las plantas y hongos, justificando su notable importancia en todos los procesos fisiológicos de los organismos que la poseen.

- Conjuntamente con las funciones físicas de soporte estructural y mecánico, las paredes celulares mantienen y determinan el tamaño celular, ofrecen resistencia a la presión de turgencia interna de la célula y, mediante el control de la tasa y dirección del crecimiento, son las responsables de la arquitectura y forma de la misma (Cosgrove, 1987; Carpita y Gibeaut, 1993).
- Asimismo, regulan la difusión del material a través del simplasto mediante los plasmodesmos, permitiendo establecer procesos de reconocimiento e interacciones célula-célula (raíces-bacterias fijadoras N₂ y polen-estilo) (Bell, 1981).
- Forman una barrera física que protege frente a patógenos biológicos y abióticos (evita la deshidratación por suberificación), aunque cuenta con poros de alrededor de 4 nm (Tepfert y Taylor, 1987) que permiten el paso de

pequeñas moléculas y de proteínas de 60000 de masa molecular (Vorwerk *et al.*, 2004).

- Las paredes celulares también son fuente de moléculas biológicamente activas de señalización, las oligosacarinas (Albersheim y Darvill, 1985; Aldington y Fry, 1993), que actúan como sustancias señalizadoras frente al ataque patógeno, como reguladoras del crecimiento en el desarrollo normal de la planta (Fry, 1994) y además pueden estimular la síntesis de etileno (Cutillas-Iturralde *et al.*, 1998).
- Constituyen la reserva de carbohidratos en algunas semillas (Reid, 1985) y son sustrato metabólico puesto que albergan proteínas necesarias para el transporte y la secreción.

Por otro lado, la pared celular puede desarrollar un papel muy importante según los **usos** que hagamos de ella.

- No podemos olvidar su valor nutricional, como la estimulación del sistema inmunitario mediante los metales pesados unidos a los polisacáridos de la pared o la regulación de los niveles de colesterol por los fitoesteroles (Jones, 2002). Y su uso en fármaco-cinética y medicina, como vía de transporte de fármacos o como pegamento de epitelios oculares (Burgalassi *et al.*, 2000 a y 2000b).
- Asimismo es destacable su uso alimentario como gomas, geles y estabilizantes y su uso en la industria papelera, maderera, textil, energética y en la construcción.
- Sin olvidar la capacidad detoxificadora de los suelos, puesto los contaminantes se fijan en sus paredes celulares (Hall, 2002).

Composición de la pared celular primaria y secundaria de dicotiledóneas

Las diferencias que se encuentran en la estructura y composición de las células vegetales, determinan muchas de las funciones fisiológicas y morfológicas del tejido vegetal del que forman parte. Sin embargo, se puede resumir en una

composición estándar que cuenta en las paredes primarias con hasta un 90% en peso seco de polisacáridos, como celulosa, hemicelulosas y pectinas, y entre el 65 y 85% en las paredes secundarias (McNeil *et al.*, 1984). Las proteínas estructurales y enzimáticas constituyen un 10% del peso seco, mientras que en las paredes secundarias especializadas, las ligninas oscilan entre un 5 y un 35%. La pared celular también cuenta con otros componentes como el agua, fenoles, suberina, cutina, ceras o minerales (sílice, boro y calcio) (Fry, 2004 a).

Celulosa

La celulosa constituye la molécula orgánica más abundante en la naturaleza, puesto que representa un 20-30% del peso seco de las paredes celulares primarias (McNeil *et al.*, 1984) y hasta un 40-50% en las secundarias (Marchessault y Sundararajan, 1983). La forman una cadena de residuos D-glucosa unidos mediante enlace $\beta(1\rightarrow4)$ (Saxena y Brown, 2005), de modo que cada residuo está rotado 180° definiendo un disacárido denominado celobiosa que es la unidad que se repite en la cadena. La celulosa se forma en los complejos transmembrana compuestos por rosetas hexaméricas estabilizadas por dedos de zinc y codificadas por los genes CESA: celulosa sintasa (Arioli *et al.*, 1998). En estos complejos se añadirían restos UDP-glucosa al extremo no reductor, mientras que el extremo reductor se iría ordenando a medida que sale al apoplasto (Delmer, 1983). Las cadenas lineales (aproximadamente $7\ \mu\text{m}$) no presentan residuos laterales, lo cual les permite disponerse paralelamente y formar agregados microfibrilares de, aproximadamente, 40 elementos en la pared primaria de plantas superiores. Cuentan con un diámetro de entre 5 y 15 nm (McCann *et al.*, 2001), ya que las cadenas establecen interacciones mediante puentes de hidrógeno, intra e intercatenarios, y fuerzas de Van der Waals (Delmer, 1983). Además, los espacios inter-microfibrilares (20-40 nm) se rellenan con xiloglucano y pectinas en las paredes primarias, o lignina y suberina en las secundarias. Esto les otorga una estructura cristalina central rodeada de microfibrillas laterales, menos organizadas, donde se pueden anclar pectinas o xiloglucano y proteínas, formando las zonas amorfas (Park *et al.*,

2003). Tanto las pectinas como el xiloglucano pueden unirse a la celulosa directamente por puentes de hidrógeno (Carpita y Gibeaut, 1993; Hayashi *et al.*, 2005) o covalentemente (Popper y Fry, 2005), o bien indirectamente mediante otros componentes.

Polisacáridos hemicelulósicos

Están formados por una cadena lineal de $\beta(1\rightarrow4)$ glucano, sobre las cuales se depositan residuos laterales mono, di o triglicósidos, que no permiten la cristalización. El más abundante (20% peso seco) en la pared celular primaria de dicotiledóneas, es el **xiloglucano**. Este polímero cuenta con una cadena de glucosas pautada con sustituciones de tres residuos de xilosa unidos mediante enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ más uno libre, donde se localiza la diana de corte enzimática que dará lugar a oligosacáridos del xiloglucano (Fry, 1989). Además, los residuos de xilosa pueden sustituirse por cadenas laterales más o menos largas. Se usa la nomenclatura de una letra para designar estas sustituciones laterales de 1 a 3 residuos glicosídicos en el xiloglucano (Fry *et al.*, 1993 a), como se muestra a continuación.

Símbolo	Cadena lateral
G	--
X	α -D-xilosil
L	β -D-galactosil(1 \rightarrow 2)- α -D-xilosil
F	α -L-fucosil- β -D-galactosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-xilosil
S	α -L-arabinosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-xilosil
T	β -L-arabinosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-xilosil

Los polisacáridos son sintetizados en el aparato de Golgi (Zhang y Staehelin, 1992) y los genes que los codifican reciben el nombre de CSL (celulosa sintasa-like). Se han identificado 20 genes (Scheible y Pauly, 2004) que se agrupan en 8 familias denominadas CSLA-CSLH (Richmond y Somerville, 2001). Estos

genes contienen motivos de secuencias típicas de β -glicosiltransferasa y dominios de dedos de zinc en el extremo N-terminal, necesarios para la dimerización de la enzima como en el complejo de la síntesis de la celulosa (Fukuda *et al.*, 2006).

Puesto que no son moléculas solubles, su extracción se lleva a cabo mediante álcalis como KOH al 4 y 24% (Fry, 1988). Al extraer el xiloglucano, se obtienen dos grupos de polisacáridos mayoritarios (Vincken, 1997 b): poli-XXXG, presente en angiospermas y gimnospermas, y poli-XXGG, característico de solanáceas, las cuales cuentan también con una elevada presencia de la cadena S (α -L-arabinosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-xilosil), en su xiloglucano. En esta familia, los residuos de xilosa están sustituidos predominantemente por arabinosa en tabaco, o por arabinosa y galactosa en patatas y tomates. La glucosa sin ramificar disminuye a un tercio en tabaco, puesto que solamente el 10% de las glucosas presentan cadena lateral (York *et al.*, 1996). Además, conjuntamente con las diferentes cadenas laterales, se han detectado grupos acetilo en el carbono 2, 3 y 6 de los residuos de galactosa, en el carbono 6 de las glucosas y en el carbono 5 de las arabinosas. Se ha sugerido que la acetilación de residuos limita las dianas de hidrólisis enzimática, aunque estos grupos acetilo no impiden el ataque por endoglucanasas (York *et al.*, 1996; Vincken, 1997 b). Por el contrario, en otras especies como la manzana, no se han detectado grupos acetilo en su xiloglucano (Renard *et al.*, 1992).

Los **xilanos** aparecen en la pared celular primaria de gramíneas (20% peso seco) y en paredes secundarias de dicotiledóneas, aunque son componentes minoritarios en las paredes primarias de las dicotiledóneas. Están formados por una cadena lineal de D-xilosas unidas por enlace β (1 \rightarrow 4) con sustituciones variables. Se pueden unir a las microfibrillas de celulosa desarrollando una función similar al xiloglucano en esta familia, aunque la estructura de las ramificaciones limita esa unión (McNeil *et al.*, 1984). Otro polisacárido hemicelulósico neutro no ramificado de gramíneas es el **glucano mixto**, formado por una cadena lineal de D-glucosas unidas por enlace β (1 \rightarrow 4) y β (1 \rightarrow 3) (Hatfield y Nevins, 1987). A pesar de que ha sido descrito en *Phaseolus*

aureus (Buchala y Franz, 1974), su presencia en dicotiledóneas es discutida (Okamura y Golberdg, 1985). Los **mananos** son otro grupo muy heterogéneo de polisacáridos cuya cadena lateral está formada por D-manosa unidas por enlace $\beta(1\rightarrow4)$ que pueden estar unidas a D-glucosa y presentar sustituciones D-galactosa unidas mediante $\alpha(1\rightarrow6)$ (Carpita, 1984). Adicionalmente, suelen encontrarse como material de reserva en semillas de algunas dicotiledóneas (Gilkes y Hall, 1977).

Polisacáridos pécticos

Constituyen un grupo complejo de polisacáridos ácidos y neutros, ricos en ácido galacturónico y ramnosa, que representan un 30% del peso seco de la pared primaria de dicotiledóneas (Ridley *et al.*, 2001; Willats *et al.*, 2001). Se encuentran de manera abundante en la lámina media como material cementante. Los **homogalacturonanos** consisten en una cadena lineal de residuos de ácido D-galacturónico unidos por enlace $\alpha(1\rightarrow4)$. Cuando los grupos carboxilo de los restos galacturonosil no se encuentran esterificados con metanol, pueden estar disociados formando puentes de Ca^{2+} , configurando la estructura denominada “caja de huevos” (Rees, 1969). Las cadenas de **ramnogalacturonanos I** son una repetición del disacárido -2)- α -D-ramnosa-(1 \rightarrow 4)- α -D-galactosa-(1-, acompañado por diversas cadenas laterales con restos de arabinosa, fucosa, xilosa, galactosa, ácido acérico, apiosa y otros (Ridley *et al.*, 2001). El **ramnogalacturonano II** sintetizado en angiospermas es el polisacárido más complejo identificado, puesto que contiene hasta 11 residuos glicosídicos diferentes interconectados por más de 20 enlaces (Ridley *et al.*, 2001). El esqueleto principal cuenta con 8 residuos de ácido galacturónico interconectados mediante enlace $\alpha(1\rightarrow4)$, al que se le unen cuatro oligos complejos que se denominan cadenas A-D. Dos de las cadenas pueden establecer un enlace covalente diéster 1:2 borato-diol (O’Neil *et al.*, 2001). Este enlace se forma únicamente con la presencia de un residuo de apiosa en la cadena A y una fucosa terminal en la cadena tipo B. Además existen

polisacáridos pécticos neutros, ricos en galactosa y arabinosa, como **arabinanos, galactanos y arabinogalactanos**.

Las cadenas de ácido galacturónico son sintetizadas en el aparato de Golgi y secretadas como polímeros metilados, los cuales son procesados por la acción de las pectin metil-esterasas que los eliminan permitiendo su posterior unión a Ca^{2+} .

Aunque no se han encontrado evidencias concluyentes, los datos obtenidos hasta el momento apuntan a la existencia de uniones covalentes puntuales entre las pectinas y la red de celulosa-xiloglucano (Thompson y Fry, 2000; Popper y Fry, 2005). Este punto se ve apoyado por el hecho de que cuando se muta uno de los genes que codifica para una endoglucanasa, se modifica la composición de pectinas para compensar el debilitamiento de la red xiloglucano-celulosa (His *et al.*, 2001). Además, los ensayos de fragmentación enzimática de complejos hemicelulosa-pectina (Abdel-Massih *et al.*, 2003) apoyan de nuevo la idea planteada ya por Albersheim hace más de tres décadas (Keegstra *et al.*, 1973). A pesar de ello, otros autores consideran que no existen uniones covalentes entre las pectinas y el xiloglucano (Rizk *et al.* 2000; Cumming *et al.*, 2005).

Las pectinas se encargan del control del tamaño y disposición de los poros de la pared celular (Fleischer *et al.*, 1999), determinan su porosidad, ofrecen superficies cargadas que modulan el pH y el balance iónico y acuoso (Willats *et al.*, 2001). Este hecho puede afectar indirectamente a las reacciones enzimáticas, debido a la posibilidad de confinar las enzimas impidiendo su acción, creando un centro de reacción propicio que afectará a la velocidad de reacción o interviniendo en las interacciones electrostáticas debidas a su elevada carga negativa. También regulan la adhesión celular mediante el control del grado de metil esterificación de la misma, de modo que aumentando la esterificación aumenta la separación celular tan importante en la maduración de los frutos (<http://www.crc.uga.edu/~mao/intro/outline.htm>). La notable capacidad de las pectinas para formar geles, influye notablemente en la

regulación de la presión de turgencia, pudiendo influir en el crecimiento celular (Fry, 1993 b).

Proteínas estructurales

Si contabilizamos todas las proteínas presentes en las paredes celulares primarias, tanto las estructurales como las enzimáticas, estas representan entre el 5-10% del peso seco (McNeil *et al.*, 1984). Las proteínas estructurales suelen tener un grado variable de glicosilación y la presencia de secuencias repetitivas.

Podemos diferenciar entre las **proteínas ricas en hidroxiprolina** (HRGPs) o **extensinas** (Showalter, 1993; Kieliszewski y Shpak, 2001) que se caracterizan por contener un aminoácido poco común en el citoplasma, como es la hidroxiprolina ($\approx 40\%$). Además, contienen 5 aminoácidos (serina, tirosina, valina, histidina y lisina) que constituyen la parte proteica. Esta glicoproteína contiene un esqueleto formado por repeticiones de serina-4-hidroxiprolina y tirosina-lisina-tirosina, las cuales definen las estructuras secundaria y terciaria de la misma. La parte glucídica la aportan residuos de galactosa unidos a la serina o cadenas de arabinosa unidas a la hidroxiprolina. Los residuos de tirosina le permiten establecer dímeros que le proporcionan rigidez e hidrofobidad a la molécula. Además, establecen enlaces covalentes con la pared celular mediante la acción de las peroxidasas (Fry, 1998), limitando el crecimiento por el aumento de rigidez. Se ha comprobado su implicación en la inmovilización de patógenos y la formación de una red de extensina como mecanismo de respuesta rápido y flexible a situaciones de estrés (Showalter, 1993).

Se pueden describir además las **proteínas ricas en glicina** (GRP) y **proteínas ricas en prolina** (PRP), (Cassab, 1998). En las primeras, la glicina representa el 70% de la parte proteica y se diferencian dos tipos, las unidas a pared, relacionadas con el desarrollo de la misma y las presentes en el citoplasma implicadas en la señalización de factores estresantes. También, desempeñan funciones estructurales en tejidos destinados a la lignificación (Keller *et al.*,

1989). Las proteínas ricas en prolina, tienen hidroxiprolina pero no reproducen la secuencia de las HRGPs.

Por último, el cuarto tipo de proteínas estructurales son las denominadas **arabinogalactano-proteínas** (AGP) (Gaspar *et al.*, 2001), similares a las primeras pero con tan sólo 2-10% de proteínas. La parte glucídica está formada por cadenas altamente ramificadas de galactosa y arabinosa unidas a restos de hidroxiprolina, serina o treonina lo que les hace muy solubles, posibilitando así la formación de geles, por lo que no intervienen en la función estructural. Además, la complejidad y variedad de cadenas de glucanos las hace candidatas para los procesos de señalización, como desarrollo de la raíz, diferenciación celular, crecimiento del tubo polínico, fertilización, división y expansión celular, embriogénesis somática y muerte celular programada. Sin olvidar las respuestas frente a estreses bióticos y abióticos que señalizan probablemente, mediante la liberación de oligosacáridos de las cadenas glucídicas o mediante la parte lipídica tanto intra como extracelularmente (Pilling y Hofte, 2003).

Otros componentes (lignina, suberina, ceras, cutina y agua).

En la pared celular podemos encontrar otros componentes como la **lignina** (Lewis y Yamamoto, 1990) que constituye el segundo polímero más abundante en la naturaleza, formado por alcoholes aromáticos *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico mediante enlaces carbono-carbono o éter. La lignina establece enlaces éster entre los restos hidroxicinámicos con la celulosa, hemicelulosas y pectinas. Este hecho le otorga resistencia física, química y mecánica a la pared de las células de tejidos conductores y paredes secundarias donde se deposita desplazando el agua. Además protege del ataque por patógenos y confina las infecciones fúngicas mediante el depósito de lignina para frenar el avance de la misma. Los componentes lipídicos, como **suberina, ceras y cutina**, se asocian a la pared proporcionándole resistencia, impermeabilidad frente a soluciones acuosas y restricción de la difusión de los gases. Las ceras son compuestos alifáticos que se depositan sobre la cutícula y embeben las paredes suberificadas y cutinizadas (Kolattukudy, 2001). La cutina es el componente principal de la

cutícula de las paredes externas de células epidérmicas. Esta formada por ácidos grasos de 16 y 18 carbonos hidroxilados, que a su vez suelen estar esterificados por ácidos grasos o fenoles. La suberina, presente en las células epidérmicas, superficie radicular, tallos y banda de Caspari, esta formada por ácidos fenólicos esterificados a ácidos grasos de cadena larga, ácidos dicarboxílicos y ω -hidroxiácidos. Y por último el **agua**, presente en un 75-80% y responsable de muchas de las propiedades de la pared celular, puesto que ofrece flexibilidad y extensibilidad, además de producir, en último término, la presión de turgencia.

La maquinaria bioquímica y enzimática diseña la estructura de la pared celular vegetal

Modelos estructurales de la pared celular vegetal. Flexibilidad estructural de la pared celular vegetal

Según Carpita y Gibeaut (1993), se pueden diferenciar dos tipos de paredes celulares primarias. Las de **Tipo I**, se encuentran en dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas no Commelinales, cuya característica es la similar composición en celulosa y xiloglucano (Nishitani, 1997). Las de **Tipo II**, están presentes en algunas monocotiledóneas (Yokoyama *et al.*, 2004). Las principales diferencias en la composición radican en que, mientras que en las Tipo I el xiloglucano es el polisacárido que se une a las microfibrillas de celulosa y las fija determinando la distancia entre ellas, en las Tipo II, es el glucuronoarabinoxilano quien se une a la celulosa. Además, en estas paredes, los polisacáridos pécticos y las proteínas estructurales son escasas.

La estructura de las paredes celulares **Tipo I** se basa en la existencia de tres redes independientes que interaccionan entre sí (Carpita y McCann, 2000):

- La **primera de las redes** está constituida por la unión celulosa-xiloglucano que define el andamiaje de la misma. Ya desde los primeros modelos para dicotiledóneas propuestos en el año 1973 por Albersheim (Keegstra *et al.*, 1973) se proponía que esta unión se establece mediante puentes de hidrógeno sin

necesidad de actividad enzimática, aspecto que fue corroborado al observar que hemicelulosas puras se unen a una columna de celulosa *in vitro* (Hayashi *et al.*, 1987). Actualmente, gracias a los estudios de modelización y análisis bioquímico, se conoce la existencia de dominios estructurales del xiloglucano, que se diferencian por su localización e interacción con otras moléculas (Bootten *et al.*, 2004). Se sabe también, que la capacidad de unión del xiloglucano a la celulosa depende de la longitud de la cadena lineal y las cadenas laterales del primero (Lima *et al.*, 2004) y que se pueden establecer diferentes dominios en el xiloglucano atendiendo a la extracción diferencial frente a celulosa y distintas concentraciones de álcali (Pauly *et al.*, 1999). De este modo, se podrían diferenciar tres tipos de xiloglucano en función del tipo de interacciones que establecen con otros componentes. El primero sería el que se encuentra intercalado con las microfibrillas exteriores de la celulosa, dada su difícil extracción (Hayashi *et al.*, 1994; Cosgrove, 2001). El segundo estaría unido a la superficie de las microfibrillas mediante puentes de hidrógeno, lo que alteraría el patrón cristalino de la celulosa permitiendo la expansión celular tras disminuir la fuerza mecánica (Chanliaud *et al.*, 2004). Así, las regiones adsorbidas en la superficie de la celulosa, presentarían una estructura plana, mientras que el resto sería helicoidal (Levy *et al.*, 1997). Y, por último, el tercer tipo de xiloglucano sería el que no se asocia a celulosa u otros componentes, puesto que en cultivos celulares una parte se libera al medio.

- La **segunda red estructural** esta formada por una matriz de polisacáridos pécticos que controla principalmente la porosidad de la misma. Está formada por cadenas helicoidales de homogalacturonanos unidas mediante calcio, formando la estructura de “caja de huevos” (Rees, 1969), muy abundante en la lámina media. Además, formando parte de esta matriz, se encuentran los ramnogalacturonanos I, cuyos restos de ramnosa y cadenas laterales impiden los enlaces de calcio, y los ramnogalacturonanos II, que establecen enlaces éster con los homogalacturonanos y puentes diborato entre ellos (Willats *et al.*, 2001). Estudios recientes proponen la existencia de uniones mediante enlaces covalentes, entre dominios pécticos (Ridley *et al.*, 2001) y entre pectinas y celulosa (Thompson y Fry, 2000). Otros modelos proponen la unión de las

pectinas a la celulosa y del xiloglucano unido a las pectinas, sin que el polisacárido hemicelulósico establezca contacto con la celulosa (Talbot y Ray, 1992). A su vez, estudios independientes demostraron, por un lado, la existencia de enlaces entre pectinas neutras (arabinanos) y la superficie de la celulosa (Zykwinska *et al.*, 2005) y por otro lado, la unión covalente y no covalente de las pectinas y el xiloglucano (Rizk *et al.*, 2000; Cumming *et al.*, 2005).

- La **tercera red** está constituida por proteínas estructurales que forman puentes intermoleculares con otras proteínas (puentes de isoditrosina) sin que tengan que unirse necesariamente con polisacáridos (Fry, 1982), aunque sí se han detectado enlaces con polisacáridos pécticos. Las proteínas estructurales aumentan una vez que ha cesado el crecimiento, y aunque algunas no forman parte de la red y se anclan a la membrana, otras, como ciertos tipos de proteínas enzimáticas, se unen por enlace iónico al arabinogalactano de dominios pécticos o por enlace covalente mediante la parte glucídica de la enzima (Carpita y McCann, 2000; Cosgrove, 2001).

En resumen, estos componentes se disponen en tres estructuras conformacionales que se entrelazan entre sí para definir la pared. La **primera** está formada por una red de **microfibrillas de celulosa** unidas mediante **hemicelulosas**, principalmente xiloglucano, constituyendo el armazón (aproximadamente el 50% del peso seco). Este andamio se encuentra integrado dentro de la **segunda** red estructural, un gel compuesto por **polisacáridos pécticos** (30% en peso seco) y un 65% de agua. La **tercera** estructura la forma la red de **proteínas estructurales** que es la encargada del anclaje y refuerzo de los componentes de la pared (Carpita *et al.*, 1996).

En los últimos años se ha incrementado el conocimiento de los componentes y sus interacciones, merced a la aplicación de nuevas técnicas y tecnologías no destructivas, como la microscopía de fuerza atómica, la espectroscopía de masas (MALDI-TOF MS), espectroscopía infrarroja por derivada de Fourier (FTIR) y la resonancia magnética nuclear (RMN), sin olvidar la información extraída de la aplicación de técnicas moleculares en las transformaciones

génicas, adaptaciones o habituaciones a estreses o a inhibidores de síntesis de la pared celular.

A pesar de los numerosos estudios realizados hasta el momento, no se ha podido esclarecer una estructura modelo que represente a la pared celular primaria. Según el CCRC (Complex Carbohydrate Research Center) (Cosgrove, 2001) se proponen 4 modelos estructurales:

- **Modelo de uniones covalentes** (Keegstra *et al.*, 1973), donde se establecen dichos enlaces entre los elementos, excepto entre xiloglucano y celulosa, que lo hacen mediante puentes de hidrógeno, sin que el xiloglucano conecte varias fibras de celulosa. Además, las pectinas se unen al xiloglucano y a las proteínas estructurales, de modo que todos los elementos se disponen paralelamente marcando las pautas estructurales.
- **Modelo de las ataduras por xiloglucano** (Fry 1989; Hayashi, 1989), donde la red de celulosa se une mediante largas cadenas de xiloglucano que se unen por puentes de hidrógeno. Todo ello se integra dentro de una matriz péctica con la que no establecen uniones covalentes. El xiloglucano conecta varias fibrillas de celulosa y las proteínas estructurales no son indispensables para la misma. Este modelo ha sido apoyado por los resultados de numerosos estudios, pero se le proponen algunas variaciones como los modelos siguientes.
- **Modelo difuso** (Talbot y Ray, 1992), en el que algunas moléculas de xiloglucano se unen por puentes de hidrógeno a la superficie de la celulosa, pero no las conectan directamente sino por medio de la agrupación paralela con otras cadenas de xiloglucano. La red anterior quedaría embebida en una matriz péctica y las proteínas estructurales no estarían implicadas en su formación.
- **Modelo estratificado** (Ha *et al.*, 1997), en el que el xiloglucano se une a varias microfibrillas de celulosa por puentes de hidrógeno creando una estructura laminada que delimita a las pectinas, que se disponen estratificadas entre la red anterior.

Enzimas de la pared celular

Como ya se ha comentado, la pared celular es una formación dinámica, cuya estructura está implicada en numerosas funciones fisiológicas, lo cual implica un metabolismo intrínseco muy activo que le permita modificaciones en sus componentes o en sus interacciones, para el cumplimiento de dichas funciones. Ese metabolismo se lleva a cabo por glicoproteínas, las cuales son enzimas muy estables puesto que su actividad óptima suele estar en torno a un pH entre 4.0 y 6.0. Tras sintetizarse en el citoplasma, se excretan a la pared, donde se pueden encontrar solubles en el apoplasto, o enlazadas iónica o covalentemente a los componentes de la pared. Las uniones iónicas suelen darse con residuos de ácido galacturónico de los polisacáridos pécticos ácidos y en las covalentes estaría implicada la parte glicídica de la enzima (Roberts *et al.*, 1985; Cassab *et al.*, 1998). La regulación de su actividad es una necesidad que se solventa con la accesibilidad al sustrato, la concentración o la necesidad de cofactores. La mayoría de las enzimas están implicadas en mecanismos de extensión de la pared, transporte de moléculas, reconocimiento celular y resistencia frente a patógenos (Rose *et al.*, 2004). Podemos clasificarlas en tres grupos, atendiendo al tipo de actividad enzimática que realizan: transglucosilasas, hidrolasas y oxidoreductasas.

Transglucosilasas. Xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa. Retrato molecular, bioquímico, estructural y fisiológico

A principios de los años 90, dos grupos de investigadores describieron la evidencia de una enzima capaz de realizar cortes y posteriores uniones en la molécula de xiloglucano en tejidos con una elevada tasa de crecimiento. El grupo del Dr. Fry denominó a la enzima, que realizaba endotransglucosilación en el xiloglucano, como xiloglucano endotransglucosilasa o XET (Fry *et al.*, 1992), mientras que el grupo del Dr. Nishitani, purificó una proteína con una actividad similar que denominaron endoxiloglucano transferasa o EXT (Nishitani y Tominaga, 1992).

Posteriormente, se pusieron de manifiesto las dos funciones que puede llevar a cabo la enzima, **endohidrolítica** (XEH: EC 3.2.1.151) y **endotransglucosilasa** (XET: EC 2.4.1.207) (Tabuchi *et al.*, 2001). En la actividad endohidrolítica, la enzima corta la cadena de xiloglucano generando un extremo reductor que unirá a una molécula de agua, dividiendo las cadenas de xiloglucano y disminuyendo su longitud. En la actividad endotransglucosilasa, la enzima realiza un corte en la cadena de xiloglucano generando un extremo reductor que unirá a otra cadena de xiloglucano u oligosacárido.

Es destacable que los primeros genes clonados que codificaban para las xiloglucano endotransglucosilasas/hidrolasas de diferentes especies vegetales (Okazawa *et al.*, 1993), revelaron una secuencia homóloga a una xiloglucanasa de la capuchina (de Silva *et al.*, 1993) y desde entonces, todos los genes clonados pertenecientes a diversas especies, comparten una secuencia, estructura y función específica que permite asociar todas las enzimas a tres o cuatro subgrupos filogenéticos dentro de la gran familia (Nishitani, 1997; Campbell y Braam, 1999 a; Uozu *et al.*, 2000).

Nomenclatura

Actualmente, se utiliza la abreviatura **XTH para designar al gen**, que codifica una secuencia homóloga, utilizando en primer lugar las iniciales del nombre botánico en cursiva, como por ejemplo, ***SXTH1*** que será la XTH1 de *Solanum lycopersicum* L. En relación con la actividad enzimática y el metabolismo polisacárido se **denomina XET a la actividad enzimática xiloglucano endotransglucosilasa** y **XEH a la actividad xiloglucano endohidrolasa**, pero **en ningún caso se utilizan para denominar a los genes o a las proteínas** (Rose *et al.*, 2002). Adicionalmente, existe una página de internet donde se encuentra una base de datos de la antigua y nueva nomenclatura y se solucionan problemas acerca de la misma (www.plantbio.cornell.edu/XTH).

Estudios filogenéticos y moleculares

Los **análisis filogenéticos** de la familia XTHs en *Arabidopsis* muestran genes duplicados en distintos cromosomas, que se piensan son resultado de una gran segmentación. En esta especie, la familia se divide en tres grupos consistentes (Yokoyama y Nishitani, 2001; Rose *et al.*, 2002) y extensibles a otras 14 especies vegetales, donde se distribuyen mejor en cuatro grupos (Campbell y Braam, 1999 a; Saladie *et al.*, 2006). Todas las secuencias en conjunto comparten entre un 34 y 90% de aminoácidos similares. Las diferencias más acusadas se registran en el extremo carboxilo terminal. De modo que en el **Grupo 1** se comparte entre el 70 y 89% de homología en la secuencia aminoacídica que describe 4 exones. Este grupo codifica proteínas que se encuentran tanto en mono como en dicotiledóneas, sugiriendo que el antecesor de ambas contenía el gen precursor. Esta conservación de la secuencia indica que la proteína podría haber llevado a cabo una misma función en especies diferentes (Campbell y Braam, 1999 a), aunque el xiloglucano sea una fracción sustancialmente pequeña en las paredes de gramíneas, como sugieren algunos autores (Uozu *et al.*, 2000). O bien, que metabolizaran otra hemicelulosa similar al xiloglucano, puesto que este no muestra una presencia generalizada en todos los grupos vegetales. El **Grupo 2** contiene dos o tres exones y el **Grupo 3** esta compuesto por cuatro o cinco. El **Grupo 4** se constituye a partir del Grupo 1 en función del análisis filogenético que sea aplicado y los miembros comparados, por ello comparten sus características y difieren en la zona carboxi terminal. La mayoría de las XTHs comparten una secuencia conservada DEIDFEFLG, que se considera constituye el centro catalítico tanto de las actividades hidrolasas como de las transferasas (Okazawa *et al.*, 1993; Campbell y Braam, 1998). Este motivo se encuentra localizado en el tercer exón del Grupo 1, 3 y 4 y en el segundo del Grupo 2. Otra estructura característica de la familia es la secuencia inicial del primer exón, la cual codifica un péptido señal responsable de su secreción al apoplasto (Campbell y Braam, 1998 y 1999 a; Yokoyama y Nishitani, 2001). Aunque en tomate se han detectado isoenzimas pertenecientes al Grupo 3 donde el resultado de la modelización predictiva de su excreción tuvo como destino la membrana (Saladie *et al.*, 2006). Además,

existen 4 residuos de cisteína altamente conservados en el extremo carboxilo terminal que son potenciales sustratos de enlaces disulfuro tanto intra como intermoleculares (Campbell y Braam, 1999 a).

Obviamente, las **divergencias filogenéticas** reflejan una evolución de los subgrupos con **diferentes mecanismos bioquímicos**, como son las dos actividades enzimáticas. Así, miembros del Grupo 1 (*AtXTH4*) y del Grupo 2 (*AtXTH22*), muestran exclusivamente actividad transglucosilasa entre xiloglucanos *in vitro* (Nishitani y Tominaga, 1992; Xu *et al.*, 1996; Campbell y Braam, 1999 a), aunque en el primero alguna isoenzima cuenta con actividad enzimática XET y XEH (Schroder *et al.*, 1998). El Grupo 1 se asocia con la elongación celular rápida, aunque existe alguna excepción (Rose *et al.*, 2002). Mientras que la actividad de las isoenzimas del Grupo 3 es más heterogénea, puesto que, como *AtXTH31*, puede catalizar la actividad xiloglucano endohidrolasa (de Silva *et al.*, 1993; Fanutti *et al.*, 1996; Tabuchi *et al.*, 2001) o bien desarrollar una actividad transglucosilasa (Farkas *et al.*, 1992; Fanutti *et al.*, 1996). Otros autores proponen la posibilidad de que todos los miembros puedan ejercer ambas actividades enzimáticas, pero que su regulación discrimine o priorice entre una u otra (Saladie *et al.*, 2006). La existencia de un elevado número de genes codificando la misma actividad enzimática cuestiona una serie de aspectos que revelan la existencia de una redundancia para desempeñar varias funciones fisiológicas, lo que implicaría una notable importancia de las mismas, o por el contrario una función diferencial de cada una de las enzimas que no ha sido aún esclarecida (Rose *et al.*, 2003). Sin embargo, el análisis de las secuencias, revela que muchos de los miembros de la familia XTHs muestran una especificidad de órgano o tejido, como por ejemplo, varios miembros del Grupo 2, predominan en raíces, silicuas o nervios, además de responder diferencialmente a las hormonas vegetales, mostrando una regulación frente a auxinas, giberelinas, brasinólidos y ácido abscísico (Yokoyama y Nishitani, 2001), lo cual corrobora los resultados de una expresión diferencial en respuesta a estímulos ambientales (Xu *et al.*, 1996; Akamatsu *et al.*, 1999).

Actualmente se han identificado más de 33 secuencias génicas en *Arabidopsis thaliana* L. (Yokoyama y Nishitani, 2001) que codifican para otras tantas proteínas pertenecientes a esta familia, mientras que en *Solanum lycopersicum* L. se han descrito 12 secuencias completas. En monocotiledóneas, como por ejemplo el arroz, se han encontrado 29 miembros de la familia, demostrando su elevada importancia incluso en las paredes con cantidades bajas de xiloglucano (Uozu *et al.*, 2000). Estas enzimas están adscritas a la **familia 16 de glicosilhidrolasas**, GH16 (Yokoyama y Nishitani, 2001) (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/fam/GH16.html>) actuando específicamente frente al xiloglucano. Últimamente se ha discutido la posibilidad de que también pueda actuar frente a glucuronoarabinosilano que es el polisacárido que une las microfibrillas de celulosa en las gramíneas.

La reacción enzimática

Evidencias químicas demuestran que la unión entre polisacárido-enzima se produce mediante un enlace glucosil ester, donde probablemente intervenga un grupo COOH y un residuo de asparagina del centro activo. La habilidad de mantener esta unión durante minutos u horas, constituye la base metodológica de purificación del complejo para el estudio de la actividad enzimática XET (Steele y Fry, 1999; Sulova y Farkas, 1999). Se ha estudiado la preferencia de la XET frente al xiloglucano donador, encontrándose comportamientos contradictorios. Se describió que la velocidad enzimática era mayor cuanto mayor era la masa molecular de la cadena de xiloglucano (Nishitani y Tominaga, 1992) o bien que estaba influida por las cadenas laterales adyacentes a la glucosa sin sustituir donde se realiza el corte (Fanuti *et al.*, 1996). Otros ensayos muestran que, tras el análisis de diez isoenzimas, los cortes se realizan estocásticamente en la cadena de xiloglucano (Steele *et al.*, 2001), mientras que en otro trabajo una de las cuatro transformaciones génicas de la enzima, mostraba una dependencia de la fucosa del xiloglucano para el corte (Campbell y Bramm, 1999 b). Si analizamos la especificidad de la enzima por la molécula receptora, la variabilidad es mucho mayor. Mientras que algunas XET prefieren

cadena de menos de 16 glucosas en el esqueleto (Takeda *et al.*, 1996) otras requieren cadenas largas (Purugganan *et al.*, 1997). Y mientras algunas prefieren oligosacáridos sin fucosilar, otras los necesitan fucosilados (Campbell y Braam, 1999 b). También se determinó que la estructura mínima que actúa como oligosacárido receptor es la XXG, siendo necesarios los dos residuos de xilosa (Lorennes y Fry, 1993).

Caracterización cristalográfica de la enzima

El estudio cristalográfico de la enzima ha permitido realizar un análisis funcional y filogenético mostrando la descripción más exhaustiva de esta enzima (Johansson *et al.*, 2004). De modo que la proteína de ≈ 32 kDa (Nishitani y Tominaga, 1992; Steele y Fry, 1999), cuenta con un giro β característico de la familia GH16 y similitudes con el centro reactivo de la familia GH7, compuesto por 2 cadenas β antiparalelas formando el giro β consistente en una cara convexa y otra cóncava que contiene el sitio de unión al sustrato (azúcar). Análisis de SDS-PAGE (Campbell y Braam, 1998) y de cromatografía de permeación en gel, indican que la XTH se encuentra en forma de monómero con un tamaño que oscila entre 6.5-10.0 nm (Baron-Epel *et al.*, 1988), los cuales serían capaces de difundir por los poros de la membrana y posibilitarían su actuación a ambos lados de la misma. Pese a esta capacidad, no parece que la XTH se transporte por la ruta simplástica a través de plasmodesmos, ni que actúe en la cara citoplasmática de la membrana.

Implicación de la XTHs en diversas funciones

Se ha postulado que las XTHs participan en numerosas funciones (Rose *et al.*, 2002):

- **Pérdida de rigidez de la pared celular:**

- La primera función es la más estudiada, puesto que permite la **elongación** y **crecimiento** celular, hecho que se ha estudiado en multitud de especies

vegetales como en *Arabidopsis* (Antosiewicz *et al.* 1997; Vissenberg *et al.*, 2000), tabaco (Vissenberg *et al.*, 2000), tomate (de Silva *et al.*, 1994; Catalá *et al.*, 2000), arroz (Uozu *et al.*, 2000), zanahoria (Hetherington y Fry, 1993), guisante (Potter y Fry, 1993), maíz (Pritchard *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1996), lechuga y pepino (Potter y Fry, 1994).

- Implicada en el **crecimiento** de las **raíces laterales** (Medford *et al.*, 1991, Xu *et al.*, 1995; Antosiewicz *et al.*, 1997; Vissenberg *et al.*, 2000).

- **Integración de xiloglucano en la pared celular:**

- La **integración** de **nuevo xiloglucano** en la pared (Thompson y Fry, 2001).

- La formación de **aerénquima** en raíces (Saab y Sachs, 1996).

- Formación de los **espacios aéreos** del mesófilo (Antosiewicz *et al.*, 1997).

- Interviene en el **refuerzo de las paredes**, sobre todo de haces conductores (Medford *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1995; Antosiewicz *et al.*, 1997; Vissenberg *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2003).

- **Orientador** de las **fibras** de xiloglucano que no contemplan enlace con la celulosa (Thompson y Fry, 1997), particularmente durante la formación del xilema (Bourquin *et al.*, 2002; Matsui *et al.*, 2005).

- En la respuesta a **perturbaciones mecánicas** como el viento o contactos físicos (Braam y Davis, 1990; Xu *et al.*, 1995).

- **Degradación de la pared celular:**

- Además influye en la **degradación de la pared celular** (Rose y Bennett, 1999) en procesos como el ablandamiento de los frutos durante la maduración (Redgwell y Fry, 1993; Maclachlan y Brady, 1994; Saladie *et al.*, 2006).

- Procesos de **abscisión** (Xu *et al.*, 1995).

- **Movilización de reservas:**

- La hidrólisis de glucanos en la **movilización de reservas** durante la **germinación** (Reid, 1985; Farkas *et al.*, 1992; Fanutti *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2002).

Hidrolasas: exo-glicanasas y endo-glicanasas

Dentro del grupo de las hidrolasas, nos encontramos con las **glicanasas**, las cuales catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos de las hemicelulosas de la pared celular, bien cortando en los extremos no reductores y liberando uno a uno los restos (exoglicanasas o glicosidasas), o bien cortando en el interior de la cadena (endoglicanasas) (Brummell y Harspter, 2001). Una de estas endoglicanasas es la endo- β -(1 \rightarrow 4)-glucanasa que rompe los enlaces β -(1 \rightarrow 4) entre dos restos de glucosa, como los que se encuentran en la celulosa no cristalina y el xiloglucano. Estas enzimas tienen múltiples isoformas.

Poligalacturonasas.

Las poligalacturonasas realizan cortes en los polímeros de ácido poligalacturónico, depolimerizando y solubilizando pectinas. Su acción puede ser tipo exo o endo. Las exopoligalacturonasas eliminan unidades de ácido galacturónico del extremo no reductor, mientras que las endopoligalacturonasas cortan al azar en mitad del polímero. Su acción se ve activada por la disminución de pH provocado por otras enzimas, como las pectin metil-esterasas. La actuación de la poligalacturonasa es muy notable durante la maduración de frutos, ya que el 2% de los poli(A)⁺ RNA totales producidos durante este proceso, pertenecen a la enzima (Dellapenna *et al.*, 1987). La enzima fue propuesta como la máxima responsable del ablandamiento de los frutos. Sin embargo, frutos con expresión antisentido de la enzima (Smith *et al.*, 1990) o la expresión ectópica en frutos no maduros (Giovannoni *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 2000) indican que la poligalacturonasa por si sola, no es suficiente para la pérdida de firmeza durante la maduración de los frutos (Brummel y Labavitch, 1997).

Pectín metil-esterasas

Son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster-carboxílicos. Estas enzimas desempeñan un papel importante durante la maduración de los frutos, puesto que eliminan los grupos metilo del carbono 6 de los residuos del ácido galacturónico de las pectinas. De este modo, elevan su carga negativa, posibilitando la formación de nuevos puentes de calcio entre ellas, o bien forzando su separación al aumentar la relajación de las capas de polisacáridos y la accesibilidad de otras enzimas como las poligalacturonasas (Koch y Nevins, 1989).

Existen otros dos tipos de enzimas que pueden hidrolizar enlaces **éster-fosfato** (**fosfatasas**) y enlaces **peptídicos** (**proteasas**) de la pared celular.

Oxidoreductasas: peroxidasas.

Las **oxidorreductasas** son enzimas que oxidan el sustrato utilizando peróxido de hidrógeno o hidroperóxidos orgánicos. Suelen actuar sobre los residuos fenólicos siendo las responsables de la lignificación de la pared, de la formación de los puentes de isoditrosina y de puentes difenil (Fry, 1982). Además, suelen realizar funciones de detoxificación de radicales libres. De este modo, las peroxidasas se han correlacionado negativamente con la tasa de expansión celular, sugiriendo que inhiben la relajación de la pared (MacAdam y Grabber, 2002).

La pared celular protagonista del crecimiento y expansión celular de la planta

Los cambios en la morfología de los tejidos y órganos que tienen lugar durante el crecimiento y desarrollo de la planta, están controlados por la división celular junto con las modificaciones y reorganizaciones de los componentes de la pared primaria y con la síntesis e inserción del nuevo material entre los componentes de las paredes ya existentes (Fry, 1988). Las paredes primarias de

las células en crecimiento son capaces de aguantar tensiones en la planta de entre 100-1000 atmósferas, ocasionadas por la presión de turgencia, que es la fuerza que controla el crecimiento y que permite el incremento en volumen del protoplasto. Por lo tanto, se debe establecer un compromiso entre una relajación enzimáticamente controlada de la pared para que permita el crecimiento impulsado por la presión de turgencia, para después volver a recuperar su estructura y rigidez (Carpita y Gibeaut, 1993). Además de controlar el crecimiento, la pared condiciona su dirección principalmente por la disposición de las microfibrillas de celulosa. Sin embargo, los factores bioquímicos y físicos que regulan la modificación y expansión de la pared celular primaria no están totalmente esclarecidos, pese a que se conocen polímeros y enzimas que cumplen un papel destacado tanto en el desarrollo programado genéticamente, como en respuesta a estímulos ambientales como puedan ser el pH, sequía, luminosidad o el potencial redox (Cosgrove, 2000). Así, se pueden clasificar los agentes primarios de pérdida de rigidez como las enzimas, proteínas o iones que afectan directamente a la expansión de la pared, y como agentes secundarios a los que catalizan la respuesta de los anteriores, pero sin la posibilidad de permitir por sí mismos el crecimiento (Cosgrove, 1999). La red tridimensional formada por la celulosa y hemicelulosas (xiloglucano) es la estructura donde probablemente se produzcan los cambios que permitan la elongación de la pared, dejando la red de pectinas en segundo plano, la cual puede sufrir alteraciones indirectas, resultado de las provocadas en la red anterior (Cosgrove, 1997).

De modo que durante la expansión de la pared celular, el xiloglucano que mantiene unidas a las microfibrillas de celulosa, se soltaría. Este proceso podría darse por la ruptura de los puentes de hidrógeno que unen el xiloglucano a la celulosa, o bien, se rompería su cadena, permitiendo la separación de la celulosa y por lo tanto la extensión de la pared. Asimismo, el desglose del xiloglucano se vería aumentado por el tratamiento con auxinas (Nishitani y Masuda, 1981). En el modelo físico de crecimiento, donde se estudia la influencia de las características termodinámicas de los enlaces de hidrógeno (Veystman y Cosgrove, 1998), se predice la abundancia y tamaño del xiloglucano unido que

debería ser modificado para permitir la elongación. Así, experimentos en los que se ha modificado el tamaño del xiloglucano en células en crecimiento (Takeda *et al.*, 2002), han confirmado las predicciones de este modelo físico.

El crecimiento y elongación celular, al igual que todos los procesos fisiológicos, se encuentran estrechamente regulados por la sensibilidad de los tejidos a una combinación de hormonas (Bishopp *et al.*, 2006). De hecho, estas fitohormonas ejercen una notable influencia sobre la expresión de los genes que codifican para las enzimas encargadas de llevar a cabo estos procesos, como por ejemplo, la XTH. Por ello, las auxinas, giberelinas y brasinosteroides, influyen en la expresión de los genes que promueven el crecimiento, activando su expresión, mientras que el ácido abscísico o el etileno, actúan como reguladores negativos (Xu *et al.*, 1995 y 1996; Catala *et al.*, 1997; Cui *et al.*, 2005; Yuna *et al.*, 2005).

Asimismo, la expansión de la pared celular necesita de un equilibrio entre **elongación, síntesis e integración**, con el objetivo de dar respuesta al crecimiento rápido que se produce en segundos o milésimas (Cosgrove, 1981). Este, está basado en cambios rápidos de extensibilidad sin alteraciones significativas en la composición o estructura de la pared. Para explicar la **pérdida de rigidez** de la pared se han propuesto 4 mecanismos:

- **Radicales hidroxilo**, ($\bullet\text{OH}$), que desde hace un tiempo se les ha relacionado con el crecimiento (Fry, 1998; Schopfer *et al.*, 2002). La hipótesis se basa en que los radicales pueden cortar los polisacáridos de la pared no enzimáticamente, obteniendo un átomo de hidrógeno. Sin embargo, los niveles de radicales libres son dependientes de auxinas, puesto que estos radicales catabolizan el ácido indolacético mediante descarboxilación oxidativa, mermando su concentración. También se ha propuesto que los radicales se obtengan vía iones de cobre o bien mediante las peroxidasas. Aunque, la influencia de estos radicales sería de un 1% frente al 40-100% de la influencia del crecimiento ácido. Tampoco podemos olvidar la importancia que los quelantes de Ca^{+2} y los enlaces borato producen en la regulación de la maduración (Dumville y Fry, 2003).
- Las **expansinas** son proteínas que seguramente catalizan la rotura puntual de puentes de hidrógeno existentes entre el glucano de las microfibrillas de

celulosa y las cadenas de xiloglucano (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995). Aunque no tienen actividad hidrolítica ni transglucosilasa, ni modifican la distribución de la masa molecular media, ni la viscosidad de los polisacáridos de la pared, son las únicas proteínas descritas que pueden inducir la extensión de la pared *in vitro* (Cosgrove, 2000). Su mecanismo de actuación se basaría en la rotura puntual de los puentes de hidrógeno entre las cadenas de glucano de las microfibrillas y el xiloglucano, de modo que al estar la pared celular sometida a tensión, los puentes de hidrógeno se podrían formar instantáneamente en otra posición, lo que ayudaría a fijar la extensión. La acción de las enzimas es dependiente del pH y se encuentran activadas a pH fisiológico de entre 4.5 y 6.0, característicos de células en crecimiento (Li *et al.*, 2003). Este pH sirve de control del crecimiento mediante la H⁺-ATPasa, integrada en la membrana plasmática. Además, estudios genéticos de las secuencias de las expansinas han mostrado su relación con el crecimiento de ciertos tipos celulares, maduración de los frutos, la abscisión y la polinización (Choi *et al.*, 2006).

- La acción puntual de las **endo-β-(1→4)-D-glucanasas** rompería la cadena de xiloglucano, permitiendo la separación de las microfibrillas. Se cree que estas enzimas favorecen la actuación de otras, haciendo más accesible el xiloglucano al degradar la celulosa paracristalina (Ohmiya *et al.*, 2000). Esta enzima cuenta con varias isoformas que, en tomate, se presentan a lo largo de todo el desarrollo del fruto, disminuyendo en los frutos sobremaduros (Maclachlan y Brady, 1994).

- La acción de la **XET** permite alargar las cadenas de xiloglucano separando las fibras de celulosa, puesto que realiza cortes en el xiloglucano e incorpora el extremo reductor generado a otro no reductor de una nueva cadena de xiloglucano. Este hecho, permite la incorporación de nuevo material, el cual es imprescindible para el crecimiento y elongación celular. Esta enzima también puede actuar como endohidrolasa (XEH), cortando la cadena donadora de xiloglucano y usando agua como aceptor.

Aunque los primeros estudios realizados sugirieron que las únicas proteínas de la pared celular capaces de inducir un aumento en la extensibilidad eran las

expansinas (Cosgrove, 1989; McQueen-Mason *et al.*, 1993), estudios posteriores pusieron de manifiesto el efecto de la actividad enzimática XET sobre la **extensibilidad**. Así, en paredes aisladas de hipocótilos de judía (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi y H. Ohashi) la XET reducía la extensión de las mismas (Kaku *et al.*, 2004). Otros estudios realizados *in vivo*, demostraron que el metabolismo del xiloglucano está regulado por la actividad enzimática XET endógena y constituye un punto de control para la elongación celular (Takeda *et al.*, 2002), puesto que la adición de largas cadenas de xiloglucano con un elevado potencial de unión a las microfibrillas, reduce el crecimiento de los tallos de pepino en más de un 50%. Adicionalmente, los resultados obtenidos en sistemas artificiales de celulosa-xiloglucano muestran que la XTH induce el estiramiento axial (Chanliaud *et al.*, 2004).

Por otro lado, se han realizado varios estudios donde se ha observado una estimulación del crecimiento y una sustancial solubilización del xiloglucano, al añadir oligosacáridos del xiloglucano, XGOs, puesto que la enzima los usa como aceptores de la transglucosilación, obteniendo resultados similares a la actividad hidrolasa debido a la reducción de la longitud de las cadenas de xiloglucano. Pero a este resultado también se le puede achacar el uso de concentraciones de XGOs mucho más elevadas de las existentes *in vivo* (Fry, 1994). Por otra parte, se ha visualizado la actividad enzimática XET mediante el uso de XGOs marcados con fluorescencia (Fry, 1997; Ito y Nishitani, 1999). De modo que, cuando se marcaron raíces mediante este método, se encontró que la actividad enzimática XET fue máxima en la zona de elongación, además de en la zona de crecimiento de pelos radiculares y en las raíces viejas donde se incorpora xiloglucano para reforzar la pared celular en el crecimiento secundario (Vissenberg *et al.*, 2001). Los estudios moleculares posteriores mostraron que 4 genes de XTH estaban implicados en la actividad enzimática XET encontrada (Vissenberg *et al.*, 2005 b). Además, estudios recientes sitúan la fluorescencia de los XGOs junto a las microfibrillas de celulosa de células en elongación, mientras que en células en división, la señal era difusa, lo que indica que algunas isoformas de la XTH prefieren el xiloglucano unido a la celulosa y otras muestran una función menos específica. Aunque otra explicación es que

las nuevas partículas que se secretan son más accesibles a ser marcadas con la fluorescencia y se unirían a las microfibrillas de celulosa tan pronto como estas se formaran, lo cual es un proceso muy rápido en células en elongación.

Además de los cambios en elongación, síntesis e integración, la pared experimenta cambios lentos y graduales, asociados a las células maduras, donde se fortalecen las paredes con modificaciones sustanciales en la composición y las interacciones. Así, la XET realiza una función de **refuerzo y mantenimiento de la estructura** de la pared durante el crecimiento mediante la incorporación de largos oligosacáridos y por el continuo depósito de cadenas largas de xiloglucano en la cara interna de la misma, como mostraron los estudios en raíces (Vissenberg *et al.*, 2001) y en tallos de guisante (Takeda *et al.*, 2002).

La expresión génica de esta enzima en las células ubicadas en regiones donde se produce la formación de pared es muy alta, es decir, en zonas de elongación y en sitios de depósito continuo después del alargamiento o en zonas de remodelación (Hyodo *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2004; Vissenberg *et al.*, 2005 a). En las aproximaciones realizadas mediante modificación génica de los niveles de XTH (Herbers *et al.*, 2001), se pudo observar que una supresión de la expresión de la enzima en un 56% provocaba un aumento del tamaño del xiloglucano de un 20%, sin que se cuantificaran efectos sobre el crecimiento de la planta, sugiriendo que los cortes o posteriores reuniones fueran menos frecuentes y que las moléculas del xiloglucano fueran más largas, permitiendo la unión por puentes de hidrógeno a la celulosa más alejada. Cuando se obtuvo el mutante *AtXTH27* (Matsui *et al.*, 2005) se comprobó que sufría modificaciones en el desarrollo xilemático, contabilizándose un número menor y sin forma de venas terciarias, además de un acortamiento y deformación de las traqueidas (células especiales del xilema). XTH27 se expresaba en muchas zonas de la planta pero sólo se observaba fenotipo en las venas terciarias de los mutantes, lo que indica la implicación de esta isoenzima en procesos de relajación y posterior incorporación del xiloglucano en paredes secundarias.

La complejidad de la regulación probablemente sea el reflejo de la diversidad funcional de la familia génica de la XTH, puesto que las distintas isoenzimas de la XTH muestran un elevado rango de respuestas a diferentes hormonas, como las auxinas en las zonas de elongación (Catalá *et al.*, 1997 y 2001) en el desarrollo de los vasos conductores y la elongación de los entrenudos (Nakamura *et al.*, 2003). También, encontramos que la proteína XTH se encuentra regulada por giberelinas en la germinación de las semillas (Chen *et al.*, 2002) o por brasinosteroides en el desarrollo vascular durante la elongación de los hipocótilos (Oh *et al.*, 2003). Otros trabajos proponen una regulación combinada mediante giberelinas de las enzimas XTH reguladas a su vez por auxinas (Cui *et al.*, 2005).

Adicionalmente, las XTH muestran una regulación mediante estímulos ambientales abióticos, como por contacto mecánico, luz y temperatura (Xu *et al.*, 1995 y 1996) o la regulación por una mezcla de estímulos ambientales abióticos y hormonales (Lee *et al.*, 2005). Sin olvidar la respuesta frente a estímulos ambientales bióticos, como la modificación de la expresión de la enzima frente a la infección por parásitos (Albert *et al.*, 2004). De este modo, se piensa que las duplicaciones seguidas de la presión de selección ejercida por la evolución, codifican unas proteínas que no solo difieren en las propiedades enzimáticas sino que también lo hacen en su regulación (Xu *et al.*, 1996; Akamatsu *et al.*, 1999; Burstin, 2000; Uozu *et al.*, 2000; Catala *et al.*, 2001; Yokoyama y Nishitani, 2001).

Implicación de la pared celular en el ablandamiento de los frutos durante la maduración

Tras la fecundación de la flor de tomate se inicia el desarrollo del fruto donde podemos diferenciar dos fases: el **crecimiento** y la **maduración organoléptica**. En el primero, se produce la división celular intensa, la cual cesa paulatinamente a medida que comienza el alargamiento y engrosamiento celular hasta completar su crecimiento, aumentando hasta más de 10 veces el volumen celular (Coombe, 1976). La segunda fase del desarrollo comprende los

numerosos cambios organolépticos, como en sabor, textura y color (Rhodes, 1980; Seymour *et al.*, 1993), consecuencia del descenso del almidón (amilasas) y aumento de azúcares solubles (glicosidasas), la reducción de la concentración de ácidos, los cambios en la estructura de la pared celular (Fischer y Bennett, 1991), la síntesis de aromas y de algunos pigmentos y degradación de otros (Grierson *et al.*, 1987; Carrari y Fernie, 2006). Junto con todo ello, aumenta la susceptibilidad a los ataques por patógenos además de otros cambios químicos y físicos (Rhodes, 1980).

Los cambios en **textura**, se podrían resumir como la desestructuración de la red celulosa-xiloglucano junto con la solubilización de las pectinas, que combinado con la pérdida de las cadenas laterales de las mismas, provocan el aumento de la porosidad, permitiendo el acceso a las enzimas degradativas (Brummell, 2006) que actuarían junto con los mecanismos no enzimáticos (Fry *et al.*, 2001; Dumville y Fry, 2003). Estos mecanismos causan cortes en polisacáridos y alteración de proteínas inducidos por las especies reactivas del oxígeno, un efecto quelante debido a los iones de calcio y la estabilización mediante los enlaces de boro (Fry, 2004 a). Todos estos procesos responden a un programa genético predeterminado, coordinando a la perfección la diferenciación de los órganos oportunos (Fischer y Bennett, 1991; Brummell, 2006) y, entre otros, a la pérdida e incorporación de nuevo material estructural polisacárido a la pared (Tong y Gross, 1988; Cosgrove, 1997), con el objetivo último de la dispersión óptima de la semilla. Cabe destacar, que a excepción de algunas células especializadas o vasculares, la mayoría de las presentes en el frutos están sin lignificar, y por lo tanto son relativamente similares a las paredes celulares primarias (Brummell, 2006).

En los estudios moleculares llevados a cabo se ha elegido al tomate como sistema modelo de fruto climatérico, puesto que cuenta con un genoma diploide simple, de pequeño tamaño, 0.9 pg por genoma haploide, (Arumuganathan y Earle, 1991), un tiempo generacional corto (45-100 días según variedades y condiciones climáticas), una propagación fácil por semillas o clones, una alta eficiencia en la hibridación sexual, unas técnicas de

transformación rutinarias, una información genética y genómica muy amplia y colecciones de EST muy extensas (Van der Hoeven *et al.*, 2002).

La **pérdida de firmeza** se debe a la alteración de la turgencia celular y a la progresiva solubilización de las pectinas insolubles de la lámina media que cementa y unen las células y de las hemicelulosas, de modo que se pierde la consistencia en los tejidos. La **solubilización de las pectinas** se lleva a cabo por una actuación secuencial de la pectin metil-esterasa (PME) que hidroliza los radicales metilo de las pectinas. Esta enzima comienza a expresarse antes del inicio de la maduración regulada por el etileno (Tieman *et al.*, 1992). A su vez, actúa la poligalacturonasa, la cual se ve activada por la acidificación del pH provocado por la pectin metil-esterasa. La poligalacturonasa constituye una de las enzimas más importantes durante la maduración, aunque varios estudios indican que esta enzima por sí sola no es suficiente para la pérdida de textura propia de la maduración (Brummel y Labavitch, 1997).

Además de las enzimas que metabolizan las pectinas, encontramos otras que hacen lo propio con las **hemicelulosas**, como las endo- β -(1 \rightarrow 4)-glucanasas (Maclachlan y Brady, 1994). Asimismo, otro estudio identifica la relación de una β -galactosidasa, inducida por etileno, con el ablandamiento (Smith *et al.*, 2002) y una expansina que actúa en procesos de crecimiento del fruto y en las modificaciones de firmeza que acompañan a la maduración del mismo (Rose *et al.*, 1997; Brummel *et al.*, 1999). También se ha propuesto la actividad XET, para explicar la depolimerización del xiloglucano durante la maduración y ablandamiento, aunque no se han encontrado evidencias claras. Además, se ha sugerido la regulación de la XTH mediante etileno en frutos no climatéricos (Redgwell y Fry, 1993; Schroder *et al.*, 1998). Adicionalmente, se han encontrado valores elevados de actividad enzimática XET en los frutos verdes (Catalá *et al.*, 2000; Saladie *et al.*, 2006), implicando a la enzima en procesos de división, expansión celular y crecimiento del fruto, pero no en la maduración directamente, aunque podría jugar un papel de mantenimiento en este proceso incorporando nuevo xiloglucano a la pared (Brummell y Harpster, 2001). Si bien es cierto que otros autores han encontrado valores máximos de expresión

en el estadio naranja, disminuyendo hasta la maduración (Arrowsmith y de Silva, 1995) y se han encontrado XTH con actividad hidrolasa (XEH) en la maduración de los frutos (de Silva *et al.*, 1993; Arrowsmith y de Silva, 1995).

Otras enzimas destacables son las peroxidasas que influyen tanto en el crecimiento del fruto, como en frenar la pérdida de firmeza propia de la maduración mediante la formación de los puentes diéster (Thompson y Fry, 2001; Andrews *et al.*, 2002). Todo ello acompañado por un descenso en el pH de los espacios de la pared celular y un aumento de la concentración de algunos iones (Almeida y Huber, 1999). Terminada la fase de maduración, el fruto pierde turgencia, aumenta su sensibilidad al medio, pierde el control metabólico y comienza su senescencia.

Implicación de la pared celular en el ataque por patógenos

Existen numerosos estudios que exponen claramente cómo las plantas se protegen frente al ataque por patógenos, subrayando la importancia que juega la pared celular como barrera protectora natural en este proceso (Juge, 2006). Aunque la pared celular es extremadamente efectiva contra el ataque por patógenos, en ocasiones, mediante una herida o golpe, se rompe y permite que estos agentes bióticos se introduzcan al interior de la planta. Además, muchos de los fitopatógenos producen una batería de enzimas capaces de degradar los polímeros de la pared celular como las pectinas y hemicelulosas (Collmer y Keen, 1986; Walton, 1994; Annis y Goodwin, 1997), permitiendo el avance de la infección.



**OBJETIVOS
Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO**

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Como hemos descrito a lo largo de la introducción, la actuación de la enzima xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa en numerosos procesos fisiológicos, describe patrones de actuación muy variables, de modo que se produce la necesidad de un estudio en profundidad de la implicación de la proteína XTH en estos procesos. Por ello, el **objetivo general** de este trabajo se basó en la **caracterización fisiológica, bioquímica y molecular de la enzima xiloglucano endotransglucosilasa / hidrolasa**, utilizando *Solanum lycopersicum* L. como sistema de estudio.

Como **primer objetivo parcial** nos propusimos estudiar la participación de la **XET** en el **crecimiento de plantas, elongación y expansión celular**. Como se ha descrito previamente, en las paredes celulares Tipo I se disponen tres redes entrecruzadas que la definen y, por lo tanto, determinan su comportamiento frente a los procesos fisiológicos donde la pared celular esta implicada. A lo largo de la elongación, expansión y crecimiento celular, la red celulosa-xiloglucano controlará este proceso, y por lo tanto, el xiloglucano será uno de los componentes responsables del mismo. En consecuencia, la XET adquiere un papel relevante, ya que actuará sobre el xiloglucano que une a las microfibrillas de celulosa o sobre las interacciones que se establecen en y con esa red, mediante la realización de cortes y posteriores uniones entre estos polímeros. Para poder estudiar la implicación de la XET en la elongación, expansión y crecimiento de las plantas, se utilizaron dos estadios de desarrollo vegetativo. En primer lugar se usaron **plántulas etioladas**, con el objetivo de esclarecer la participación de la XET en este proceso de extensión y relajación de la pared celular primaria. Y en segundo lugar, usamos **plantas de 12 hojas**, en las que existe crecimiento primario y secundario, con el objetivo de dilucidar la contribución de la XET, tanto en el crecimiento de las paredes primarias

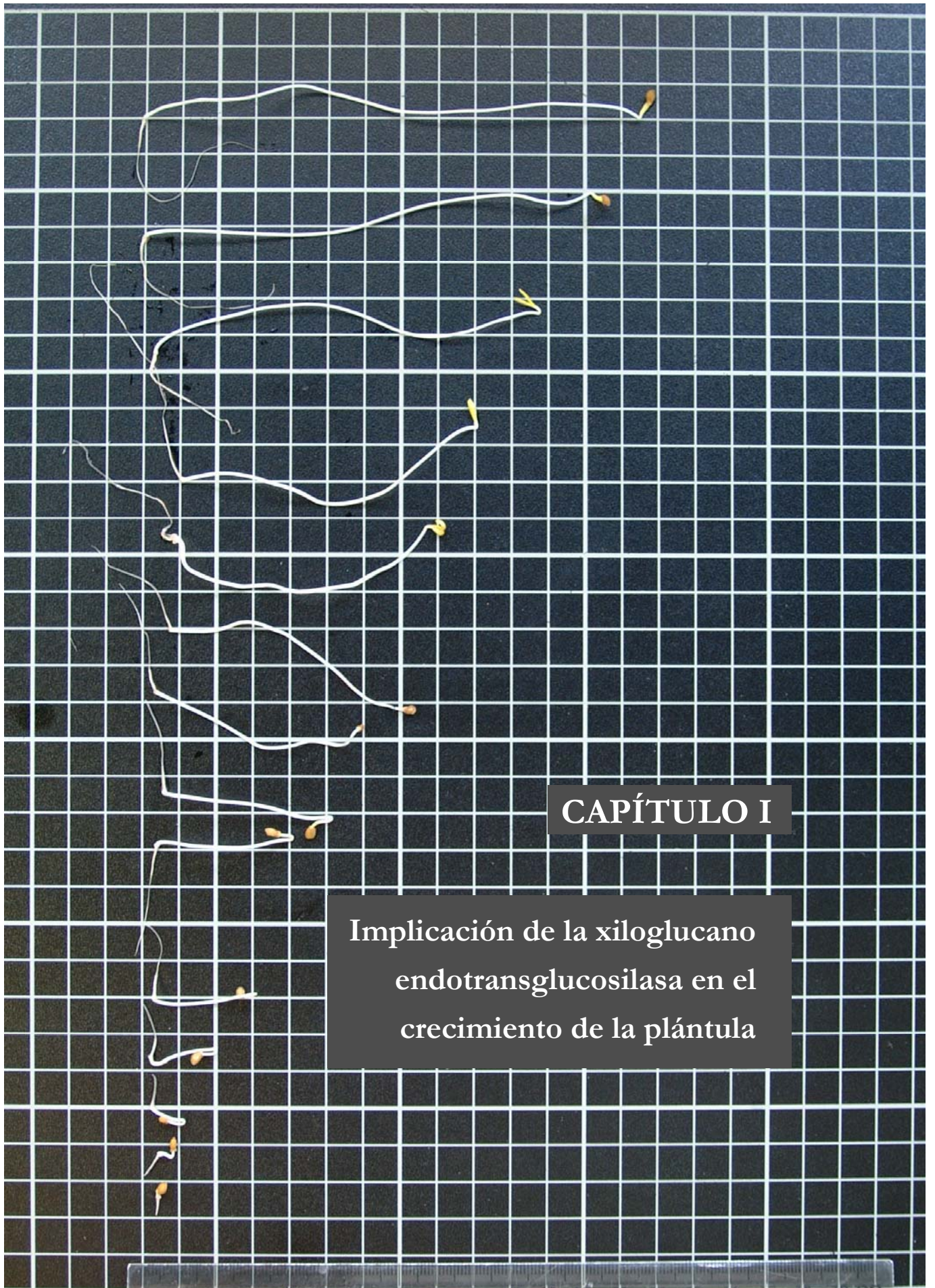
como secundarias. Las plántulas y plantas de tomate que se utilizaron fueron de la variedad Money Maker silvestre, así como de dos líneas transgénicas que mostraban niveles de expresión de la *SXTH1* alterados. Nuestro propósito fue estudiar la implicación de la actividad enzimática XET a lo largo del crecimiento de las plántulas y plantas silvestres, además de su comportamiento en comparación con las dos transgénicas. También se estudiaron las características de expresión génica, enzimáticas y fenotípicas de los dos estadios de desarrollo de las plantas, junto con su respuesta frente a la extensibilidad de la pared.

Adicionalmente, se estudió la respuesta que se produce en el crecimiento celular de las plántulas y plantas, cuando se les somete a estreses abióticos, como el hídrico, salino y térmico. Con ello, intentamos esclarecer la implicación de la pared celular en general y de la XET en particular, bajo la presión de factores ambientales abióticos.

El **segundo de los objetivos parciales**, se basó en esclarecer la implicación de la **XET** en el **crecimiento y ablandamiento de los frutos**. El principal proceso que ocurre durante el desarrollo de los frutos es, la degradación de las pectinas de la lámina media y de las hemicelulosas de la pared celular de los frutos. Esta degradación se produce mediante numerosas enzimas hidrolíticas. Varios estudios muestran una estrecha relación de los niveles de XET con el crecimiento de los frutos y su maduración, por ello estudiamos su participación en la definición de la estructura del xiloglucano y su implicación en las modificaciones de las hemicelulosas de la pared celular que ocasionan el ablandamiento de los frutos. Se utilizaron los frutos de las plantas de tomate variedad Money Maker silvestre, así como de dos líneas transgénicas que mostraban niveles de expresión de la *SXTH1* alterados. Nuestro objetivo se centró en estudiar la implicación de la actividad enzimática XET a lo largo del crecimiento y de la maduración de los frutos silvestres, además de su comparación con los dos frutos transgénicos.

El **tercero de los objetivos parciales** consistió en estudiar el papel de las **enzimas** implicadas en el **metabolismo de la pared celular de frutos durante la infección por un patógeno fúngico** y en particular, la implicación de la **XET**. La pared celular constituye la barrera natural de los frutos frente a los patógenos, pero cuando se inicia la infección, bien mediante una herida o por algún agente biótico, se desencadenan una multitud de procesos en los que la pared celular y su maquinaria enzimática toman parte activa. Se utilizaron manzanas de la variedad Golden y tomates de la variedad Canario y Money Maker silvestre y transgénicos. Se investigó la participación de la batería enzimática de la pared celular en los diversos aspectos de la degradación de la pared celular durante la infección fúngica y más detalladamente, el comportamiento de la familia de las XTHs.

El **último objetivo parcial** se basó en estudiar la posible **regulación de las XTHs por etileno**. El etileno interviene en diversos procesos fisiológicos como la maduración de los frutos climatéricos y la respuesta a la infección por patógenos. Nos propusimos estudiar el efecto del etileno sobre la expresión de las XTHs y la actividad enzimática XET, para poder determinar la posible implicación de las XTHs en la modulación de las respuestas mediadas por el etileno. Se utilizaron los frutos de tomate de la variedad Money Maker, así como tomates de la variedad Canario.



CAPÍTULO I

Implicación de la xiloglucano
endotransglucosilasa en el
crecimiento de la plántula

INTRODUCCIÓN

La pared celular primaria es la encargada de limitar el tamaño y volumen celular, así como de controlar el crecimiento. Por acción de numerosas enzimas, que actúan sobre las redes estructurales de la pared, se reduce el grado de rigidez, permitiendo la extensión provocada por la presión de turgencia para, a continuación, volver a fijar con nuevos enlaces los componentes existentes y los sintetizados de *novo*. La relajación de estas redes posibilitará y determinará la dirección del crecimiento (Emons y Mulder, 2000).

Se han postulado **tres sistemas** capaces de producir pérdida de rigidez, como son las **endo- β -(1 \rightarrow 4)-D-glucanasas** que rompen cadenas de xiloglucano, las **expansinas** que rompen los puentes de hidrógeno entre xiloglucano-celulosa y por último la acción de la **XET**, que es la única enzima capaz de realizar cortes en el xiloglucano e incorporar nuevas cadenas del polímero, fijando la estructura y manteniendo el crecimiento. Como cuarto factor se añaden los radicales libres, necesarios para el crecimiento y elongación celular (Cosgrove, 2005).

Desde que se describió la **actividad enzimática XET** se han encontrado numerosas evidencias que relacionan la expresión génica y/o la actividad enzimática con el **crecimiento, elongación y expansión celular** en multitud de especies vegetales de monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, como *Arabidopsis*, tabaco, tomate, arroz, pepino, lechuga, zanahoria y guisante (Campbell y Braam, 1999 a; Rose *et al.*, 2002).

La XET ha sido localizada principalmente en las zonas de crecimiento y elongación de los hipocótilos, en las hojas en expansión desde el meristemo apical del hipocótilo, en los primordios de las raíces laterales y durante el desarrollo de los tejidos vasculares (Xu *et al.*, 1995 y 1996; Antosiewicz *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 2002).

Además, la **expresión de los genes de la XTH** esta regulada diferencialmente en los tejidos que experimentan un rápido crecimiento en respuesta a las fitohormonas. De este modo, brasinosteroides, giberelinas, ácido abscísico y auxinas, actúan ejerciendo un control y regulación sobre la expresión de varios genes de la XTH o/y la actividad XET (Potter y Fry, 1994; Xu *et al.*, 1995 y 1996; Catala *et al.*, 1997; Oh y Clouse, 1998; Cui *et al.*, 2005).

Sin embargo, existen ensayos donde no se ha correlacionado totalmente el aumento de la actividad XET con el crecimiento, sino con zonas donde ha cesado este proceso (Potter y Fry, 1993; Pritchard *et al.*, 1993; Potter y Fry, 1994; Zurek y Clouse, 1994; Palmer y Davies, 1996; Smith *et al.*, 1996; Barrachina y Lorences, 1998; Herbers *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005), o bien durante la formación de la pared secundaria (Bourquin *et al.*, 2002) y en algunos casos específicos donde genes XTHs han sido inhibidos durante el crecimiento rápido (Catala *et al.*, 2001), indicando que quizá no sea tan simple la relación entre la proteína XTH y el crecimiento.

El proceso de crecimiento y elongación celular provoca una serie de modificaciones en la pared celular que se traducen en una alteración de las **propiedades viscoelásticas** de la misma (Kaku *et al.*, 2002; Takeda *et al.*, 2002). Los cambios en estas propiedades podrían ocasionar una respuesta diferencial frente a los procesos fisiológicos de expansión y elongación celular. En un ensayo realizado *in vitro*, donde se aplicó la enzima purificada a hipocótilos, se mostró la incapacidad de la actividad XET para inducir la extensión de las paredes celulares aisladas (McQueen-Mason *et al.*, 1993). Mientras que otros autores, sugieren que la XET es la que relaciona crecimiento y extensibilidad de forma indirecta, puesto que existen otros trabajos que muestran como los **XGOs** aportados exógenamente promueven el crecimiento (McDougall y Fry, 1990; Cutillas-Iturralde y Lorences, 1997; Kaku *et al.*, 2004), lo cual ocasiona adicionalmente la relajación de la pared celular y el aumento de la extensibilidad de la misma (Kaku *et al.*, 2002; Takeda *et al.*, 2002). Sin embargo, la forma hidrolítica de la XTH (XEH) no está activada por los XGOs, mientras que la forma que transglucosila de la XTH (XET) aumenta la

extensibilidad al doble en presencia de XGOs (Kaku *et al.*, 2004). Por otro lado, en un trabajo realizado con la actividad hidrolasa XEH *in vitro*, pone de manifiesto la reducción de la extensibilidad de la pared, apuntando que la purificación de la enzima del trabajo de McQueen-Mason, posiblemente contuviera actividad exclusivamente XEH (Kaku *et al.*, 2002). De modo que, bajo condiciones normales de crecimiento, la actividad XEH podría regular la extensibilidad de la pared y producir XGOs que más tarde participarían en la regulación de la extensibilidad de la pared, que llevaría a cabo la actividad XET (Kaku *et al.*, 2004). Sin embargo, no podemos olvidar que la concentración de XGOs endógena en el apoplasto es de 0,1 μM (Fry, 1994).

Por otro lado, si la incubación se realizaba con cadenas largas de xiloglucano en lugar de con XGOs se ocasionaba una disminución de la extensibilidad de la pared, mediada por la proteína XTH, presumiblemente por la formación de uniones intermicrofibrilares (Rose *et al.*, 2002).

La influencia de los **estreses abióticos** sobre las plantas afecta al crecimiento de las mismas y por ello, a la pared celular y a las enzimas implicadas en la bioquímica de la misma. Para que se produzca la expansión celular, la presión de turgencia debe ser máxima, lo que no ocurre si existe un potencial hídrico bajo. Así, en hipocótilos, la inhibición de la elongación por bajos potenciales hídricos es muy rápida (Nonami y Boyer, 1990 a y 1990 b) y se debe a la disminución de la extensibilidad de la pared (Michelena y Boyer, 1982). Mientras, en las raíces no es tan notable (Pritchard *et al.*, 1993) o bien se incrementa la extensibilidad de la pared hasta potenciales mucho menores (Spollen *et al.*, 1993), puesto que las raíces son menos sensibles a la inhibición del crecimiento por bajos potenciales hídricos (Wu *et al.*, 1996 y 2000). Un elevado número de estudios muestran como la composición de la pared celular se ve muy afectada por los tratamientos de estrés salino o hídrico (Wakabayashi *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 2005). Prueba de ello, es la inhibición de la síntesis de celulosa (Sweet *et al.*, 1990), o la inducción de la α -galactosidasa (Dani *et al.*, 2005) en sistemas vegetales con bajo potencial hídrico.

Diversos trabajos relacionan la actividad XET con **estreses hídricos y salinos** (Wu *et al.*, 2000 y 2005; Cho *et al.*, 2006). En ellos, se pone de manifiesto el incremento de la actividad XET en la zona de elongación de las raíces de maíz con estrés hídrico, correlacionada con un incremento de la extensión de la pared celular (Wu *et al.*, 1994), y del aumento de las expansinas bajo las mismas condiciones (Wu *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha descrito la disminución de una actividad XET en la zona de elongación de hipocótilos de soja tratados con un bajo potencial hídrico (Wu *et al.*, 2005). Este hecho hace pensar en la estrecha relación entre las expansinas y la XET, en el control de la elongación y extensibilidad de las raíces bajo condiciones de bajo potencial hídrico.

Conjuntamente, existen varios trabajos que muestran el aumento de la expresión de una XTH en respuesta al **estrés térmico** (Xu *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 2006) o la modulación de la composición de la pared celular y de las β -glucanasas con la temperatura (Nakamura *et al.*, 2003). También se ha relacionado la acumulación de actividad XET en las células epidérmicas de los tejidos sometidos a **estrés mecánico**, ya sea por contacto físico o por efecto del viento (Braam y Davis, 1990; Xu *et al.*, 1995; Antosiewicz *et al.*, 1997) y en la formación de espacios intercelulares necesarios para la expansión celular (Saab y Sachs, 1996; Antosiewicz *et al.*, 1997).

El uso de las **plantas transgénicas**, ya sea por aumento o disminución de los niveles génicos y/o en consecuencia proteicos y de mutantes “knock-out”, constituyen una potente herramienta que permite el estudio exhaustivo de la expresión génica del gen a estudiar, su actividad enzimática y, en definitiva, su implicación en las funciones fisiológicas *in vivo*. Por esa razón y con el objetivo de estudiar la implicación de la XET en el crecimiento, se utilizaron, para la realización de este trabajo, plantas silvestres de tomate de la variedad Money Maker y dos líneas modificadas genéticamente. De entre las líneas transgénicas, una tenía aumentada la expresión del gen *SXTH1* (XET +) y la otra la tenía reducida (XET -). El único trabajo donde se utilizaron plantas transgénicas de la XET, se realizó en tabaco y se anuló la expresión del gen *NXTH1* (Herbers *et al.*, 2001). Los autores pusieron de manifiesto que un mismo gen puede

codificar tanto la forma soluble como insoluble de la enzima, puesto que la inhibición génica de la isoenzima provocaba una disminución de ambas actividades XET. Asimismo, la reducción de los niveles de expresión y actividad enzimática que codifica el gen *NXTH1*, provocaban un incremento en el grado de polimerización del xiloglucano de los tejidos vasculares, sugiriendo que ese hecho podría provocar el refuerzo de la pared celular.

En este Capítulo estudiaremos la implicación directa del gen *SXTH1* sobre el crecimiento y elongación de plántulas de tomate, la estructura y modificación del xiloglucano, así como el efecto sobre la capacidad de extensión de la pared celular.

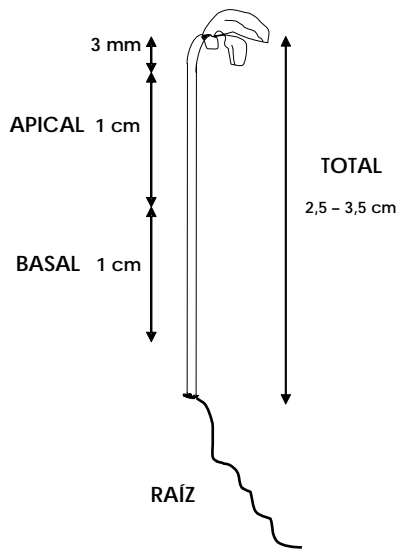
Para completar este trabajo y con el objetivo de estudiar la implicación de la XET en la alteración del crecimiento provocado por los estreses abióticos más comunes, se analizó el comportamiento de nuestras plántulas bajo los diversos tratamientos de estrés hídrico, salino y térmico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El trabajo experimental se llevo a cabo con plantas de tomate silvestre (XET S) *Solanum lycopersicum* L. variedad Money Maker y dos líneas de plantas transgénicas que tenían modificados los niveles de expresión para el gen *SXTH1* (Okazawa *et al.*, 1993; Catalá *et al.*, 1997): una que sobre-expresaba el gen *SXTH1* (XET +) y otra que tenía reprimida la expresión de *SXTH1* (XET -). Las plantas transgénicas fueron cedidas por el Profesor Sonnewald, del Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben (Alemania). Las plantas habían sido diseñadas según Herbers *et al.* (2001). De modo que se introdujo el gen *SXTH1* bajo el control del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor, CaMV 35S, y el terminador *ocs*,

de la optopina sintasa. En las plantas de las líneas que sobre-expresan el gen *SXTH1*, se comprobaron niveles superiores de este mRNA en distintos tejidos y en las líneas que tenían reprimida su expresión, no se observaron niveles de



mRNA en estos mismos tejidos. De entre las líneas obtenidas, se seleccionaron las que mostraron un comportamiento más acusado (mayor/menor expresión) y más estable espacialmente. De modo que, en la segunda generación, se eligieron las dos líneas homocigotas indicadas anteriormente (*XET⁺* y *XET⁻*). Se sembraron 150 semillas de cada una de las líneas, silvestre y transgénicas, que se dispusieron al tresbolillo en cada una de las bandejas de 43 x 28 x 7 cm, sobre 4 hojas papel de filtro humedecidas con 80 ml de agua miliQ.

Se mantuvieron en oscuridad a 25 °C y 70% de humedad relativa en una cámara de crecimiento provista de luz verde (0,02 W m⁻² a nivel de trabajo; Kodak Safelight Filter N°3, NY, EEUU) que proporcionó condiciones de oscuridad durante su manipulación experimental. En algunos experimentos, se utilizaron hipocótilos de 6 días, que alcanzaron una altura de entre 2,5-3,5 cm. Se escindieron dos partes, la apical de 1 cm de longitud, por debajo del gancho plumular y la basal de un 1 cm por debajo de la apical, como muestra el esquema adjunto.

Cinética de crecimiento de hipocótilos y raíces de la línea silvestre (*XET^S*) y las transgénicas (*XET⁺* y *XET⁻*)

Para estudiar la cinética de crecimiento de los hipocótilos de las plantas silvestres y transgénicas, se midió su altura total, desde la base de la plántula

hasta el gancho plumular de la misma. Para cuantificar la longitud de la raíz se midió desde su unión al hipocótilo hasta el meristemo radicular. En ambos casos, la toma de datos se realizó dentro de la cámara de crecimiento, bajo luz verde, y mediante el uso de una regla flexible que evitó ocasionar daños a las plántulas. Las medidas de crecimiento comenzaron a registrarse a los 4 días tras la siembra, inmediatamente después de la germinación, y se finalizaron cuando cesó su crecimiento, aproximadamente a los 12 días. Los hipocótilos fueron medidos con una frecuencia diaria y las raíces, debido a su fragilidad, tres veces por semana.

Biomasa de hipocótilos y raíces

La biomasa de los hipocótilos se determinó por pesada, cuantificando el peso fresco y seco de la raíz y el hipocótilo de la plántula. Dicha determinación se llevó a cabo usando, al menos, 200 plántulas pertenecientes a 10 siembras independientes.

Extracción de mRNA. Síntesis de cDNA. PCR cuantitativo en tiempo real

Para realizar todos los experimentos se utilizaron tres partes de plántulas de 6 días (2,5 -3,5 cm): la **apical** de 1 cm (por debajo del gancho plumular), la **basal** de 1 cm (justo por debajo de la primera) y la **raíz**.

Extracción de mRNA. Síntesis de cDNA

La extracción de mRNA se llevó a cabo mediante el kit comercial RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen. Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. El mRNA se eluyó con 30 µl de agua miliQ libre de RNAsa.

Posteriormente, se incubó durante 30 minutos con DNAsa (Promega Biotech Ibérica. Madrid, España) para evitar toda contaminación con DNA de la

muestra que pudiese interferir con la amplificación posterior. El cDNA se obtuvo usando el kit comercial 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche Applied Science. Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis se usó 3,2 μl de agua miliQ estéril, 2 μl de tampón de reacción 10X (100 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8,3), 4 μl de MgCl_2 25mM, 2 μl de dNTPs 10mM (dATP, dCTP, cTTP y dGTP), 2 μl de Oligo-p(dT)₁₅ 0,8 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$, 1 μl de RNAsa Inhibitor 50 u μl^{-1} , 0,8 μl de AMV transcriptasa inversa y 5 μl de muestra acuosa (1 μg de mRNA). El volumen total de la reacción fue de 20 μl . La reacción de síntesis se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer Ltd., Inglaterra) con un programa que constaba de 4 pasos: 1) 10 minutos a 25 °C para la unión del Oligo-p(dT)₁₅. 2) 60 minutos a 42 °C para la amplificación por la AMV transcriptasa inversa. 3) 5 minutos a 99 °C para la inactivación de la enzima. 4) se mantiene a 4 °C el cDNA hasta su congelación a -25 °C.

PCR cuantitativo en tiempo real

Para el análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativo en tiempo real, se utilizó un termociclador con detector de fluorescencia Applied Biosystems ABI Prism 7000 (Warrington, Inglaterra). Los oligonucleótidos diseñados para estudiar la expresión del gen *SXTH1* y del control interno, RPL2 (**Tabla I.1**) fueron suministrados por Proligo (E@sy Oligo™, Sigma Aldrich. Francia) con una concentración de 100 μM diluidos en agua miliQ.

La mezcla de reacción contuvo 11,5 μl de disolución acuosa de cebadores 12 μM , 1 μl de cDNA de la muestra y 12,5 μl de *PowerSYBR*® Green. El *PowerSYBR*® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems. Warrington, Inglaterra) contiene SYBR® Green fluorocromo, AmpliTaq Gold® DNA Polimerasa LD, dNTPs con mezcla dUTP/dTTP, ROX® fluorocromo de referencia pasiva y tampón de optimización de la mezcla.

Tabla I.1 Oligonucleótidos utilizados para analizar la expresión mediante PCR en tiempo real del gen *SXTH1*. En la tabla se muestra el nombre del oligonucleótido o cebador, la secuencia en dirección 5'>3', el número de pares de bases, el % de CG que contiene y la T_m .

Cebador	Secuencia (5'>3')	pb	%CG	T_m
RPL2_I	ATTCACGATCCAGGGAGAGGTGC	23	57	60
RPL2_D	AGGCAACACGTTACCAACCATAAGAGTAG	29	45	60
XTH1_I	CTTGAGAAAACCAATTGGGCCAAC	24	46	60
XTH1_D	GAACCCAACGAAGTCTCCTATACTGTAATG	30	47	59

Las condiciones utilizadas para la PCR en tiempo real fueron las recomendadas por el fabricante de *PowerSYBR®* Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK). El programa constó de 4 partes: 1) 2 minutos a 50 °C para activar la amperasa que degrada timinas. 2) 10 minutos a 95 °C para que se active la Taq Polimerasa. 3) 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C de hibridación y extensión. 4) Protocolo de disociación para identificar posibles amplificaciones inespecíficas, que consiste en ir aumentando la temperatura a partir de 60 °C hasta que se separan todas las hebras y se extingue la fluorescencia, identificando la temperatura a la cual la separación es máxima. Las curvas de disociación muestran la primera derivada negativa de la señal de fluorescencia frente a la temperatura (Wilkening y Bader, 2004).

La expresión génica se estudió mediante un análisis cuantitativo, para lo cual se usó una recta patrón compuesta por una mezcla de cDNA de todas las muestras y diluciones seriadas con valor arbitrario. Los resultados obtenidos son Ct (Threshold cycle): ciclo en el cual la fluorescencia de la doble cadena amplificada marcada con *PowerSYBR®* Green supera un umbral determinado por el aparato (Estándar 0,200). Para estudiar la expresión del gen *SXTH1* cuantitativamente se transforman los resultados de Ct en cantidades mediante la extrapolación de la recta patrón amplificada, la cual relaciona el logaritmo de la concentración arbitraria frente a las Ct. Como control interno, se utilizó RPL2, el cual codifica para la sub-unidad ribosómica 18S.

Actividad xiloglucano endotransglucosilasa

Para realizar los experimentos se utilizaron tres partes de plántulas de 6 días (2,5 -3,5 cm): la **apical** de 1 cm (por debajo del gancho plumular), la **basal** de 1 cm (justo por debajo de la primera) y la **raíz**.

Extracción de proteínas de material vegetativo

Se homogenizaron 35 mg de material vegetativo con 40 μ l de tampón fosfato sódico 200 mM pH 6,0 a 4 °C y se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a 10000 g a 4 °C. Se cuantificaron las proteínas solubles del extracto enzimático (sobrenadante) y se congeló hasta su ensayo posterior. El residuo se lavó con agua dos veces y acetona otras dos y se secó, obteniendo las paredes celulares enzimáticamente activas, que se congelaron a -25 °C hasta su análisis.

Actividad xiloglucano endotransglucosilasa soluble

La mezcla de reacción contuvo 25 μ l de extracto enzimático (15 μ g de proteína), 15 μ l de xiloglucano de manzana parcialmente purificado 5 mg ml⁻¹ y 10 μ l de [³H]XXXG 1 μ M, con una actividad específica de 0,85 kBq según el protocolo de Fry *et al.* (1992). Se incubó durante 1 hora a 25 °C y transcurrido este tiempo se paró la reacción con 100 μ l de ácido fórmico al 20% (v/v). El volumen total se distribuyó homogéneamente sobre un papel de filtro de celulosa Whatman 3MM Chr, (5 x 5cm) y se secó a 60 °C. A continuación se lavó durante 1 hora en corriente continua de agua para eliminar el [³H]XXXG que no había sido incorporado al xiloglucano por la actividad enzimática. El xiloglucano polimérico se une a la celulosa mediante numerosos puentes de hidrógeno que impiden que se elimine en el lavado. Se secó a 60 °C, se introdujo en viales de centelleo y se le añadió 2 ml de escintilante Non triton (5 g PPO, 0,5 g POPOP y 1 l de Tolueno). A las muestras se les midieron las cuentas por minuto (cpm) de ³H mediante un contador de centelleo (Wallac 1410, Pharmacia. Canadá). La eficiencia del contaje de [³H]-xiloglucano fue del 44% y para el [³H]XXXG del 4,6%.

Actividad xiloglucano endotransglucosilasa insoluble (unida covalentemente a la pared)

La mezcla de reacción contuvo 2 mg de paredes celulares enzimáticamente activas, 40 µl de tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0 y 10 µl de [³H]XXXG 1 µM, con una actividad específica de 0,85 kBq (Barrachina y Lorences, 1998). Se incubó durante 1 hora a 25 °C y se detuvo la reacción con 100 µl de ácido fórmico al 20% (v/v). Se centrifugó y el residuo se lavó con 500 µl de agua y se hidrolizó con 200 µl de TFA 2 N durante 1 hora a 121 °C. Tras enfriarse se le añadió 2 ml de escintilante Triton (3,3 g PPO, 0,33 g POPOP, 667 ml de Tolueno y 333 ml de Triton X100) y se le midió las desintegraciones por minuto (dpm) en el contador de centelleo (Wallac 1410, Pharmacia. Canadá).

En el **Anexo I** de Metodología General se especifica la obtención de los sustratos de la reacción: el xiloglucano parcialmente purificado, el oligosacárido del xiloglucano XXXG y su marcaje con [³H].

Análisis de los oligosacáridos del xiloglucano por espectroscopía de masas MALDI-TOF MS

Para realizar los experimentos se utilizaron tres partes de plántulas de 6 días (2,5 -3,5 cm): la **apical** de 1 cm (por debajo del gancho plumular), la **basal** de 1 cm (justo por debajo de la primera) y la **raíz**.

Extracción de las paredes celulares

Se recogió un total de 100 g de material vegetal de, al menos, 10 muestras y se homogeneizó con un IKA Ultraturrax T25 (IKAWerke. Stanfen, Alemania) en metanol. Se hirvieron durante 30 minutos, se lavaron dos veces con metanol, dos con acetona, dos con metanol/cloroformo (1:1; v/v) y finalmente una con éter dietílico. Se dejaron secar al aire hasta peso seco constante.

Análisis de los oligosacáridos del xiloglucano por espectroscopía de masas MALDI-TOF MS

La mezcla estuvo constituida por 2 mg de paredes celulares junto con 1 ml de acético-piridina 10 mM pH 4,7 y 5 μ l de endo- β -glucanasa (celulasa de *Trichoderma* sp., 500 unidades ml⁻¹, Megazyme. Bray, Ireland). Se incubó a 37 °C durante 18 horas y en agitación constante a 150 g. Se centrifugó durante 5 minutos a 10000 g y se transvasaron 100 μ l del sobrenadante a un vial Ultrafree-MC 0,45 (Millipore) con filtro relleno de Q-Sepharosa Fast Flow (Pharmacia Biotech). Después de 5 minutos, se centrifugó a 10000 g, se secó el eluido a vacío en Speed-Vac (Drying rate medium, RC10.10 Jovan. Inglaterra) y se resuspendió en 10 μ l de agua miliQ. Para cargarlo en la placa se mezcló 1 μ l de la muestra con 1 μ l de la matriz DHB (Ácido 2,5-dihidroxicinámico 10 mg ml⁻¹ en acetonitrilo:agua, 7:3; v/v) y se cargó 1 μ l de la mezcla en la placa que se secó a vacío. Las muestras se cargaron en torno a un punto central en grupos de 9, donde se cargó 1 μ l de la mezcla de péptido calibrante con la matriz DHB (1:1; v/v).

Para el análisis por espectroscopía de masas, se usó un Autoflex MALDI-TOF MS Broker Daltonics (Bremen, Alemania) con analizador lineal de 122 cm para análisis en modo de iones de carga positiva, con reflector electrostático de iones en modo extracción pulsada de iones positivos, aplicación de número de disparos aleatorios entre 200-300, tiempo de retraso de 150 nseg, voltaje de 19 kv, una γ de 50 Hz y laser de 376 nm alimentado por nitrógeno.

Estudio de la pared celular mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Análisis poblacional mediante componentes principales (PCA)

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los segmentos apicales de 1 cm de los hipocótilos entre 2,5 y 3,5 cm de altura, 6 días después de la siembra, se deshidrataron con una solución

metanol:cloroformo (1:1; v/v), realizándose 4 lavados en agitación sobre placas de borosilicato ya que el plástico puede dejar residuos contaminantes. Por último se lavaron con éter etílico y se dejaron secar al aire. Cada muestra estuvo constituida por 10 individuos independientes. Se guardaron en estufa de vacío a 40 °C con pentaóxido de fósforo seco durante dos días, al igual que todo el material necesario para la manipulación posterior. Cada muestra se mezcló con KBr (1:100; p/p) y se homogeneizó en mortero de ágata bajo una fuente de calor para evitar la hidratación de la muestra. Se fabricó una pastilla con el homogeneizado en una prensa manual de 0,5 mm de grosor x 1 cm de diámetro. Se introdujo en el espectrómetro Bomen-Michelson que analizó el espectro infrarrojo de la muestra, para lo cual realizó un barrido entre 2200 - 750 cm^{-1} realizando 128 interferogramas en modo transmisión con una resolución de 4 cm^{-1} . A todos los espectros de infrarrojos, antes de aplicarles el análisis de componentes principales, se les corrigió la línea base y se les normalizó el área de la región 1800 - 800 cm^{-1} , también llamada huella dactilar de cada muestra por la especificidad de los picos registrados en esta región.

Análisis poblacional mediante componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales de los datos se realizó mediante el programa Win-Das (Kemsley, 1998) utilizando las matrices de datos obtenidas por comparación de la covarianza. Además del PCA, se realizaron varios análisis que permitieron clasificar las poblaciones en bases a las distancias de los individuos de las mismas a las componentes principales seleccionadas. Estos análisis fueron los de Distancias Euclideas, Distancias de Squared Mahalanobis, Distancias de Manhattan City Block y análisis de Distancias Canonical Variate. Además, haciendo uso de los resultados de este último análisis se confirmaron los resultados con la aplicación de un análisis predictivo con el 95% de tolerancia en la región, mediante el cual se catalogaron los individuos de las tres líneas en el grupo con el que compartían mayores homologías. También, se calculó la correcta asignación de los individuos a estos grupos mediante un

análisis SIMCA (F-test y T-test) y UNEQ (Chi-cuadrado) utilizando las cinco primeras componentes principales seleccionadas.

Extensibilidad de la pared celular de los hipocótilos

Para realizar todos los experimentos se utilizaron hipocótilos de entre 2,5 y 3,5 cm de altura, 6 días después de la siembra. La parte apical y basal de los segmentos de hipocótilos se hirvieron en metanol durante 10 minutos a 80 °C para fijar las paredes celulares y se guardaron en metanol fresco a temperatura ambiente hasta su uso posterior. Antes de realizar el análisis de extensibilidad de las paredes celulares, se rehidrataron durante 1 hora con sucesivos lavados en agua. Los segmentos se fijaron con la pinza superior e inferior, dejando un espacio de 5 mm entre ambas pinzas del extensiómetro (Tensiron RTM-25, Toyo Baldwin Co. Tokio, Japón), el cual estaba conectado a un ordenador (PC-9801, NEC) que controlaba solamente los parámetros electrónicos del extensiómetro. Después de calibrar el equipo, se estiró lentamente a una velocidad de 10 mm min⁻¹ con 8 g de presión. La extensibilidad total se midió usando la pendiente de la curva producida con 8 g de presión de la primera extensión. La extensibilidad reversible se calculó midiendo la pendiente de la curva producida en la segunda extensión. La extensibilidad irreversible se calculó por diferencia de las pendientes de las dos curvas anteriores.

Crecimiento en estrés hídrico, salino y térmico

Para valorar el **estrés hídrico** en los hipocótilos se usó manitol como agente isosmótico, ya que este compuesto no penetra al interior celular. De este modo se evita el componente tóxico que provoca el estrés salino y se disminuye el potencial hídrico, provocando estrés hídrico. Para valorar el efecto del estrés hídrico, se ensayaron las siguientes concentraciones de manitol: Control (0 mM), al 2% (109 mM = -0,249 MPa) y al 5% (274 mM = -0,626 MPa). El **estrés salino** se provocó mediante concentraciones de NaCl ascendente: Control (0 mM), al 0,3% (51 mM = -0,126 MPa) y al 0,6% (102 mM = -0,252

MPa). Para ensayar el **estrés térmico**, se valoró el efecto de las bajas temperaturas (5 °C y 15 °C) y de las altas (35 °C y 50 °C). En el caso del estrés térmico, se utilizaron cámaras termostatadas en oscuridad, realizando las medidas en las cámaras de crecimiento. Los ensayos de estrés hídrico y salino se realizaron en oscuridad a 25 °C y HR al 70% en la cámara de crecimiento. Para realizar todos los experimentos de estrés se utilizaron hipocótilos de entre 2,5 y 3,5 cm de altura, 6 días después de la siembra, que se transplantaron equidistantes a bandejas de 30 x 20 x 6 cm sobre 4 hojas de papel de filtro y 50 ml de la solución adecuada, que fue agua miliQ en el caso del tratamiento térmico. Se valoró la cinética de crecimiento de los hipocótilos midiendo el crecimiento diariamente desde la base de la plántula hasta su gancho plumular, haciendo uso de una regla flexible que evitó dañar los hipocótilos.

Para cuantificar los efectos de los estreses estudiados, se realizaron tres réplicas independientes que contaron con, al menos, 20 hipocótilos para cada tratamiento por línea. Se prestó especial interés en minimizar el efecto posicional en la cámara de crecimiento, por lo cual, además de homogenizar las condiciones térmicas y de corrientes de aire, se rotaron las bandejas diariamente en la cámara de crecimiento.

Al tratarse de variedades transgénicas, todo el material vegetal que es retirado tuvo que ser eliminado de forma segura. Para ello, se cumplió con la **normativa** descrita para instalaciones y actividades que se desarrollan con organismos modificados genéticamente (OMG) Nivel 3: Ley 15/1997 de junio y RD 951/1997 de 20 de junio, Directiva 98/81/CE de 26 de octubre de 1998 y RD 178/2004 de 30 de enero por el que se aprueba el reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003 de 25 de abril.

RESULTADOS

Cinéticas de crecimiento del hipocótilo y de la raíz

En primer lugar, se estudió la cinética de crecimiento de las plántulas, que se muestra en la **Fig. I.1**.

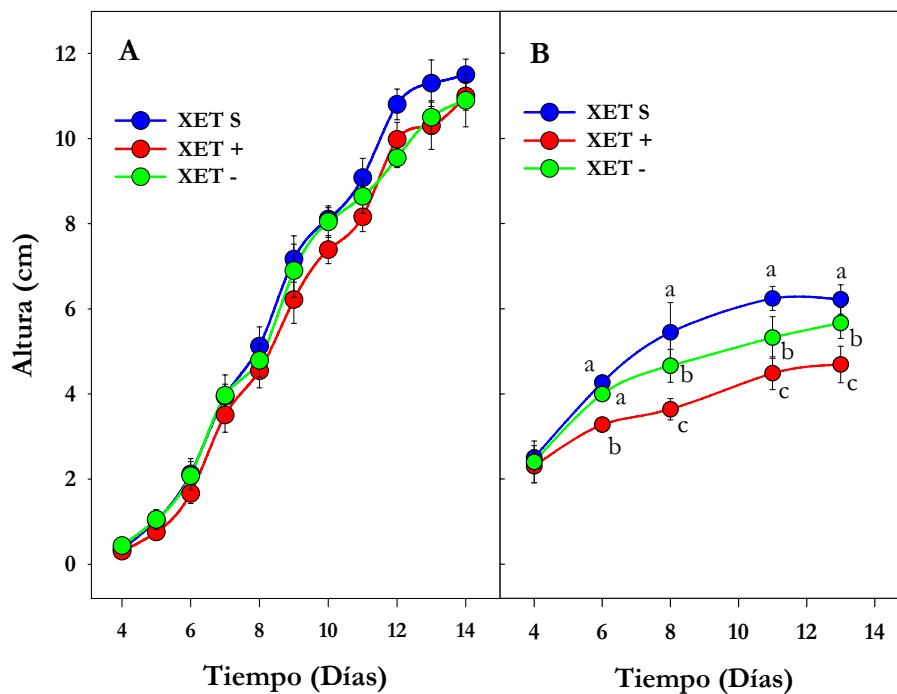


Fig. I.1 Cinética de crecimiento de las plántulas etioladas de tomate silvestres (XET S) y transgénicos (XET + y XET -). **A)** Cinética de crecimiento del hipocótilo, donde se muestra la media de la altura del hipocótilo \pm SE, desde su germinación hasta el agotamiento de las reservas de la semilla. **B)** Cinética de crecimiento de la raíz, donde se muestra la media de la longitud de las raíces \pm SE, desde su aparición hasta el final de crecimiento del hipocótilo. La gráfica muestra las medias de la altura y longitud de, al menos, 200 plántulas por línea pertenecientes a 5 experimentos independientes. Distintas letras muestran diferencias significativas entre las líneas (T-test, p valor < 0,05).

En la **Fig. I.1. A** se muestran las curvas descritas por el crecimiento vegetativo del hipocótilo, desde su germinación en el cuarto día tras la siembra hasta el agotamiento de las reservas de la semilla, que se produce hacia el decimoquinto día tras su siembra. En la gráfica se observa una primera fase de crecimiento más lento que llega hasta el sexto día, seguida de una segunda fase de crecimiento lineal rápido que se mantiene hasta el doceavo día de siembra, donde se alcanza una tercera fase asintótica. La altura final del hipocótilo alcanzó los 11 cm en las plántulas de XET S, XET + y XET -. Las cinéticas de crecimiento no muestran diferencias significativas entre las tres líneas estudiadas en el crecimiento total del hipocótilo.

En la **Fig. I.1. B** se muestra la cinética de crecimiento de las raíces de las plántulas. Las curvas que describen el crecimiento de las raíces muestran un primer crecimiento rápido que se estabiliza hacia el décimo día después de la siembra. Las raíces alcanzan una longitud de 6,2 cm en la línea silvestre y 4,6 cm y 5,6 cm en la XET + y XET -, respectivamente. Como puede verse en la figura, la línea XET S registró las raíces más largas significativamente que las dos líneas transgénicas. En la línea XET + se cuantificaron las raíces más cortas significativamente, siendo 1,5 cm más cortas que las de la línea XET S y 1 cm menores que las de XET -. Las raíces de la línea XET - fueron más cortas significativamente que las XET S y más largas significativamente que XET +.

Biomasa de los hipocótilos y raíces

Se cuantificó la biomasa de los hipocótilos y raíces de las plántulas, **Fig. I.2**, mediante la valoración del peso fresco y seco de los mismos. En la **Fig. I.2. A** se muestra el peso fresco de los hipocótilos y raíces de las tres líneas. Tanto en hipocótilos como en raíces, se observó que las plántulas silvestres registraron un peso fresco similar a XET -, que fue mayor significativamente al de las plántulas XET +.

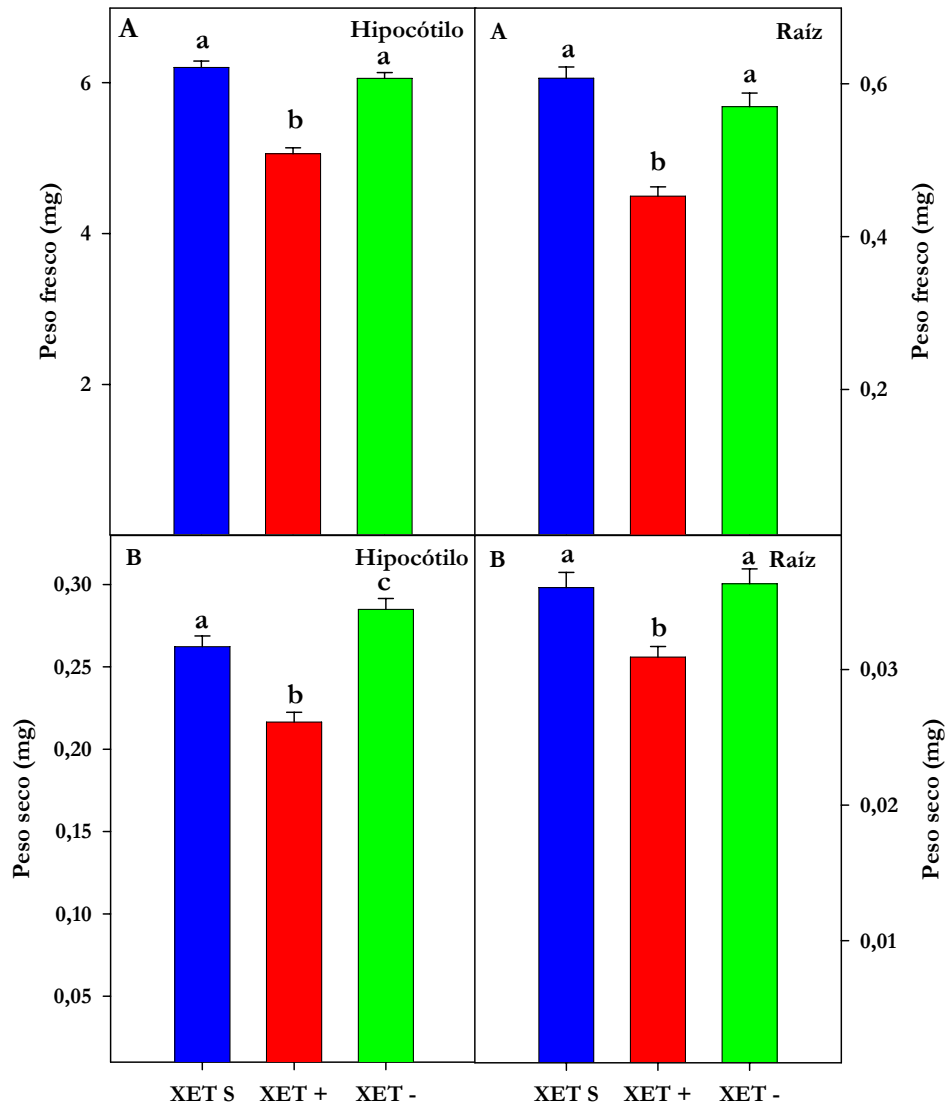


Fig. I.2 Biomasa de los hipocótilos de tomate silvestre (XET S) y transgénicos (XET + y XET -) con 13 días. **A)** Peso fresco del hipocótilo y raíz de la plántula. **B)** Peso seco de las mismas partes de la plántula. Las gráficas muestran la media \pm SE, al menos, de 200 plántulas por variedad. Distintas letras indican diferencias significativas entre las líneas (T-test, p valor $< 0,05$).

En la **Fig. I.2. B** se muestra el peso seco de las partes de las plántulas estudiadas. Como puede verse, el peso seco del hipocótilo de la línea silvestre

fue mayor significativamente a la XET⁺ y menor significativamente a la XET⁻. A su vez, el peso seco de la línea XET⁺ fue menor significativamente a la línea XET⁻. Con respecto al peso seco de la raíz, las plántulas silvestres registraron un peso similar a las XET⁻ y en ambas se contabilizó un peso seco mayor significativamente que en la línea XET⁺, siendo estos resultados iguales a los de peso fresco. Además, se puede ver que el peso fresco del hipocótilo suele ser aproximadamente 10,5 veces superior al peso fresco de la raíz, mientras que el peso seco del hipocótilo es tan sólo unas 7,3 veces mayor que el peso de la raíz seca. Los resultados porcentuales de peso seco respecto a peso fresco en hipocótilos, se situaron en torno al 4,1% en las líneas silvestre y XET⁺ y del 4,6% en la línea XET⁻, mientras que los porcentajes de peso seco frente a peso fresco en raíces fueron del 6,0; 6,6 y 6,3% en las líneas XET^S, XET⁺ y XET⁻, respectivamente.

Análisis de la expresión de *SXTH1* mediante PCR cuantitativo en tiempo real

Con el objetivo de caracterizar molecularmente las plántulas y confirmar los datos proporcionados por el IPK sobre ellas, se estudió la expresión génica de la *SXTH1* mediante PCR cuantitativo en tiempo real. Se analizaron tres partes de la plántula (2,5-3,5 cm): la **apical** de 1 cm (por debajo del gancho plumular), la **basal** de 1 cm (justo por debajo de la primera) y la **raíz**.

Como se muestra en la **Fig. I.3**, se detectaron diferencias a nivel de expresión del gen *SXTH1* entre las distintas partes del hipocótilo y entre las líneas. En la parte apical se detectaron niveles de expresión mayores que en la basal, diferencias que se mantuvieron en las tres líneas. En la parte apical del hipocótilo, se observa una expresión mayor del gen en la línea XET⁺ frente a la línea XET^S (1,2 veces), mientras que la línea XET⁻, registró un nivel de expresión muy inferior a la silvestre (3,8 veces). En la parte basal del hipocótilo, se mantuvieron las diferencias generales de expresión, aunque XET⁺ se expresó 7,4 veces más que la línea silvestre y la XET⁻ se expresó 2,6 veces menos que XET^S. En la raíz, la línea XET⁺ se expresó un 1,2 veces más que

la línea XET S, mientras que la XET⁻ se expresó de modo similar a la línea XET S.

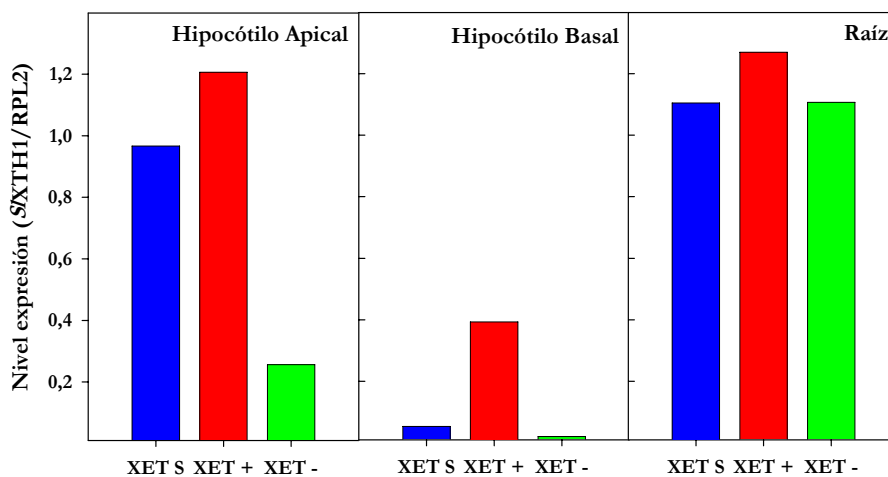


Fig. I.3 Expresión del gen *SXTH1* en la parte apical y basal de los hipocótilos y de la raíz de las plántulas silvestres (XET S) y transgénicas (XET⁺ y XET⁻). Se cuantificó mediante PCR en tiempo real cuantitativo (7000 ABI Prism; Applied Biosystem), usando *PowerSYBR®* Green como fluorocromo. Los valores mostrados son la media de 2 experimentos independientes usando material homogenizado de cada parte estudiada procedente de, al menos, 20 plántulas para cada línea y por experimento.

Determinación de la actividad xiloglucano endotransglucosilasa

Se estudio la actividad XET soluble y la insoluble, o unida covalentemente a la pared, en las dos partes del hipocótilo (apical y basal), y en la raíz, como muestra la **Fig. I.4**. La actividad XET soluble, tanto en la línea silvestre como en las líneas transgénicas, fue mayor en la parte apical que en la basal del hipocótilo, siendo muy inferior en la raíz. Si comparamos la línea silvestre con las transgénicas, podemos observar que, en la zona apical, la actividad soluble de la línea XET⁺ fue significativamente mayor que la de la línea silvestre, mientras que en la línea XET⁻, la actividad soluble fue significativamente menor que en la línea XET S. En la zona basal, la actividad soluble de la línea

silvestre fue similar a la XET +, y a su vez, estas dos líneas mostraron una actividad XET soluble que fue mayor significativamente a la XET -. En la raíz, la actividad soluble de la línea XET + fue superior significativamente a la línea XET S, pero no se encontraron diferencias con la línea XET -.

El valor de actividad XET covalentemente unida a la pared en la línea silvestre fue similar en la parte apical y basal del hipocótilo, mientras que en la línea XET + la actividad insoluble de la parte apical fue superior a la encontrada en la parte basal. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre a línea silvestre y las líneas transgénicas, ni en la parte apical y basal del hipocótilo, ni en la raíz.

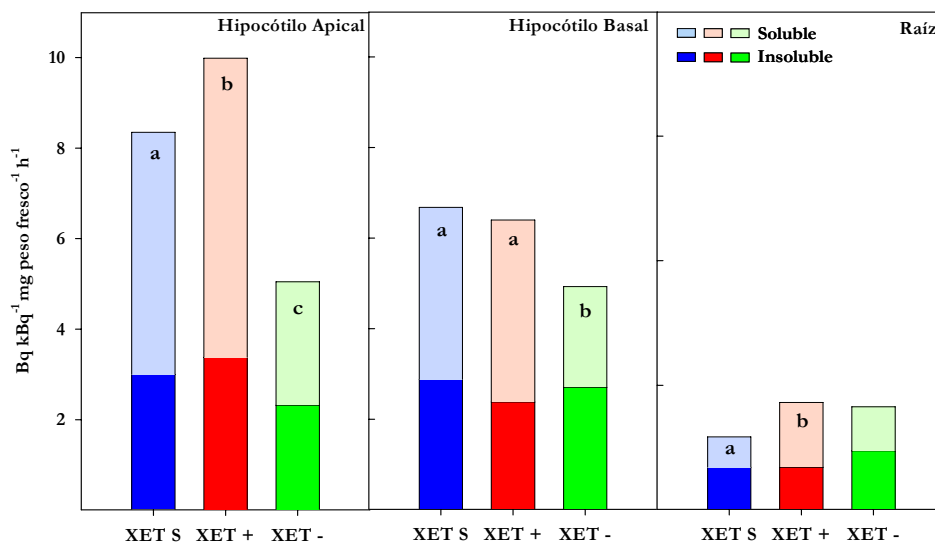


Fig. I.4 Actividad XET soluble e insoluble de la parte apical y basal de hipocótilos y de la raíz de plántulas de 6 días. Las gráficas muestran la actividad media de, al menos, 5 experimentos independientes de, al menos, 20 hipocótilos por muestra y por línea cada uno. Distintas letras indican diferencias significativas entre las líneas (T - test, p valor < 0,05).

Estudio de la composición cualitativa del xiloglucano de la pared celular de hipocótilos mediante MALDI-TOF MS

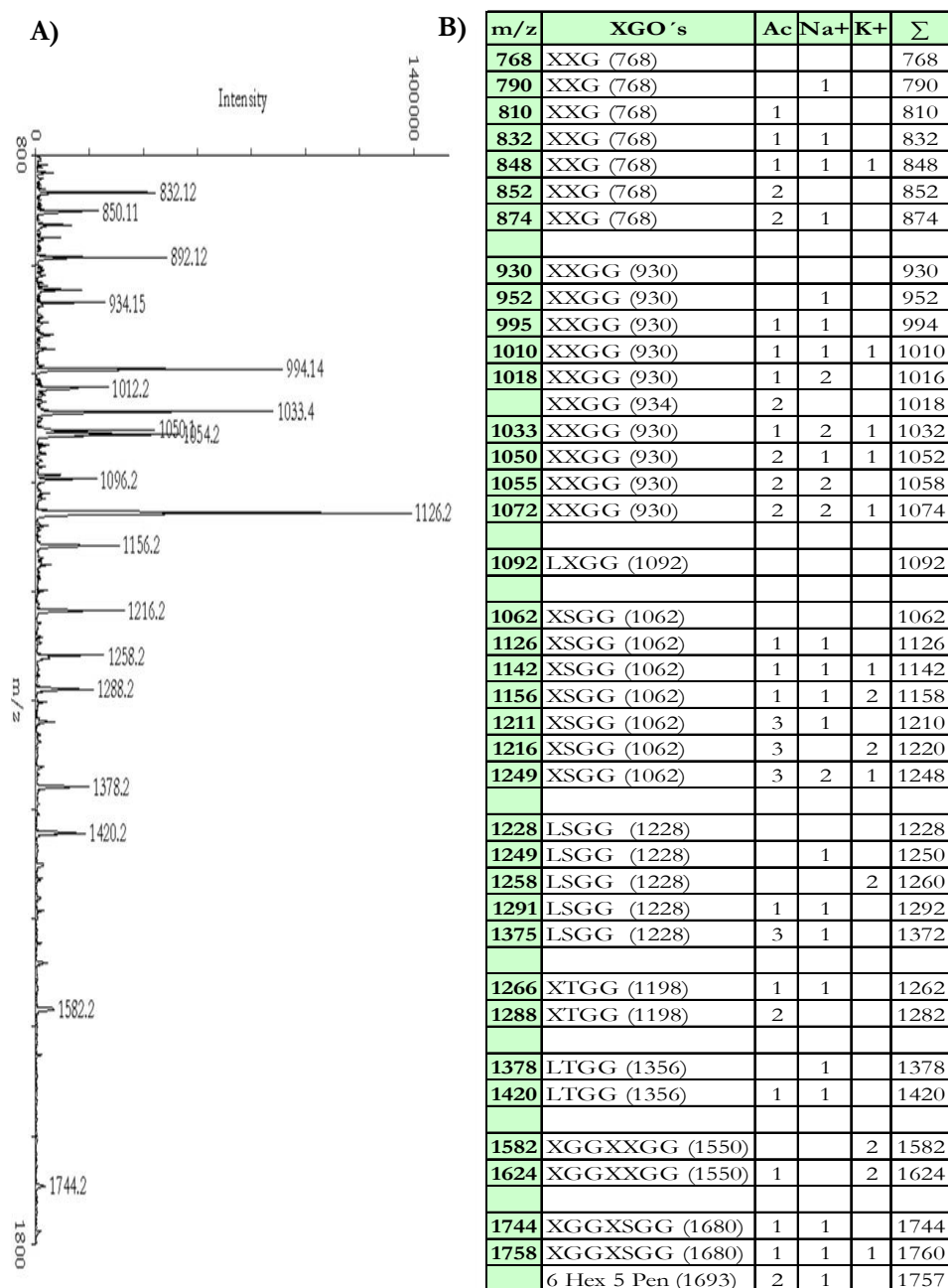


Fig. I.5 Identificación de los oligosacáridos del xiloglucano mediante el valor de m/z obtenido por la aplicación de espectroscopía de masas MALDI-TOF MS. **A)** Ejemplo de un espectro de masas con valores m/z. **B)** Cuadro identificativo de los oligosacáridos del xiloglucano de tomate mediante el valor m/z.

Con el objetivo de estudiar si la estructura del xiloglucano en las distintas partes de la plántula estaba afectada por los niveles elevados de actividad XET, analizamos los segmentos apical y basal del hipocótilo y la raíz mediante espectroscopía de masas en tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) de plántulas silvestres y XET +.

Los resultados representan los porcentajes de oligosacáridos del xiloglucano. Estos se obtienen a partir del valor de las áreas de los picos de los oligosacáridos (**Fig. I.5 A**), identificados mediante el valor m/z característico de cada uno. La identificación de los oligosacáridos del xiloglucano de *Solanum lycopersicum* L. se llevó a cabo mediante la comparación de los datos pertenecientes a los análisis identificativos previos de oligosacáridos de tomate con los datos presentados en Jia *et al.*, 2003 y valores de oligosacáridos de *Arabidopsis thaliana* L. proporcionados por el Dr. Zarra (Universidad de Santiago de Compostela). Con todos ellos, se confeccionó el cuadro que se muestra en la **Fig. I.5 B**, donde se asocian los valores de m/z correspondientes con cada uno de los oligosacáridos del xiloglucano. Como puede verse, estos oligosacáridos suelen estar acomplejados con grupos acetilos e iones Na^+ y K^+ . Los oligosacáridos presentes en el xiloglucano de plantas de tomate según orden ascendente de monosacáridos fueron: XXG, XXGG, LXGG, XSGG, LSGG y XTGG. Su estructura se presenta en la **Fig. I.6**.

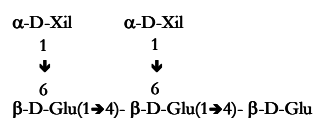
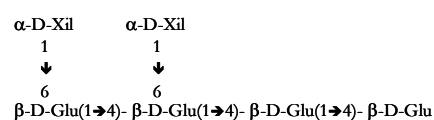
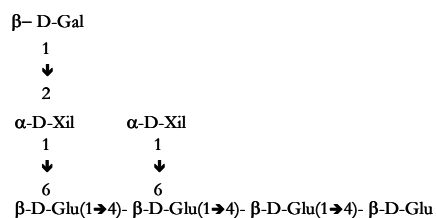
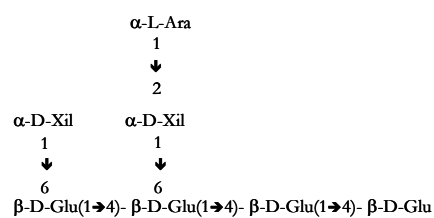
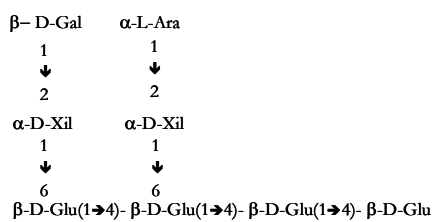
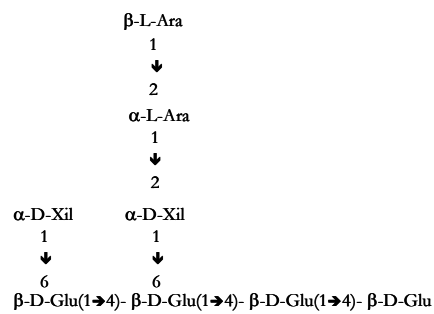
**XXG****XXGG****LXGG****XSGG****LSGG****XTGG**

Fig. I.6 Estructura extendida de los oligosacáridos del xiloglucano identificados en las muestras de plantas de tomate mediante la aplicación de espectroscopía de masas MALDI-TOF MS.

Las áreas relativas de los oligosacáridos del xiloglucano se integraron manualmente a partir de los valores de m/z resultantes de los espectros de masas, identificados por la tabla anterior. Como podemos ver en la **Fig. I.7**, la distribución de los perfiles de oligosacáridos fue diferente entre el hipocótilo y la raíz.

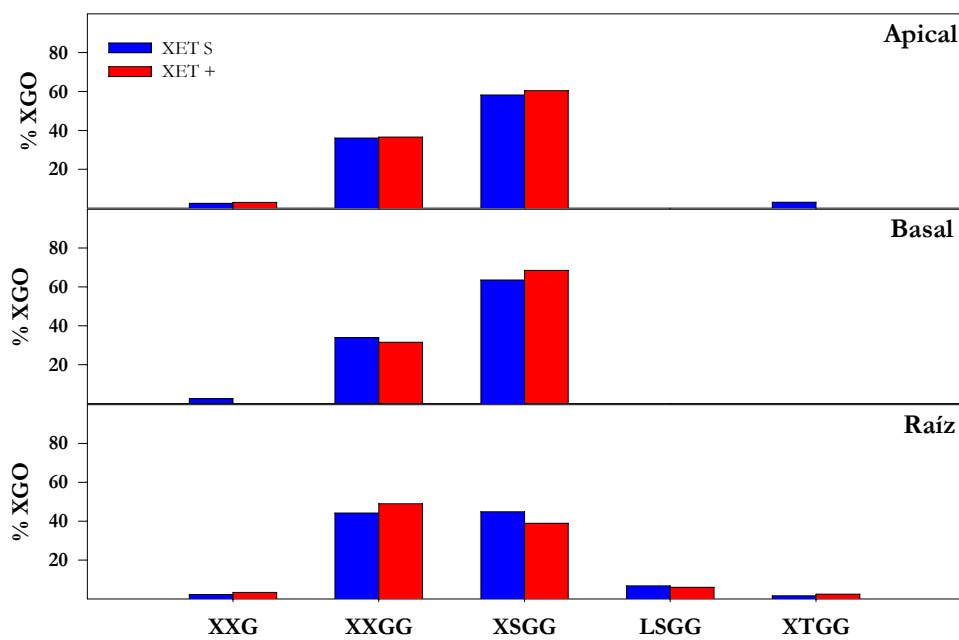


Fig. I.7 Porcentajes relativos de oligosacáridos del xiloglucano presentes en la raíz y el hipocótilo (apical y basal) de plántulas de entre 2,5-3,5 cm. Se representa la línea silvestre XET S y la transgénica XET +. Los resultados muestran la media de dos análisis compuestos por, al menos, 40 hipocótilos de cada una de las líneas.

En la parte apical y basal del hipocótilo, el oligosacárido mayoritario fue el XSGG, en torno al 60% en la parte apical y 70% en la basal, seguido del XXGG con un 40% y 30% en la zona apical y basal, respectivamente. Además, en el hipocótilo, se detectaron porcentajes muy bajos, rondando el 1% del oligosacárido más sencillo XXG y del más complejo XTGG en ambas líneas. En la zona apical no se registraron diferencias entre las líneas estudiadas, pero

en la zona basal, el porcentaje de XXGG fue ligeramente menor en la XET + que en la XET S, contrariamente a lo que sucede con XSGG, donde el porcentaje de XET + fue mayor al silvestre. En el hipocótilo no se identificó el oligosacárido LSGG que si estuvo presente en la raíz con una participación de un 6% en ambas líneas.

En la raíz, el porcentaje de los oligosacáridos mayoritarios, XXGG y XSGG, de la línea silvestre fue similar a la transgénicas y rondó el 47%. En la línea XET +, el porcentaje de XXGG fue mayor a XET S, alcanzando el 52% y menor en XSGG, contabilizándose alrededor del 40%. Tanto el oligosacárido XXG como el XTGG, fueron detectados en pequeñas cantidades que significaron entre un 1 y 3% de los oligosacáridos totales, siendo ligeramente superior la cantidad registrada en XET + frente a XET S.

Identificación de las poblaciones mediante la aplicación de PCA a los espectros FTIR de la pared celular de hipocótilos

Se realizó el análisis utilizando entre 15 y 19 grupos por línea silvestre o transgénica, formados por 10 segmentos apicales de 1 cm de hipocótilos de entre 2,5 – 3,5 cm. De modo que, se registró el espectro infrarrojo que producían en una ventana de entre 2100 y 750 cm^{-1} de longitud de onda. En la **Fig. I.8** se muestran los espectros resultantes de las tres líneas estudiadas, con la línea base corregida y el área normalizada. Puede apreciarse que en los dos picos principales (1650 cm^{-1} y 1002-1128 cm^{-1}) se produce una gran discrepancia entre los espectros de las tres líneas. El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los espectros de todas las líneas (T-test, p valor < 0,05). El primer pico, se asocia con amidas tipo I según Sene *et al.* (1994). Puesto que las proteínas proporcionan dos fuertes bandas en el espectro infrarrojo correspondientes a los linajes de amidas, la tipo I que aparece en 1650 cm^{-1} y la tipo II que lo hace en el 1550 cm^{-1} , con un ratio de intensidad 2:1. El espectro de la proteína purificada tiene una pequeña intensidad que se manifiesta entre 1200-800 cm^{-1} . Las estructuras C=O y C-N provocan una señal que, en ocasiones, se ve afectada por las estructuras secundarias. La

segunda región que mostró diferencias (1002-1128 cm^{-1}), resultó más complicada su asociación a alguno de los componentes de la pared celular, debido al elevado número de modos vibracionales de los enlaces polisacáridicos, según Sené *et al.* Aunque otros autores como McCann *et al.* (1992) la asocian con pectinas, en concreto con la estructura C-O y C-C correspondiente a los picos 1004 y 1096 cm^{-1} o como Kacurakova *et al.* (2002) a las estructuras, C-O-C glicosídico de la celulosa para el pico 1157 cm^{-1} y el enlace entre C-O-C y C-C de los puentes del anillo de celulosa para el doblete 1060 y 1037 cm^{-1} . Este mismo trabajo, asocia los valores de 1040 y 1078 cm^{-1} a los enlaces característicos del xiloglucano.

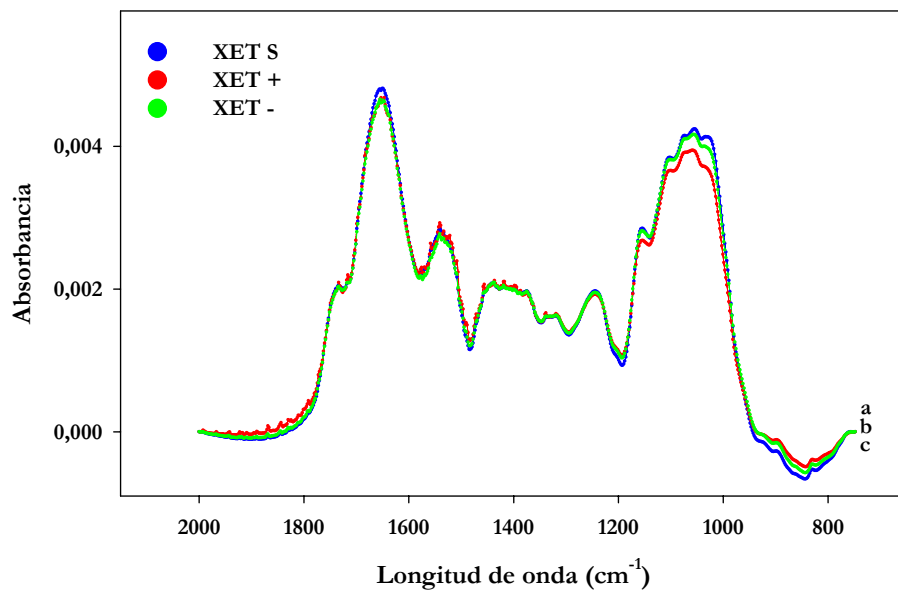


Fig. I.8 Espectro infrarrojo de la pared celular de la zona apical del hipocótilo de las plántulas de XET S, XET + y XET -, de 6 días. Los resultados muestran la media de entre 15 y 19 muestras, compuestas por 10 individuos, por cada una de las líneas. A todos los espectros infrarrojos les fue corregida la línea base y su área normalizada. Distintas letras indican diferencias significativas entre las líneas (T-test, p valor < 0,05).

Los espectros resultantes de todas las muestras fueron analizados por componentes principales (PCA) mediante WinDas, un programa informático que integra los datos obtenidos de los espectros analizándolos y comparándolos respecto a las componentes principales del análisis. Previamente a los análisis, a todos los espectros se les debe corregir la línea base y aplicarles una normalización del área. En la **Fig. I.9** se muestra la disposición de los individuos de cada una de las líneas respecto a las dos componentes principales que explicaron el 67,63% y 14,77% de la covarianza respectivamente. Entre las cinco componentes principales explicaron el 96,61% de la covarianza total de los datos, lo cual indica que se necesitan tan solo 5 variables para caracterizar la variabilidad de los datos.

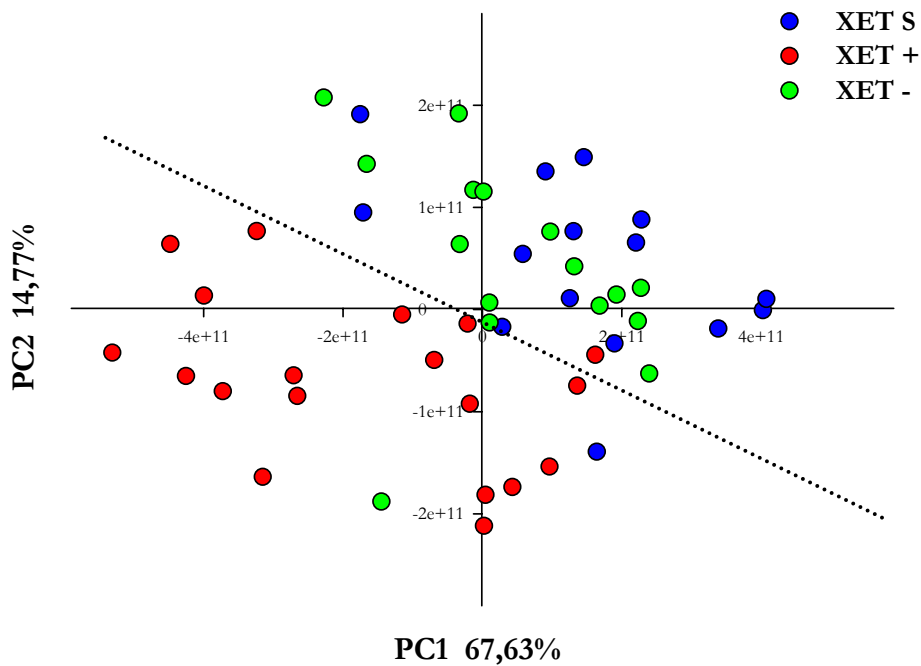


Fig. I.9 Análisis por componentes principales de los espectros FTIR de la pared celular de la parte apical de los hipocótilos de las plántulas de las tres líneas estudiadas: XET S, XET+ y XET -. La primera componente explica el 67,63% de la covarianza de los datos y la segunda explica el 14,77%. Entre las cinco primeras componentes explican un total de 96,61% de covarianza.

Como se puede apreciar en la gráfica, los individuos se disponen en torno a dos ejes que representan las dos componentes principales que explican el máximo porcentaje de la covarianza. Su distancia a estos ejes explica las similitudes y diferencias de los individuos estudiados, por ello la disposición en el plano permite asociarlos en grupos. De este modo, podemos inferir la existencia de dos grupos en la gráfica. El primero se encuentra distribuido por debajo de la línea diagonal, principalmente en los cuadrantes negativos de las dos componentes y se asocia con individuos de XET +. El segundo se encuentra opuesto al primero y su distribución se localiza por encima de la línea diagonal, coincidiendo generalmente con los cuadrantes positivos de las dos componentes. A este grupo se asocian tanto los individuos silvestres como los XET -. Cuando se realizó un PCA sólo con los individuos de los dos primeros grupos, la PC1 explicó el 73,75% de la covarianza y la PC2 el 12,84%. Entre las cinco primeras explicaron un 97,25% de la covarianza total.

Usando las cinco primeras componentes principales se corroboraron las diferencias entre las tres poblaciones aplicando varios estudios discriminantes (**Fig. I.10**), basados en las distancias de los individuos a las PCA. De este modo se estudiaron las Distancias Euclideas (**Fig. I.10 A**), Distancias Manhattan City Block (**Fig. I.10 B**), Distancias Squared Mahalanobis (**Fig. I.10 C**) y Distancias Canonical Variate (**Fig. I.10 D**). Como puede apreciarse en la figura, los cuatro análisis permitieron la separación de las tres poblaciones, pero de un modo más evidente en los análisis C y D. En el análisis de Distancias Euclideas, se muestran los individuos muy dispersos, aunque permite distinguir la población silvestre y la XET +. La población XET - se dispone integrada en la intersección de ambas. En el análisis de Distancias Manhattan, se produce la misma disposición de los individuos pero disminuyendo la distribución a lo largo de las tres componentes principales. En el análisis de Distancias Mahalanobis, los individuos se disponen en torno a tres grupos bien delimitados y con escasa dispersión respecto a las componentes que los definen. Por último, en el análisis de Distancias Canonical Variate, se observan

claramente tres grupos respecto a las 2 componentes principales. Los individuos de XET S se dispersan por la mitad positiva de la PC2 y mayoritariamente por la positiva de PC1, a excepción de un punto. Los individuos de XET + se dispersan por la mitad negativa de PC2 (a excepción de un punto) y los de XET - por el cuadrante positivo de PC2 y mayoritariamente por el negativo de PC1, a excepción de un punto.

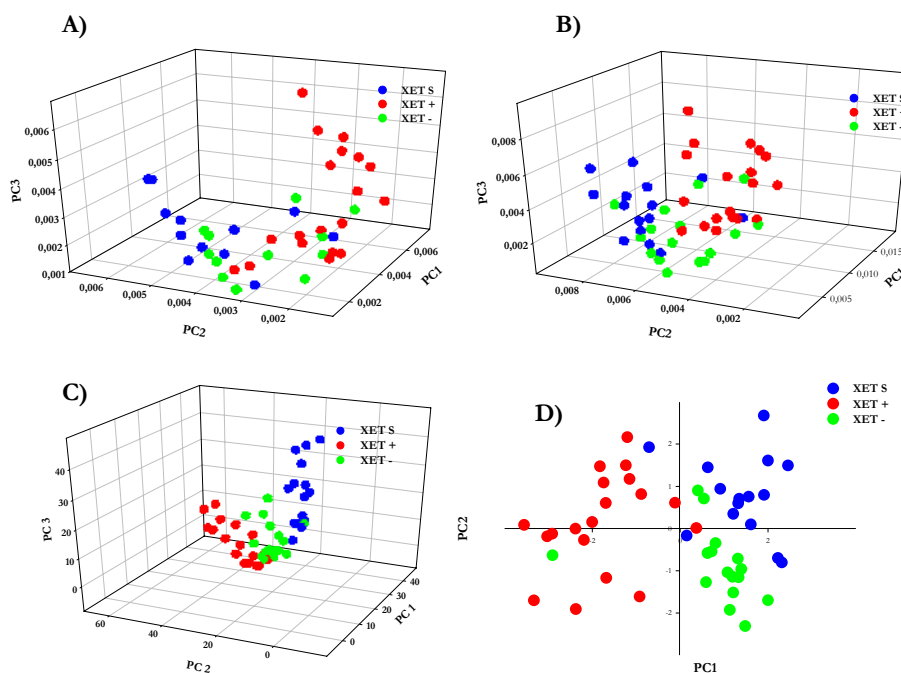


Fig. I.10 Análisis discriminante por **A)** Distancias Euclideas, **B)** Distancias Manhattan City Block, **C)** Distancias Squared Mahalanobis y **D)** Distancias Canonical Variate. En los tres primeros análisis se representan en función de tres de las cinco componentes principales, en el último se muestra su distribución en base a las dos primeras componentes. Se representan las tres líneas estudiadas: XET S, XET + y XET -.

Haciendo uso de los resultados del análisis de Distancias Canonical Variate se confirmó la asociación de los individuos en tres poblaciones mediante un análisis predictivo con 95% de tolerancia en la región (**Fig. I.11 A**).

Posteriormente, se confirmó la correcta asignación de los individuos a las poblaciones identificadas anteriormente con análisis SIMCA (F-test y T-test) en la **Fig. I.11 B** y UNEQ (Chi-cuadrado) en **Fig. I.11 C**.

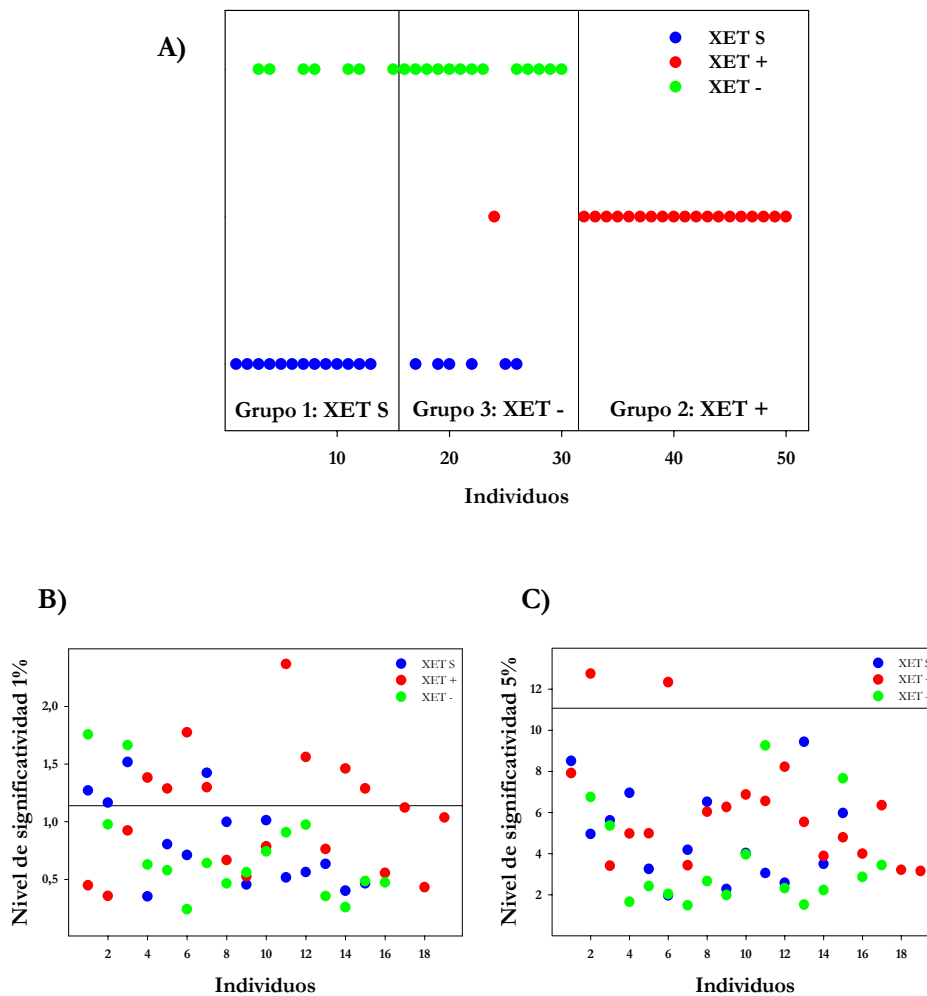


Fig. I.11 Análisis predictivo y de comprobación de la correcta asignación de los individuos a su población. **A)** Análisis predictivo con 95% de tolerancia en la región. Análisis para la comprobación de la correcta asignación de los individuos a su grupo: **B)** Análisis SIMCA y **C)** Análisis UNEQ. Se representan los individuos de las tres líneas estudiadas: XET S, XET + y XET -.

Mediante el análisis predictivo que se muestra en la **Fig. I.11 A**, podemos afirmar que los individuos se asocian en tres poblaciones, de las cuales, dos de ellas, aunque diferentes, comparten numerosas características que los definen. Así, la población silvestre comparte características en los enlaces de los componentes de la pared celular con la línea XET⁻. Puesto que 6 individuos de la línea XET^S se adscriben al grupo 3 donde encontramos la identidad de la línea XET⁻ y al contrario, 7 individuos de XET⁻ se clasificaron como XET^S. La línea XET⁺ describe unas características propias de los enlaces de la pared celular de la zona apical de hipocótilos que la hacen distinta a las otras dos poblaciones. Tan sólo un individuo se clasificó como perteneciente a la línea XET⁻.

Cuando se comprobó la correcta asignación de individuos mediante análisis SIMCA (**Fig. I.11 B**) a un nivel de significatividad del 1% (P-valor < 1,14) se contabilizaron 14 individuos con una posible asignación a varias poblaciones y sin embargo, al aplicar UNEQ (**Fig. I.11 C**) a un nivel de significatividad del 5% (P-valor < 11,07) tan sólo se identificaron dos individuos de XET⁺ que se podían adscribir a varios grupos.

Medida de la extensibilidad de hipocótilos

Se estudió la extensibilidad de las dos partes de plántulas de 6 días (2,5 -3,5 cm): la **apical** de 1 cm (por debajo del gancho plumular) y la **basal** de 1 cm (justo por debajo de la primera). Se usó un extensiómetro Tensiron RTM-25 (Toyo Baldwin Co. Tokio), que permitió valorar la extensibilidad reversible e irreversible del material mediante dos extensiones continuas. Como se muestra en la **Fig. I.12**, la extensibilidad en la zona apical fue mayor a la zona basal en todas las líneas. Si analizamos los resultados obtenidos en la zona apical, podemos apreciar que la extensibilidad reversible fue mayor que la irreversible, en las tres líneas. La extensibilidad reversible de la línea XET⁺ fue mayor significativamente que la de las líneas XET^S y XET⁻. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las líneas al valorar la extensibilidad irreversible de la zona apical, aunque la extensibilidad de la línea XET⁻ fue

menor. Por esta razón, cuando analizamos en conjunto los datos de la extensibilidad reversible e irreversible, encontramos diferencias significativas entre la línea XET S y la XET +.

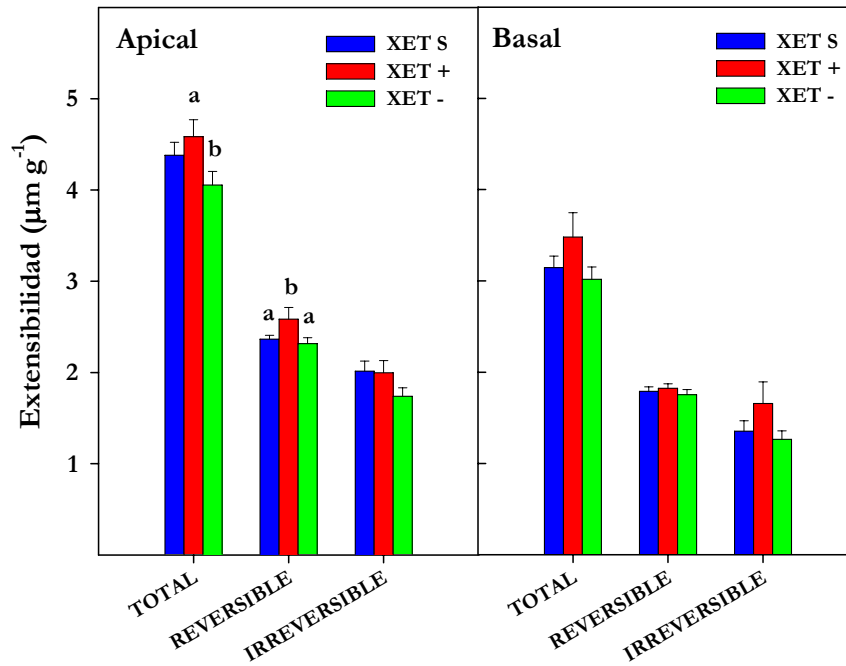


Fig. I.12 Extensibilidad total, reversible e irreversible de la zona apical y basal de hipocótilos de entre 2,5-3,5 cm. Se representan los valores medios \pm SE de la extensibilidad en $\mu\text{g g}^{-1}$ de las tres líneas estudiadas: XET S, XET + y XET -. Distintas letras indican diferencias significativas entre las líneas en la extensibilidad total, reversible o irreversible (T-test, p valor $< 0,05$).

Cuando se representan los resultados de extensibilidad de la zona basal, no se encontraron diferencias en la extensibilidad reversible entre las tres líneas. Respecto a la extensibilidad irreversible, se puede apreciar que, pese a no encontrarse diferencias significativas entre las líneas, la extensibilidad en XET +, fue mayor a las otras dos líneas. Al valorar la extensibilidad total, se puede apreciar que la línea XET + registró los valores más altos de extensibilidad, sin

llegar a ser significativo, debido fundamentalmente a la elevada variabilidad en los datos de esta línea.

Posteriormente, se aplicó el análisis bayesiano a los datos de extensibilidad total, reversible e irreversible de las tres líneas en la zona apical y basal, como puede verse en la **Tabla I.2**. En la zona apical, la población de la línea XET S mostró una extensibilidad total que fue diferente a la de la población XET – y lo mismo ocurre entre las dos líneas transgénicas. En ambos casos, la extensibilidad irreversible fue la que aportó las diferencias más notables para el cómputo de la extensibilidad total entre las poblaciones indicadas. En la zona basal no se encontraron diferencias en la extensibilidad total entre las líneas, puesto que la probabilidad fue menor de 0,7 en todas las comparaciones. El análisis bayesiano de la extensibilidad reversible e irreversible aplicado a las líneas, no mostró diferencias entre ellas en la zona basal.

Tabla I.2 Análisis bayesiano aplicado a los datos de extensibilidad total, reversible e irreversible en la zona apical y basal del hipocótilo. Las distintas líneas fueron comparadas entre ellas dos a dos y los resultados muestran los valores de probabilidad según $Pr[\phi > 1/\text{data}]$.

APICAL	Total	Reversible	Irreversible
XET S - XET +	0,608	0,260	0,764
XET S - XET –	0,987	0,511	0,999
XET + - XET –	0,971	0,261	0,981
BASAL	Total	Reversible	Irreversible
XET S - XET +	0,246	0,266	0,309
XET S - XET –	0,413	0,422	0,389
XET + - XET –	0,699	0,665	0,612

Evaluación del crecimiento frente a estrés salino, hídrico y térmico de los hipocótilos

Estrés salino

Se estudió el efecto del estrés salino en plántulas que tenían 6 días, midiéndoles el crecimiento cada dos días, como se muestra en la **Fig. I.13**. Al terminar el experimento, se midieron las raíces de los hipocótilos en todos los tratamientos y los resultados se muestran en la **Fig. I.14**.

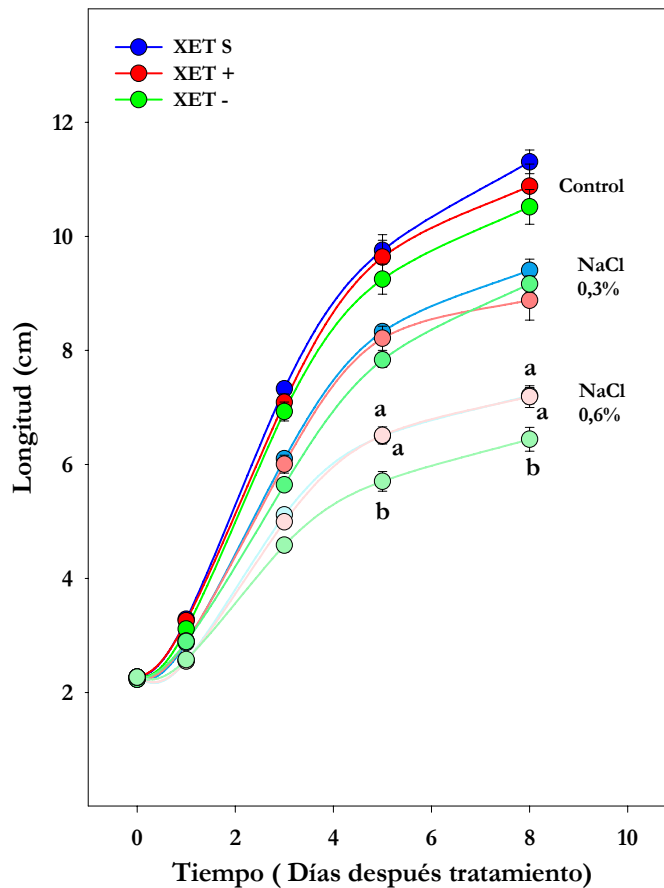


Fig. I.13 Cinética de crecimiento de los hipocótilos crecidos bajo estrés salino. Se muestran las cinéticas que describen las tres líneas estudiadas, XET S, XET + y XET -, en respuesta a los tratamientos Control, NaCl al 0,3% y NaCl al 0,6%, y los valores representan la media \pm SE. El transplante de las plántulas se realizó a los 6 días de la siembra. El tratamiento se llevó a cabo en oscuridad a 25 °C y HR al 70%. Distintas letras indican diferencias significativas entre las líneas en los distintos tratamientos (T-test, p valor < 0,05).

En la figura anterior podemos ver que a medida que aumentamos la concentración salina se reduce el crecimiento de los hipocótilos en las tres líneas. La reducción fue de alrededor de un 15,5% en el tratamiento NaCl al 0,3% y de un 36% en el tratamiento con NaCl al 0,6%. En el Control y en el tratamiento de NaCl al 0,3% no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre los hipocótilos XET S, XET + y XET -. Pero en el tratamiento más acusado, NaCl al 0,6%, la línea XET - creció menos significativamente que las plántulas silvestres y XET +.

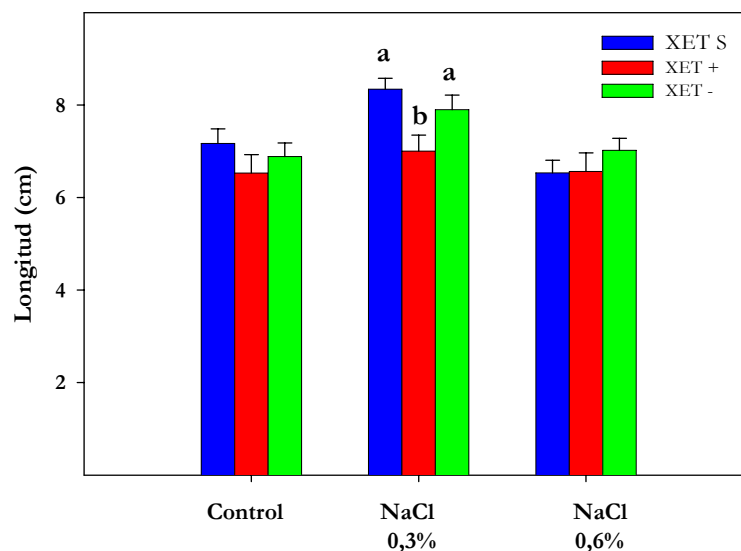


Fig. I.14 Longitud de las raíces de las plántulas XET S, XET + y XET -, crecidas bajo estrés salino al terminar el experimento (8 días de tratamiento). El tratamiento Control, NaCl al 0,3% y NaCl al 0,6%, se llevó a cabo en oscuridad a 25 °C y HR al 70%. Los valores representan la media \pm SE. Distintas letras indican diferencias significativas entre las líneas (T-test, p valor < 0,05).

Al analizar la longitud de las raíces al finalizar el tratamiento (8 días) (**Fig. I.14**), no se apreciaron diferencias significativas en el Control, pero si en el tratamiento con NaCl al 0,3%, donde las raíces XET S fueron mayores significativamente a las XET +. Sin embargo, en el tratamiento con NaCl al 0,6%, las raíces de la línea XET S crecieron mucho menos, igualando en longitud a las de la línea XET +, mostrando que las diferencias en longitud

registradas en los tratamientos menos severos no se mantienen en la línea silvestre a medida que se agudizan los mismos. Las raíces más largas en todas las líneas se registraron en el tratamiento NaCl al 0,3%. Cabe destacar que se probaron concentraciones superiores de NaCl, pero estas provocaron la muerte de las plántulas en 36 horas.

Estrés hídrico

En la **Fig. I.15**, se estudio el efecto del estrés hídrico mediante el uso de manitol.

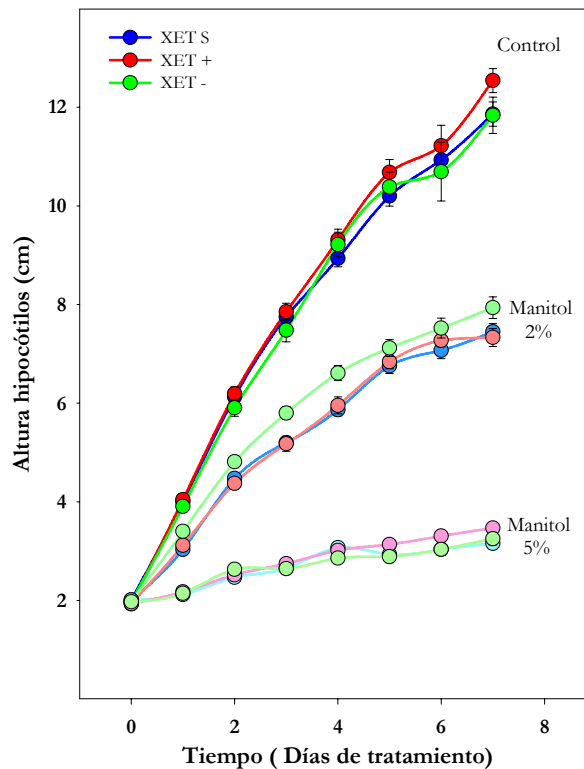


Fig. I.15 Cinética de crecimiento de los hipocótilos bajo estrés hídrico. Se muestran las cinéticas que describen las tres líneas estudiadas, XET S, XET + y XET -, en respuesta a los tratamientos Control, manitol al 2% y manitol al 5%, y los valores representan la media \pm SE. El transplante de las plántulas se realizó a los 6 días de la siembra. El tratamiento se llevó a cabo en oscuridad a 25 °C y HR al 70%. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las líneas (T-test, p valor < 0,05).

En la figura anterior, se presentan las cinéticas de crecimiento de los hipocótilos transplantados con 6 días (2,5-3,5 cm) y tratados con manitol al 2 y 5%. En la gráfica se aprecia que a medida que aumentamos la concentración de manitol disminuye el crecimiento en un 37,6% en el tratamiento con manitol al 2% y un 73,3% en el tratamiento con manitol al 5%. En el tratamiento con manitol al 2%, la línea XET – describió una cinética con valores mayores a las otras dos líneas, pero que se igualó al final del mismo. En el tratamiento con manitol al 5% no se encontraron diferencias entre las cinéticas de crecimiento de las tres líneas estudiadas.

En la **Fig. I.16** se muestra la longitud de las raíces al finalizar el experimento (7 días).

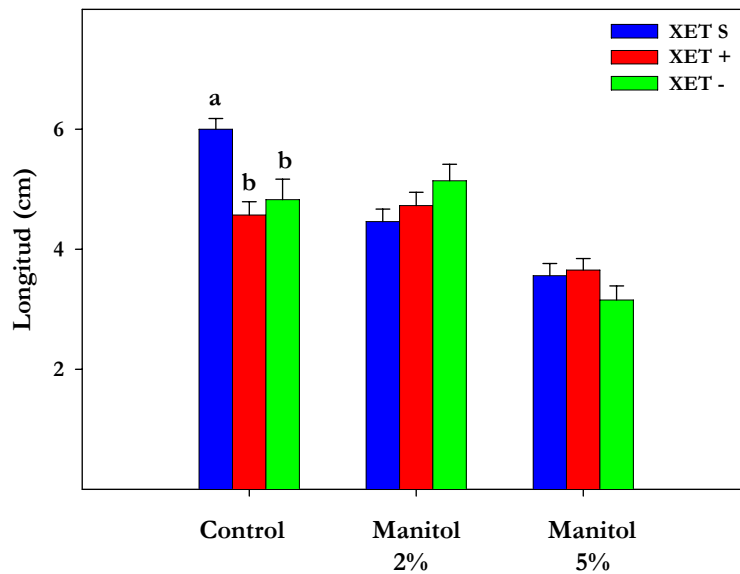


Fig. I.16 Longitud de las raíces de las plántulas XET S, XET + y XET –, bajo estrés hídrico, al terminar el experimento (7 días de tratamiento). Los tratamientos Control, manitol al 2% y manitol al 5% se llevaron a cabo en oscuridad a 25 °C y HR al 70%. Los valores representan la media \pm SE. Distintas letras indican diferencias significativas entre las líneas (T-test, p valor < 0,05).

Como puede verse en la figura, la longitud de las raíces de XET S en el Control fue mayor significativamente a las otras líneas y mayor que las raíces del

tratamiento con manitol al 2%. Por otro lado, la longitud de las raíces de XET + fue menor a las XET – en los tratamiento control y manitol al 2%, aunque la diferencia no fue significativa. Las raíces de las líneas transgénicas aumentaron la longitud ligeramente con el tratamiento de manitol al 2%. Y por último, el tratamiento con manitol al 5% redujo la longitud de las raíces de las tres líneas, y de modo notable en las plántulas XET – y XET S. La gráfica muestra como a medida que se agudiza el estrés hídrico, se igualan las diferencias en longitud de la raíz, registradas en los tratamientos más suaves sobre todo entre XET S y XET +. Este comportamiento coincide con el obtenido en el estrés salino. Cabe destacar que, en el tratamiento con manitol al 2%, las raíces más largas fueron las de la línea XET –, coincidiendo con su mayor crecimiento en longitud del hipocótilo.

Estrés térmico

Se evaluaron las cinéticas de crecimiento bajo condiciones térmicas adversas, por bajas temperaturas (5 °C y 15 °C) y por altas (35 °C y 50 °C). La **Fig. I.17** mostró comportamientos diferenciales entre los tratamientos, de modo que el tratamiento con 50 °C se detectó un crecimiento algo más lento que a 25 °C hasta el segundo día, pasado el cual se detuvo y terminó muriendo el hipocótilo al cuarto día del tratamiento. En el segundo tratamiento por altas temperaturas, se ensayaron con 35 °C y se registró un crecimiento similar a las plántulas sembradas a 25 °C, alcanzando una longitud final que fue dos cm inferior en el mismo tiempo.

En los ensayos por bajas temperaturas se observó que a 15 °C se ralentizó el crecimiento, necesitando 6 días más para alcanzar una longitud que fue alrededor de tres centímetros inferior al final del mismo. Durante la valoración del crecimiento a 5 °C se observó una inhibición del mismo, como ocurre en los estreses salino e hídrico, pero no fue mortal hasta los 13 días de tratamiento. En el caso de todas las cinéticas registradas a 5 °C, 15 °C, 35 °C y 50 °C no se contabilizaron diferencias en el crecimiento entre las tres líneas estudiadas.

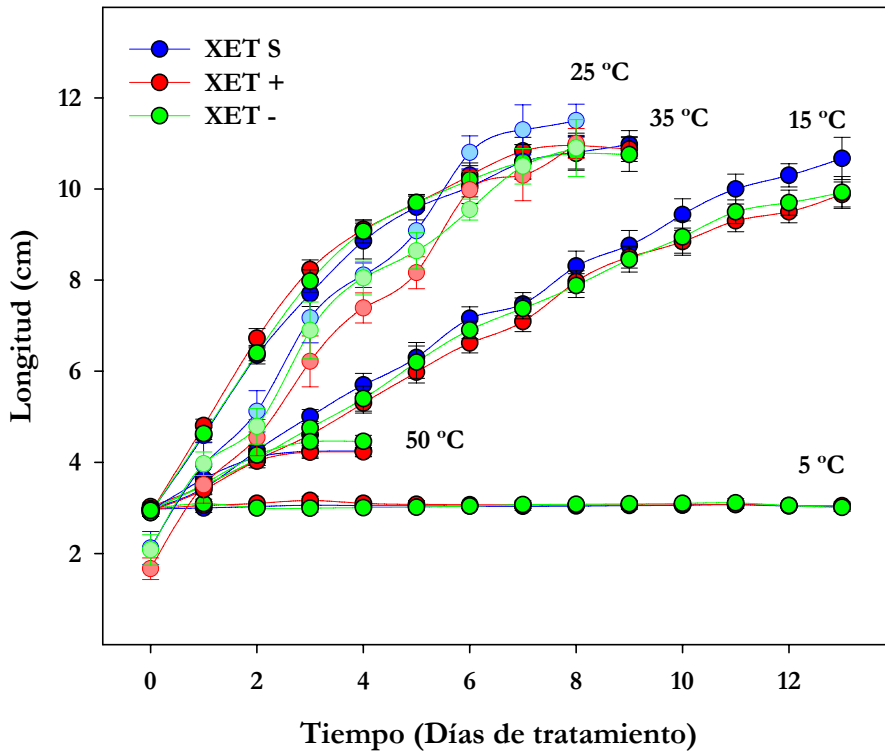


Fig. I.17 Cinética de crecimiento de los hipocótilos bajo estrés térmico. Se muestran las cinéticas que describen las tres líneas estudiadas, XET S, XET + y XET -, en respuesta a los tratamientos de 5 °C, 15 °C, 25 °C, 35 °C y 50 °C y frente al Control a 25 °C, representado en colores más claros. Los valores representan la media \pm SE. El transplante de las plántulas se realizó a los 6 días de la siembra. Los tratamientos se llevaron a cabo en cámaras termostataadas y en oscuridad. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las líneas (T-test, p valor < 0,05).

DISCUSIÓN

La familia multigénica de las XTHs codifica muchas isoenzimas con actividad tanto XET como XEH, las cuales parecen estar implicadas en procesos fisiológicos tan concretos como heterogéneos del desarrollo de las plantas. En nuestro trabajo, y con el objetivo de estudiar la implicación de la actividad XET

en el crecimiento, utilizamos plantas transgénicas que tenían modificada la expresión del gen *SXTH1*.

Los análisis filogenéticos comparativos del gen *SXTH1* (Clustal W: clustalw.genome.jp y www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi), comparando la secuencia nucleotídica frente a las XTHs descritas en *Arabidopsis* y tomate, y comparando análogamente las secuencias aminoacídicas inferidas, permitieron posicionar el gen *SXTH1* dentro del Grupo 1 (Nakamura *et al.*, 2003; Saladie *et al.*, 2006). El Grupo 1 se ha caracterizado por su asociación a procesos de elongación rápida (Rose *et al.*, 2002), aunque existen algunas excepciones confirmadas por estudios de expresión génica por RT-PCR y microarrays (Yokoyama *et al.*, 2004; Imoto *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005). En el caso concreto de *SXTH1*, se encontró una cantidad considerable en los análisis de hibridación *in situ* utilizando RNA total de hipocótilos (Saladie *et al.*, 2006).

Por ello, nuestros **resultados de expresión génica (Fig. I.3)** en la línea silvestre, confirman los encontrados en los estudios moleculares y relacionan a *SXTH1* con la expansión y elongación propias de las zonas en crecimiento. Los resultados de las plantas transgénicas, tanto las que sobre-expresan como las que tienen reprimidos los niveles de *SXTH1*, mostraron una respuesta de expresión génica acorde con su diseño genético. Hay que destacar que esta es la primera vez que se obtienen plantas que sobre-expresan un gen que codifica para una isoenzima que desarrollará una actividad XET y además se obtiene un aumento de la expresión asociada a las zonas de elongación de los tejidos en crecimiento, como la parte apical de los hipocótilos. Anteriormente, únicamente se habían conseguido plantas de tabaco que tenían inhibida la expresión de este mismo gen (Herbers *et al.*, 2001), y estas plantas con menor expresión de la XTH tenían disminuida la actividad XET tanto soluble como la covalentemente unida a la pared.

Seguidamente, al cuantificar la **actividad XET (Fig. I.4)** se observó la misma relación directa del aumento de actividad en las zonas de mayor elongación, como la zona apical, relacionando el gen *SXTH1* con la elongación. Si bien, esta relación no fue proporcional a la expresión génica de *SXTH1* registrada

en todas las partes de la plántula, posiblemente porque en la medida de la actividad enzimática estamos cuantificando la actividad XET de todas las isoenzimas de la familia y no sólo de la *SXTH1*. En la raíz se registraron los niveles más bajos de actividad, lo que podría ser explicado por la respuesta diferencial del control interno entre los tejidos del hipocótilo y la raíz.

La respuesta de las plántulas transgénicas, mostró que las plantas que sobre-expresan el gen, cuentan con mayor actividad XET soluble en la parte apical del hipocótilo, así como en la raíz, mientras que disminuyó la actividad XET de las que tienen reprimida la expresión. Sin embargo, la actividad XET covalentemente unida a la pared no mostró diferencias entre las líneas en ninguna parte de la plántula. Esta correlación de la alteración génica en las plantas transgénicas con la actividad XET soluble en hipocótilos y raíz, es un dato relevante ya que sugiere una especificidad enzimática del gen, puesto que *SXTH1* parece codificar una enzima principalmente soluble.

Para esclarecer el papel de la **XET en el crecimiento**, se estudiaron varias diferencias en el fenotipo entre las plantas silvestres y transgénicas, evaluando las cinéticas de crecimiento de plántulas (**Fig. I.1**) y el peso fresco y seco (**Fig. I.2**) de las mismas. Mientras que la disminución de la actividad XET, en las distintas partes de las plántulas, no estuvo acompañada de cambios en el fenotipo, sí los encontramos con el aumento de la actividad XET. De modo que, en las plantas que sobre-expresan *SXTH1* y tenían un aumento de la actividad XET soluble, se provocó una disminución del peso fresco y seco, obteniéndose hipocótilos más delgados y las raíces más cortas.

Estos resultados indicaban que los cambios en el fenotipo de las plántulas provocados por un aumento de la actividad XET soluble, podrían ser debidos a cambios en el metabolismo del xiloglucano, principalmente en las zonas de mayor crecimiento de la planta. Esta es la primera vez que se establece una relación directa entre el aumento de la expresión de un gen de la XTH (*SXTH1*), su actividad XET soluble y los cambios directos en el fenotipo. Los posibles cambios en la estructura del xiloglucano debidos a un aumento en la transglucosilación podrían provocar una mayor o menor incorporación de

xiloglucano a la pared. O alternativamente, podrían contribuir a aumentar la frecuencia de cortes en las cadenas de xiloglucano, relajando la estructura de la pared celular. Estos posibles cambios, podrían igualmente, modificar las relaciones de este xiloglucano con el resto de componentes de la pared.

Al realizar los análisis de la **estructura del xiloglucano mediante los XGOs (Fig. I.7)** presentes en las distintas partes de las plántulas, encontramos que no había diferencias cuantitativas ni cualitativas entre las plantas silvestres y las que cuentan con unos niveles de XET superiores. Sin embargo, el estudio de los **enlaces entre los componentes de la pared (Fig. I.8 y I.9)**, confirmó que las plantas que sobre-expresan la proteína XTH, se agrupan separadamente, mostrando una población completamente distinta a la compuesta por las plantas silvestres. Estas diferencias se encontraron en la zona de las pectinas y de la celulosa-xiloglucano. Los resultados sugieren que los enlaces característicos de las cadenas de celulosa-xiloglucano son diferentes, apoyando la idea de que el aumento de la actividad XET provoca modificaciones notables entre las uniones de las cadenas de xiloglucano, además de entre las cadenas de celulosa. Como apuntan algunos autores (Vissenberg *et al.*, 2005 a), la actuación de la XET sobre estos enlaces, regula el crecimiento, hecho que confirma la importancia de las uniones entre los componentes de la pared. De modo, que las paredes de las plantas XET + son diferentes porque están modificadas por un aumento de la actividad XET soluble.

Para estudiar la posibilidad de que las modificaciones de las uniones del xiloglucano a otros componentes de la pared, podrían ser también responsables de los cambios en las propiedades biomecánicas de la pared celular durante el crecimiento, determinamos la **extensibilidad de la pared celular (Fig. I.12)**. Los estudios confirmaron que era en la zona apical, donde existe una mayor expansión y elongación celular, donde se registró una mayor extensibilidad que en la zona basal, apuntando un efecto directo de la actuación de la XET en la extensibilidad, y consecuentemente en la elongación celular. En las plantas con mayor actividad XET soluble, que contaban con modificaciones en el xiloglucano, los hypocótilos eran más delgados y mostraron una mayor

extensibilidad. Además, las diferencias en la extensibilidad de las plantas XET – que tenían disminuida la actividad XET soluble, mostraron una extensibilidad irreversible inferior, hecho que apoya de nuevo la participación de la XET soluble en el proceso de la extensibilidad que acompaña a las zonas de rápido crecimiento. Esto sugiere que el control del metabolismo del xiloglucano por la XET regula la elongación celular. Este metabolismo pone de manifiesto que la incorporación de cadenas de xiloglucano o de XGOs, producen un efecto supresor o acelerador de la elongación, respectivamente. Se ha estudiado que este efecto se produce tanto extracelular como intracelularmente, mediante la reorientación de los microtúbulos (Takeda *et al.*, 2002).

Los **estreses abióticos (hídrico y salino, Fig. I.13-16)** afectan al crecimiento de las plantas, disminuyendo en mayor o menor grado, en función de las características del estrés y del momento de desarrollo de las plantas. Dependiendo de la composición y estructura de sus paredes celulares, primarias o secundarias, el efecto sobre la elongación es diferente. Por ello, se estudió la influencia de los estreses hídrico y salino sobre el crecimiento de plantas de tomate silvestres y de plantas de tomate transgénicas con la actividad XET aumentada y disminuida. Los resultados de estrés hídrico y salino severo mostraron que en las raíces, las diferencias en longitud entre la línea silvestre y XET + desaparecieron. De modo que, bajo estos estreses, las transgénicas igualan el crecimiento de las silvestres, confirmando que paredes celulares desiguales responden distinto a condiciones abióticas adversas. Estos resultados confirman las respuestas encontradas en varios trabajos, donde en la parte aérea la inhibición de la elongación por bajos potenciales hídricos es muy rápida (Nonami y Boyer, 1990 a y 1990 b), mientras que las raíces son menos sensibles a la inhibición del crecimiento por bajos potenciales hídricos (Wu *et al.*, 1996 y 2000). Nuestros resultados sugieren que la forma enzimática soluble de la XET codificada por el gen *SXTH1*, parece ser la responsable de la regulación de las modificaciones de la pared producidas durante los tratamientos de estrés hídrico y salino, ya que la mayor parte de la actividad soluble encontrada en la raíz, provoca que las plantas que sobre-expresan el gen *SXTH1*, mantengan su crecimiento. Adicionalmente, ha sido descrita tanto la

disminución como el aumento de una actividad XET en la zona de elongación de hipocótilos tratados con un bajo potencial hídrico (Wu *et al.*, 1994, 2000 y 2005). Estos autores correlacionan, además, el incremento de la extensión de la pared celular y del aumento de las expansinas bajo las mismas condiciones. Por otro lado, en los resultados de **estrés térmico** (**Fig. I.17**), no se obtuvieron diferencias en respuesta a los niveles diferenciales de actividad XET, mientras que algunos autores muestran el aumento de la expresión de una XTH en respuesta al estrés térmico (Xu *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 2006).

En resumen, los resultados anteriores sugieren que la XTH está implicada en el crecimiento, y más concretamente, la isoenzima que codifica el gen *SXTH1*, puesto que la sobre-expresión del gen *SXTH1*, que aumentó principalmente la XET soluble, provocó cambios irreversibles y permanentes en los enlaces del xiloglucano con el resto de los componentes. Estos cambios fueron, posiblemente, los responsables de un aumento de la extensibilidad en las zonas de mayor elongación de los hipocótilos y de la alteración del fenotipo.



CAPÍTULO II

Implicación de la xiloglucano endotransglucosilasa en el crecimiento de la planta

INTRODUCCIÓN

Las paredes celulares están formadas por una red tridimensional, cuyo esqueleto está constituido por microfibrillas de celulosa unidas mediante moléculas de xiloglucano. Esta estructura confiere unas características a las paredes celulares en función del tejido y órgano del que formen parte (Rose *et al.*, 2002), hecho que adquiere una importancia vital en el crecimiento secundario de las plantas (Kutschera, 1996; Cosgrove, 1997). Conjuntamente se registran diversos cambios en los componentes, como el depósito de orientación alterna de celulosa (Fukuda, 2004; Oda *et al.*, 2005), la digestión de xiloglucano de la pared primaria (Bourquin *et al.*, 2002; Matsui *et al.*, 2005), la disminución de las uniones de las hemicelulosas con la celulosa y otros complejos (Cosgrove, 1997) o la desesterificación de las pectinas, lo cual permite el aumento de la rigidez por la formación de enlaces de calcio (Goldberg, 1984). Además se produce un incremento de las uniones de los grupos fenólicos con proteínas estructurales, lignina y pectinas, generalmente coincidiendo con la actuación de las peroxidasas (Liszkay *et al.*, 2003). Asimismo, dicha estructura está regulada por un conjunto de enzimas que la metaboliza y la diseña. Se ha sugerido la implicación de la familia de las XTHs en ese proceso, puesto que puede encargarse, por un lado, de hidrolizar y, por otro, de transglucosilar (Campbell y Bramm, 1999 a; Steele y Fry, 2000; Rose *et al.*, 2002), es decir, de realizar cortes en el xiloglucano y/o re-unirlos introduciendo nuevos oligosacáridos (XGOs) o cadenas de xiloglucano, facilitando, tanto la expansión de la pared celular, como reforzando su estructura y rigidez (Potter y Fry, 1994; Bourquin *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2003; Matsui *et al.*, 2005).

Una vez que cesa el crecimiento rápido, las paredes celulares comienzan a sufrir una serie de cambios orientados hacia el aumento de la rigidez de la misma. De este modo, se ha encontrado una asociación entre el cese del crecimiento, la rigidez de la pared, el descenso de la actuación de las expansinas (Cosgrove y Li,

1993) y de la existencia de la proteína XTH con actividad XET, que incorpora nuevas cadenas de xiloglucano en las ya existentes (Nishitani, 1997).

Varios estudios mostraron hace ya tiempo, la existencia de la actividad XET en tejidos donde había **cesado el crecimiento** (Potter y Fry, 1993; Pritchard *et al.*, 1993; Potter y Fry 1994; Palmer y Davies, 1996; Herbers *et al.*, 2001). Otros estudios de localización *in situ* de la enzima, mostraron que todas las raíces viejas manifestaban una actividad XET uniformemente en toda su extensión, y que varias isoenzimas de la familia de las XTHs incorporaban nuevas cadenas de xiloglucano a la pared (Vissenberg *et al.*, 2001). En esa misma línea, se estudió una proteína XTH con actividad XET (*SXTH2*), viendo que su expresión era máxima después del crecimiento rápido propio de la expansión celular (Catala *et al.*, 2001). Por ello, se sugirió una participación de la XET en el depósito de xiloglucano adjunto a la celulosa como habían propuesto otros autores (Thompson y Fry, 1997) con el objetivo de **reforzar la pared celular** después de la expansión.

Asimismo, en otros estudios se relaciona la actividad de la proteína XTH con el refuerzo de las paredes celulares de los vasos conductores (Xu *et al.*, 1995; Antosiewicz *et al.*, 1997; Oh y Clouse, 1998; Vissenberg *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2003; Vissenberg *et al.*, 2005 a), concretamente durante la formación del xilema (Bourquin *et al.*, 2002; Matsui *et al.*, 2005). Se ha sugerido que la estructura y composición de la pared celular propia de cada tipo celular, sufre un cambio dinámico a lo largo del desarrollo de la misma (Pennell, 1998). En células xilemáticas, el depósito de xiloglucano responde a un proceso altamente específico y controlado por el desarrollo vascular. La inmuno-localización de xiloglucano fucosilado con anticuerpos, en tejido vascular de chopo, ha confirmado que moléculas de xiloglucano presentes en la pared primaria de traqueidas inmaduras, desaparecen posteriormente en las traqueidas maduras (Bourquin *et al.*, 2002). Además, en hipocótilos de soja, sí aparecen moléculas de xiloglucano en las paredes de las células más desarrolladas, pero no se detectan en las paredes primarias de las células de elementos del protoxilema (Ryser, 2003). Adicionalmente, se ha observado que en las células del mesófilo

de *Zinnia*, se produce una degradación del xiloglucano por enzimas hidrolíticas, el cual fue secretado a partir de los elementos de las traqueidas antes de que se observara la formación de los elementos secundarios (Stacey *et al.*, 1995). Estas observaciones sugieren una rápida degradación del xiloglucano de la pared de las células que posteriormente se diferenciarán en células xilemáticas. De modo que la XET, podría estar implicada en transglucosilar el xiloglucano para que se puedan diferenciar los distintos tejidos de la pared celular, principalmente los tejidos conductores y de sostén.

Asimismo, se asoció el aumento de las proteínas XTHs a la modificación de las paredes durante la formación de los espacios intercelulares y el refuerzo de la misma en respuesta a los estreses mecánicos como el viento (Antosiewicz *et al.*, 1997) y para la formación de los espacios aéreos del aerénquima de las plantas acuáticas (Saab y Sachs, 1995).

La actividad XET está implicada por una parte, en la elongación de la pared celular, mediante la transglucosilación de oligosacáridos de cadena corta, ayudada por la acción de las glucanasas y las glicosidasas. Y por otra, en el mantenimiento de la misma tras el cese del crecimiento, por la incorporación de cadenas largas de xiloglucano. Por lo tanto, ambos procesos dependerán de la disponibilidad de sustrato, de la cantidad de enzima con actividad XET y de la posible respuesta dependiente de la especificidad de la XET. En el Capítulo anterior, hemos relacionado la *SXTH1* con el crecimiento primario y la expansión y elongación celular en las plántulas. Ahora, nuestro propósito es estudiar la posibilidad de que esta enzima, con una actividad endotransglucosilasa manifiesta, también pudiera estar implicada en posibilitar y estabilizar la rigidez progresiva que adquieren las paredes secundarias en las plantas adultas, cuestión que adquiere una notable importancia, puesto que la mayoría de los trabajos han sido realizados con plántulas donde no se registra crecimiento secundario.

Además de su implicación en el crecimiento primario y secundario, otros estudios previos han puesto de manifiesto a relación de las XTHs con la **respuesta a estreses abióticos**, como la inducción de un gen que codificaba

una proteína XTH con actividad XET por efecto de la anoxia (Peschk y Sachs, 1994). Este gen fue igualmente inducido en la respuesta a la inundación y encharcamiento, asociado con cambios estructurales en la pared (Saab y Sachs, 1995), y también mostró un aumento en los tratamientos con etileno (Saab y Sachs, 1996), hormona necesaria para la formación del aerenquima en plantas acuáticas e indicadora de estreses abióticos. No podemos olvidar un trabajo recientemente publicado, donde se relaciona la expresión de un gen XTH (*CaXTH3*) con la tolerancia a la sequía, alta salinidad, baja temperatura y en respuesta al etileno, sugiriendo la importancia de esta enzima en la respuesta de defensa temprana frente a estreses abióticos (Cho *et al.*, 2006). Otro estudio realizado con *Arabidopsis*, muestra que una proteína XTH es inducida por estímulos ambientales, incluidos el contacto físico, el choque térmico, la salinidad o el estrés por frío (Xu *et al.*, 1995 y 1996).

De modo que en este Capítulo, afrontamos el estudio de la implicación de la XET en el crecimiento primario y secundario, utilizando las plantas transgénicas que sobre-expresan o tienen reprimida la expresión de *SXTH1*, (descritas en el Capítulo I), valorando la expresión génica de *SXTH1* y la actividad XET en las diferentes partes de las plantas y su correlación con el fenotipo obtenido. Además, se estudió el efecto que la acción enzimática XET ocasiona sobre la estructura del xiloglucano en las distintas partes de las plantas silvestres y en las transgénicas, las cuales tienen modificados los niveles de *SXTH1*. Para lo cual se analizó la composición de oligosacáridos del xiloglucano de la pared celular mediante espectroscopía de masas.

Por último, se abordó el estudio del comportamiento en el crecimiento de las plantas silvestres y transgénicas frente al estrés salino, con el objetivo de analizar la implicación de la actividad XET en la respuesta diferencial de la pared celular frente a los estreses abióticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El trabajo experimental se llevo a cabo con plantas de tomate silvestre (XET S) (*Solanum lycopersicum* L. variedad Money Maker) y las dos líneas de plantas transgénicas XET + y XET – que se obtuvieron en el Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), como se ha explicado en el Capítulo I.

Las semillas de la línea silvestre y de las dos líneas transgénicas, fueron sembradas y cultivadas en el invernadero del SCSIE de la Universitat de València, dentro de dos de las cabinas para el cultivo de transgénicos.

En el **Anexo II** se describen aspectos generales del cultivo de tomate, su origen y morfología, su distribución geográfica, las variedades comercializadas, los requerimientos edafoclimáticos, las técnicas culturales, las plagas y enfermedades, las alteraciones del fruto, su recolección y post-cosecha, su valor nutricional y la comercialización.

Cultivo de la línea silvestre (XET S) y las transgénicas (XET + y XET –) de *Solanum lycopersicum* L. variedad Money Maker en invernadero

Las semillas se sembraron en bandejas de poliestireno expandido, en cepellones independientes de turba 70/30 en invierno y 40/60 en verano y perlita expandida tipo A 13, proporción 3:1. Las características del sustrato se describen a continuación:

- Grado de estructura: Fina
- Neutralizante: Dolomita, 6 kg m⁻³
- Fertilización normal: PG-Mix 12,5-15-27: 0,8 kg m⁻³

- Fertilización orgánica: PG-Organic 3-2-2: 10 kg m⁻³
- pH: 5,8
- Uso: Sustrato speedling para semillero
- Fertilización: Nivel 1

Nivel fertilización	PG-MIX	PG-Orgánico
N	12,5%	3%
P ₂ O ₅	15%	2%
K ₂ O ₅	27%	2%
B	0,03%	20 ppm
Cu	0,15%	50 ppm
Zn	0,04%	200 ppm
Mn	0,16%	500 ppm
Fe	0,09%	800 ppm

El trasplante se realizó aproximadamente al mes de la siembra, en contenedor tipo 12 HC, con sustrato 50/50 y perlita expandida tipo A 13, proporción 2:1. Al mes siguiente se realizó un segundo y definitivo trasplante en contenedor tipo C-22, con un sustrato similar al anterior.

Después del segundo trasplante, el marco y la densidad de cultivo de tomate se realizó en mesas de cultivo de 1,80 x 4,00 m. Las plantas se distribuyeron en 4 filas de cultivo, separadas 20 cm, quedando dos filas a cada lado de la mesa. Las plantas se dispusieron a tresbolillo, separadas 50 cm. La densidad de plantación máxima resultante fue de 4 plantas por metro lineal de mesa.

Las **prácticas culturales generales** se describen a continuación:

Poda: Se hizo a un solo tallo, destallándose todos los brotes axilares. En verano-otoño se destalló semanalmente y en invierno cada 10-15 días.

Entutorado: Al mismo tiempo se fueron entutorando las plantas sobre una vara de bambú, atándose mediante bridas rápidas. De esta manera se mejoró la aireación general de la planta, el aprovechamiento de la radiación y se facilitaron las labores culturales.

Deshojado: Periódicamente se fueron eliminando las hojas senescentes con el fin de facilitar la aireación y mejorar el color de los frutos. También se

eliminaron las hojas enfermas, para impedir posibles fuentes de infección fúngica.

Despunte: Se realizó semanalmente el despunte de inflorescencias con excesivo número de flores, así como la eliminación de frutos recién cuajados con malformaciones, favoreciendo así el aumento del calibre y calidad de los frutos restantes y disminución del destrío. Esta práctica no se realizó en las cosechas en la cuales se valoró la productividad.

Pinzamiento: Consistió en podar el ápice del tallo, normalmente sobre el octavo o noveno racimo floral.

Cuajado del fruto: Se realizó el cuajado del fruto de forma mecánica, aprovechando el chorro de aire que desprende el equipo de aire acondicionado, el cual provoca el movimiento de las inflorescencias de la planta. En varias ocasiones se apoyó el cuajado con la introducción de insectos auxiliares (*Bombus terrestris* L.) y se compararon los rendimientos en sendas situaciones. Se comprobó que la eficacia del cuajado no mejoró significativamente con la introducción de estos insectos auxiliares.

La **fertirrigación** se manejó modificando la frecuencia y dotación, mediante riego por goteo. Se dispuso un emisor de 4 l h⁻¹ por maceta. El abonado utilizado fue el siguiente:

	Aniones mMol					Cationes mMol l ⁻¹					pH	CE mS cm ⁻¹	
	NO ₃	H ₂ PO ₄	SO ₄	HCO ₃	Cl	NH ₄	K	Ca	Mg	Na			
1ª SEMANA	AGUA DE RIEGO												
2ª SEMANA	-	2	-	0,5	-	-	-	-	-	-	5,5-6	1,1-1,6	
3ª Y 4ª SEMANA	7	2	-	0,5	-	-	3	-	-	-	5,5-6	1,6-2	
4ª SEMANA- CUAJE 2º RACIMO	12	1,5	2	0,5	-	-	5	6	2	-	5,5-6	2-2,2	
CUAJE 4º RACIMO 7º RAMILLETE	10	1,5	1	0,5	-	-	6	6	2	-	5,5-6	2,2-2,5	
ÚLTIMO CUAJE-FIN	10	1,5	1	0,5	-	-	7	5	2	-			

MICROELEMENTOS	Fe	Mn	Cu	Zn	B	Mo
Nutromix (%) p/p	7,5	3,3	0,3	0,6	0,7	0,2

Las **condiciones climáticas** del cultivo de tomate fueron las que se describen a continuación:

Parámetros	Germinación	Crecimiento	Floración	Polinización Cuajado Maduración
T ^a máxima día (°C)	25	22	24	25
T ^a mínima día (°C)	22	19	22	22
T ^a máxima noche (°C)	25	17	18	18
T ^a mínima noche (°C)	22	15	15	15
H.R. (%)	55-60	55-60	55-60	55-60
ILUMINACIÓN FOTOSINTÉTICA (Invierno)				
Inicio por Radiación (W m ⁻²)	-	100	100	100
Paro por Radiación (W m ⁻²)	-	300	300	300
Periodo	-	Amanecer- Anocheceer	Amanecer- Anocheceer	Amanecer- Anocheceer

Respecto al **control de plagas y enfermedades** se siguió un Programa de Manejo Integrado (PMI), mediante la evaluación de las plagas y enfermedades que aparecen durante el cultivo y seguimiento de las mismas. Se aplicó un control biológico por defecto, con la introducción de insectos y/o ácaros beneficiosos que fueron los depredadores naturales de las plagas. Se valoró la eficacia de su acción y en caso de que las poblaciones de la plaga superasen el umbral establecido se aplicó el control químico, tratando con productos fitosanitarios compatibles con los depredadores naturales introducidos. Adicionalmente, se utilizó control etológico mediante trampas amarillas que atraen a los individuos adultos de los insectos.

Las **plagas** más habituales que aparecieron durante el cultivo del tomate fueron de mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) y araña roja (*Tetranychus urticae* Koch), las cuales se controlaron mediante PMI, adecuando las prácticas siguientes:

PLAGA	MÉTODOS DE CONTROL	
	BIOLÓGICOS Suelta Fauna auxiliar	QUÍMICOS Compatibles Fauna auxiliar
Araña Roja: <i>Tetranychus urticae</i>	<i>Phytoseiulus persimilis</i>	Azadiractin Clofentezín Hexitiazox
Mosca Blanca: <i>Bemisia tabaci</i>	<i>Eretmocerus mundus</i> <i>Eretmocerus eremicus</i>	Jabón potásico Buprofezin Imidacloprid (riego)

Las **enfermedades** más frecuentes que atacaron al cultivo de tomate en el invernadero fueron el mildiu (*Phytophthora infestans*) y el oidio (*Liveillula taurica*), los cuales fueron controlados como sigue:

HONGO	MÉTODOS DE CONTROL	
	BIOLÓGICOS Suelta Fauna auxiliar	QUÍMICOS Compatibles Fauna auxiliar
Oidio	--	Ciproconazol Azufre Tebuconazol
Mildiu	--	Tebuconazol
Botritis	--	Iprodiona Clorotalonil Tebuconazol

No olvidemos que al tratarse de variedades transgénicas, todo el material vegetal que es retirado tuvo que ser eliminado de forma segura. Para ello, se cumplió con la **normativa** descrita para instalaciones y actividades que se desarrollan con organismos modificados genéticamente (OMG) Nivel 3.

Cinética de crecimiento en altura y foliar

Para estudiar la cinética de crecimiento en altura de las plantas silvestres y transgénicas, se identificaron numéricamente las plantas y se midió su altura total, desde la base de la planta hasta el meristemo apical de la misma. Para medir la cinética de crecimiento foliar, se midió la hoja desde su unión al tallo

hasta su ápice. En ambos casos se utilizó una regla flexible para poder realizar las medidas sin ocasionar daños. Para medir el grosor del tronco se usó un nonius o pie de rey y se determinó su diámetro mayor. Las medidas de cinética de crecimiento se comenzaron a registrar a los 6 días tras la siembra, inmediatamente después de la germinación, y se finalizaron cuando se inició la producción de frutos. Las plantas fueron medidas con una frecuencia de tres veces por semana. Las cinéticas de crecimiento se valoraron en cuatro ocasiones entre los años 2002-2005, tanto en la cosecha estival como en la invernal, utilizando 24 plantas por línea y cosecha.

Biomasa vegetal. Productividad

La biomasa de la planta se determinó por pesada, cuantificando el peso fresco y seco de cada una de las siguientes partes: raíz, tallo y nervio y lámina de la hoja. Dicha determinación se llevó a cabo en las dos cosechas del año 2005, usando 12 plantas de cada una de las líneas estudiadas.

También, se determinó el número de frutos y su peso en cada racimo en las tres líneas estudiadas.

Para determinar la productividad de las plantas se establece una relación entre kg de fruto por kg de planta. Para ello, se cuantificaron los kg de tomate producidos por cada planta (producción) y los kg de peso fresco cuando finalizó su producción e iba a ser eliminada (biomasa vegetativa). Este estudio se realizó durante las dos cosechas del año 2002.

Extracción de mRNA. Síntesis de cDNA. PCR cuantitativo en tiempo real

La extracción de mRNA y la síntesis de cDNA, se realizó como se describe en el Capítulo I. Para la cuantificación de la expresión de *SXTH1* se utilizó la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real, donde se procedió del mismo modo que en el Capítulo I.

Actividad xiloglucano endotransglucosilasa

Se procedió a extraer la proteína de las partes de la planta igual que en el Capítulo I. Para el ensayo de la actividad XET soluble e insoluble se procedió análogamente a como se describe en el Capítulo I.

Análisis de los oligosacáridos del xiloglucano mediante espectroscopía de masas MALDI-TOF MS

Se procedió a extraer las paredes celulares de las partes de la planta análogamente al Capítulo I. Para el análisis de los oligosacáridos del xiloglucano se siguieron las mismas indicaciones para la espectroscopía de masas MALDI-TOF MS que se explican en el Capítulo I.

Crecimiento en estrés salino

Los ensayos de estrés salino con plantas se realizaron en invernadero, bajo las mismas condiciones agroclimáticas descritas para el cultivo de plantas de tomate. El tratamiento comenzó después del primer trasplante a maceta de tipo 12 HC, transcurrido un mes después de la siembra, cuando las plantas alcanzaban una altura aproximada de 7 cm y contaban con 3-4 hojas. Se colocaron 6 macetas por bandeja (57 x 42 x 8,5 cm), donde se aplicaron riegos de 500 ml de solución nutritiva en los controles. Las bandejas de tratamiento se regaron con la misma cantidad de solución nutritiva y la concentración de cloruro sódico correspondiente. La frecuencia de riego se adaptó a las necesidades de las plantas para evitar el encharcamiento, de modo que se fueron espaciando los riegos a medida que se aumentaba la concentración salina del tratamiento. Se valoró la cinética de crecimiento de las plantas midiendo el crecimiento desde la base de la planta hasta su meristemo apical. Se ensayaron las siguientes concentraciones de NaCl: Control (0 mM), 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 200 mM y 400 mM, entre las cosechas de 2002 y 2006. Para los experimentos se emplearon 12 plantas para cada tratamiento por línea. Se prestó especial interés en minimizar el efecto posicional en la cabina, por lo

cual se rotaron las bandejas en la mesa y las macetas de cada bandeja cada 4 días.

RESULTADOS

Estudio de las características relativas al crecimiento y elongación celular: cinéticas de crecimiento, biomasa y productividad

Cinéticas de crecimiento

En primer lugar, se estudió la cinética de crecimiento de las plantas que se muestra en la **Fig. II.1**. Las curvas descritas muestran el crecimiento vegetativo de las plantas desde su germinación, en el sexto día tras la siembra, hasta el comienzo del desarrollo y maduración de frutos, que se produce hacia el centésimo día tras su siembra. En la figura se observa una primera fase de crecimiento lento hasta el día quincuagésimo, seguida de una segunda fase de crecimiento lineal que se mantiene hasta el inicio del desarrollo y maduración de frutos tras el cuajado de la flor. Las cinéticas de crecimiento no muestran diferencias significativas entre las tres líneas estudiadas en el crecimiento total de la planta, tras aplicarles a los datos un T-test (p valor $< 0,05$).

Adicionalmente, se compararon los datos mediante análisis bayesiano, y se obtuvieron las siguientes probabilidades: XET +/XET S: $\Pr [\phi > 1 | \text{data}] = 0,395$; XET -/XET S: $\Pr [\phi > 1 | \text{data}] = 0,509$; XET +/XET -: $\Pr [\phi > 1 | \text{data}] = 0,460$. Estos resultados indican que no hay diferencias significativas entre las líneas estudiadas, puesto que cuanto más próximo esté la probabilidad a la unidad, mayores diferencias existen entre las dos poblaciones comparadas.

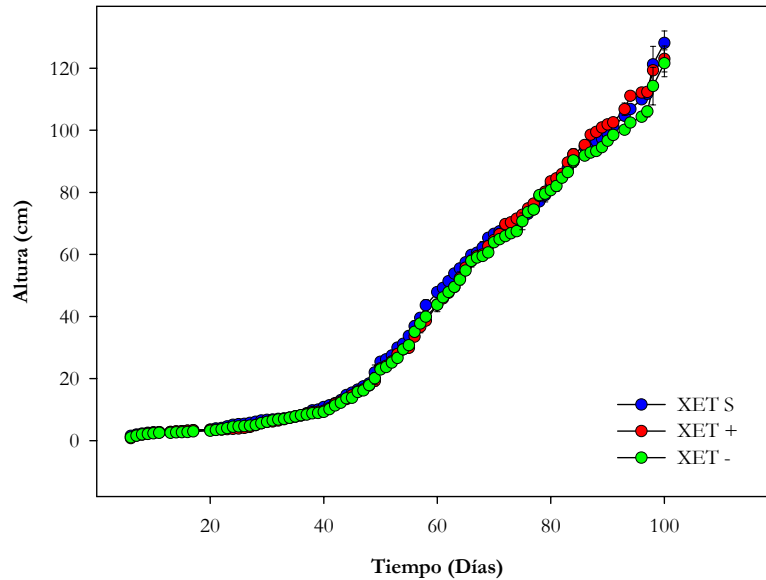


Fig. II.1 Cinética de crecimiento de las plantas de tomate silvestres (XET S) y transgénicas (XET + y XET -) en invernadero. Se midió la altura de la planta desde su germinación hasta el comienzo del desarrollo de los frutos. La gráfica muestra la media \pm SE de la altura de 24 plantas por variedad cultivadas entre los años 2003-2005, tanto en periodo invernal como estival, pertenecientes a 5 cosechas. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las líneas (T-test, p valor $<$ 0,05).

La cinética de crecimiento foliar fue valorada en las tres líneas de tomate (**Fig. II.2**). Para ello se midió la longitud de la hoja desde la unión al tallo hasta el ápice, desde la tercera hoja verdadera hasta la vigésima. Las medidas se registraron desde que se identificó la hoja en el meristemo apical hasta el septuagésimo día donde se comprobó que prácticamente cesaba el crecimiento en longitud de la hoja. La cinética de crecimiento foliar de todas las hojas medidas (de la 3^a a la 20^a), mostró una cinética similar que se resume en las tres curvas sigmoides de las plantas silvestres (XET S) y transgénicas (XET + y XET -). Como puede verse en la figura, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento foliar entre las tres líneas estudiadas. Además de valorar la cinética de crecimiento foliar, se caracterizó el tamaño de cada una de

las hojas que se usaron para definir la curva de crecimiento. El tamaño de las hojas se indica con las flechas sobre la curva de crecimiento.

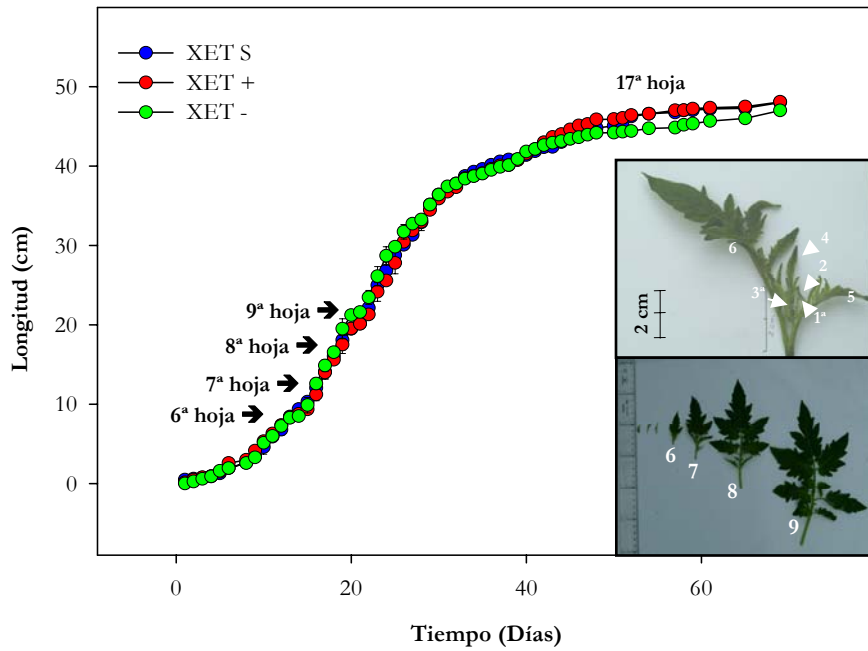


Fig. II.2 Cinética de crecimiento foliar de las plantas de tomate silvestres (XET S) y transgénicas (XET + y XET -) en invernadero. Se midió la longitud de la hoja desde su unión al tronco hasta el ápice. La gráfica muestra la media \pm SE de la longitud de la hoja de 24 plantas por variedad cultivadas entre los años 2003-2005, tanto en periodo invernal como estival, pertenecientes a 5 cosechas. Las flechas situadas sobre la gráfica indican la longitud de las hojas 6ª a 9ª y de la hoja 17, la cual ha dejado de crecer. Las imágenes de la parte inferior derecha muestran el tamaño de la 1ª a la 6ª y de la 6ª a la 9ª hoja. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las líneas (T-test, p valor < 0,05).

En el margen inferior derecho de la **Fig. II.2**, se presenta una muestra fotográfica de la identificación de las hojas. El crecimiento de las hojas se estabiliza hacia la hoja decimoséptima de la planta, momento en el que ha alcanzado una longitud media de 48 cm. A partir de este momento las hojas comienzan a sufrir procesos senescentes y las más adultas fueron retiradas.

También se cuantificó la evolución del crecimiento en grosor del tronco a partir del tercer entrenudo en plantas de 27 hojas, como se observa en la **Fig. II.3**.

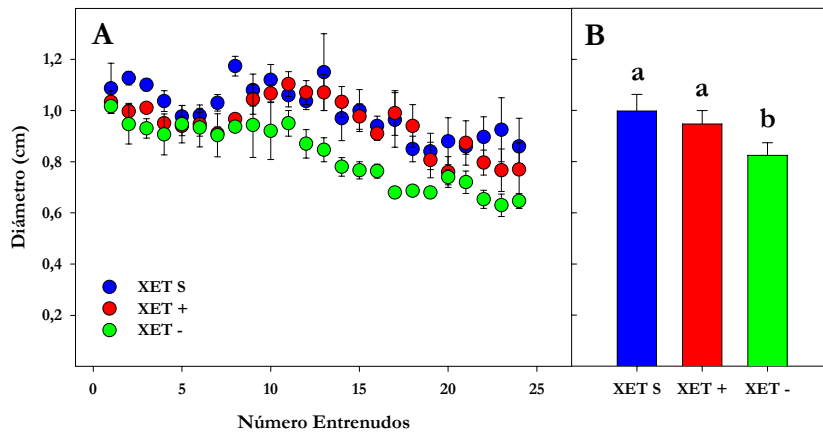


Fig. II.3 Grosor del tronco de las plantas de tomate silvestres (XET S) y transgénicas (XET + y XET -) sembradas en invernadero. **A)** Diámetro del tronco desde la base al 24° entrenudo de plantas con 27 hojas. **B)** Media del diámetro de los entrenudos del 1° al 24° de plantas de 27 hojas de las tres líneas estudiadas. Las gráficas muestran la media \pm SE de 24 plantas por línea cultivadas en el año 2005. Distintas letras indican diferencias significativas entre las líneas (T- test, p valor $<$ 0,05).

Como puede observarse en la **Fig. II.3. A**, el grosor del tronco de todas las líneas va disminuyendo progresivamente (59% en XET S, 45% en XET + y 58% en XET -) a medida que nos acercamos al meristemo apical de la planta. En la **Fig. II.3. B** se representa una media del grosor de los entrenudos medidos. Los resultados muestran que el diámetro del tronco de las plantas de la línea silvestre fue mayor significativamente al de las plantas XET -, mientras que no se encontraron diferencias entre el diámetro de las plantas XET S con el de las plantas de la línea XET +. A su vez, la línea XET + también registró un diámetro mayor significativamente al de la línea XET -.

Biomasa

Se cuantificó la **biomasa de las plantas** (Fig. II.4) utilizando plantas adultas con 12 hojas (42 cm de altura), a las cuales les fueron separadas las partes a estudiar, como son las raíces, tallos y nervios y láminas de la hoja, como se muestra en Fig. II.4. A.

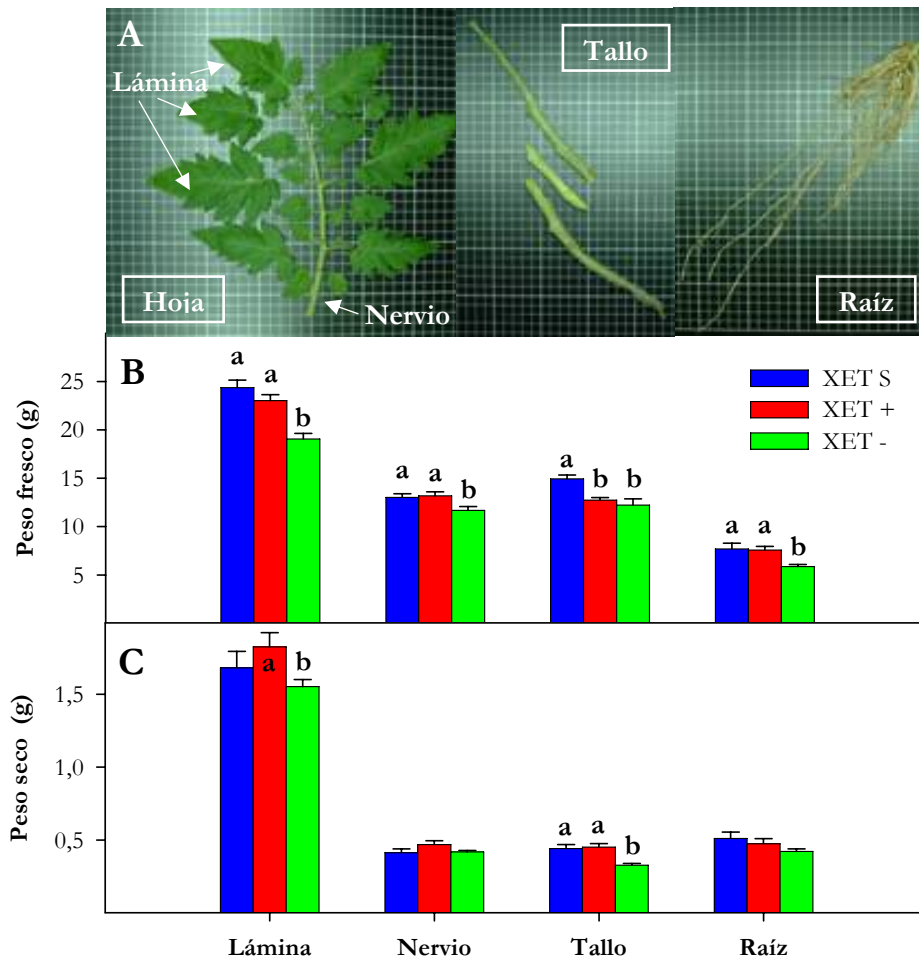


Fig. II.4 Biomasa de las plantas de tomate silvestres (XET S) y transgénicas (XET + y XET -) con 12 hojas. **A)** Disociación de los órganos estudiados de una planta de 12 hojas. **B)** Peso fresco de lámina y nervio de la hoja, tallo y raíz de la planta. **C)** Peso seco de las mismas partes de la planta. Las gráficas muestran la media \pm SE de 24 plantas por variedad cultivadas en el año 2005, tanto en periodo invernal como estival. Distintas letras indican diferencias significativas entre las líneas (T- test, p valor < 0,05).

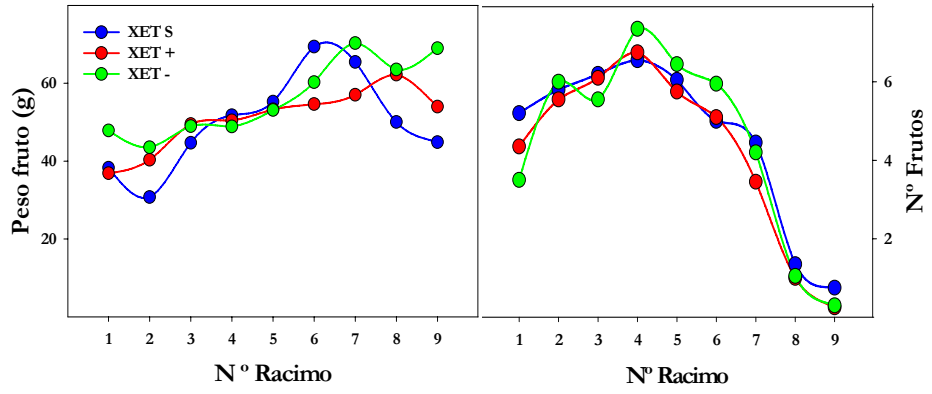
La biomasa se valoró mediante el peso fresco (**Fig. II.4. B**) y peso seco (**Fig. II.4. C.**) de las partes de las plantas. Los resultados muestran que el valor de peso fresco, **Fig. II.4. B**, de las láminas, nervios, tallos y raíces de la línea XET S son significativamente superiores a la línea transgénica, XET -. Mientras que sólo el peso fresco de los tallos XET S fue mayor significativamente frente a la línea transgénica XET +. A su vez, el peso fresco de las láminas, nervios y raíces de la línea XET + fueron mayores significativamente a la línea XET -. Cuando evaluamos la biomasa mediante el peso seco, **Fig. II.4. C**, se encontró que el peso seco del tallo de las líneas XET S y XET + fue mayor significativamente a la línea XET -. Las láminas foliares de la línea XET + fueron más pesadas significativamente que las de la línea XET -, según el análisis estadístico, sin encontrarse diferencias significativas con la XET S. A su vez, entre los nervios de las hojas y las raíces no se encontraron diferencias significativas en el peso seco entre las líneas estudiadas.

Productividad

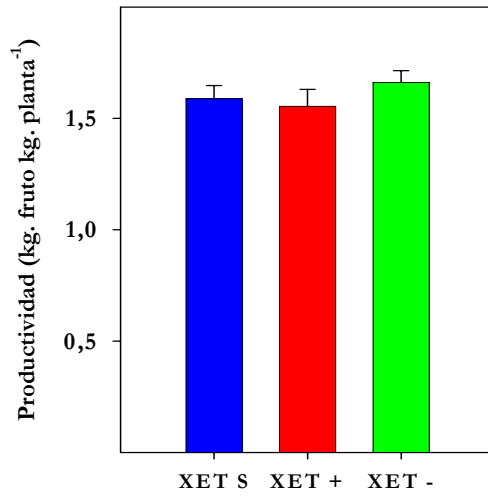
La productividad del cultivo puede evaluarse por la cantidad (kg) de frutos recolectados por cada kg de planta, expresado como peso fresco, al terminar su periodo productivo. Esta relación muestra la proporción entre órgano productivo y órgano vegetativo, revelando la inversión de los recursos que hace la planta cuando las condiciones ambientales son óptimas.

En la **Fig. II.5** se exponen los datos de producción de frutos y productividad. El peso medio de los frutos y el número de ellos que se consigue en cada racimo se presenta en la **Fig. II.5. A** de la gráfica. Los tomates con un peso mayor se registraron entre el racimo 6° y 8°, según la línea. Respecto al número de frutos de cada racimo, se contabilizaron una media de 6 unidades entre los racimos 3° y 5°. Como cabía esperar, en los racimos con tomates más pesados (6° - 8°), su número era menor.

A



B



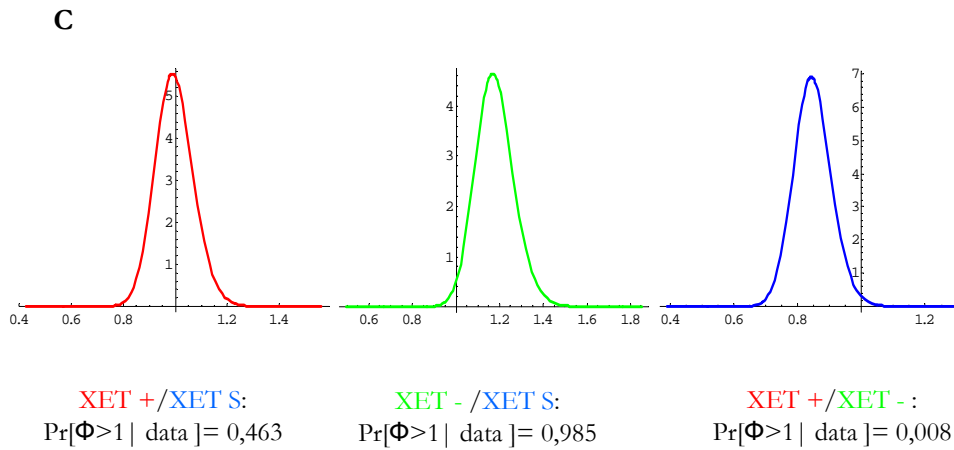


Fig. II.5 Productividad de plantas de tomate de las líneas silvestre (XET S) y transgénicas (XET + y XET -). **A)** En la parte izquierda se presenta la media del peso de los frutos por cada racimo y en la derecha el número medio de frutos por racimo. Se contabilizaron los frutos de las dos cosechas cultivadas en 2002, con 24 plantas por cada línea y por cosecha. En **B)** se muestra la productividad de la planta. Los datos representan la media \pm SE de dos cosechas cultivadas en 2002, con 24 plantas por cada línea y por cosecha. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las líneas (T- test, p valor < 0,05). En **C)** se muestran los resultados del análisis bayesiano aplicado a la productividad de la planta.

En la **Fig. II.5. B** se presenta la productividad de las plantas de las tres líneas. Para establecer esta relación se cuantificaron los kg de frutos y la biomasa de la planta una vez que terminó su producción de frutos. Tras aplicarse un análisis T-test (p valor < 0,05) no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, cuando a los datos anteriores se les aplicó un análisis estadístico bayesiano, **Fig. II.5. C**, si que se detectaron diferencias en la productividad de las tres líneas. Estos resultados se interpretan a partir del valor de la probabilidad que resulta de comparar las líneas dos a dos. De modo que la línea XET - era la más productiva significativamente respecto a la línea XET S. La línea XET + cuenta con una productividad similar a la línea XET S y menor que la XET -, pero sin que en ningún caso esas diferencias fueran significativas.

Análisis de la expresión de *SIXTH1* mediante PCR cuantitativo en tiempo real

Con el objetivo de caracterizar molecularmente las plantas, se estudió la expresión del gen *SIXTH1* mediante PCR cuantitativo en tiempo real. Se analizaron cuatro partes de plantas de 12 hojas: raíz, tallo y nervios y láminas de la hoja. Como se muestra en la **Fig. II.6**, no se detectaron diferencias a nivel de expresión de *SIXTH1* entre los órganos pertenecientes a la línea XET S y la XET +. La expresión mayoritaria en estas plantas se produce en los órganos conductores de la planta, contabilizándose valores de expresión que rondan 1,5%. Por el contrario, las raíces y las láminas, muestran una expresión del 0,1% y 0,2% respectivamente. La línea XET -, por su parte, si muestra unas notables diferencias frente a las anteriores, registrándose expresiones mucho menores que no alcanzan el 0,04% en ninguna de las partes estudiadas.

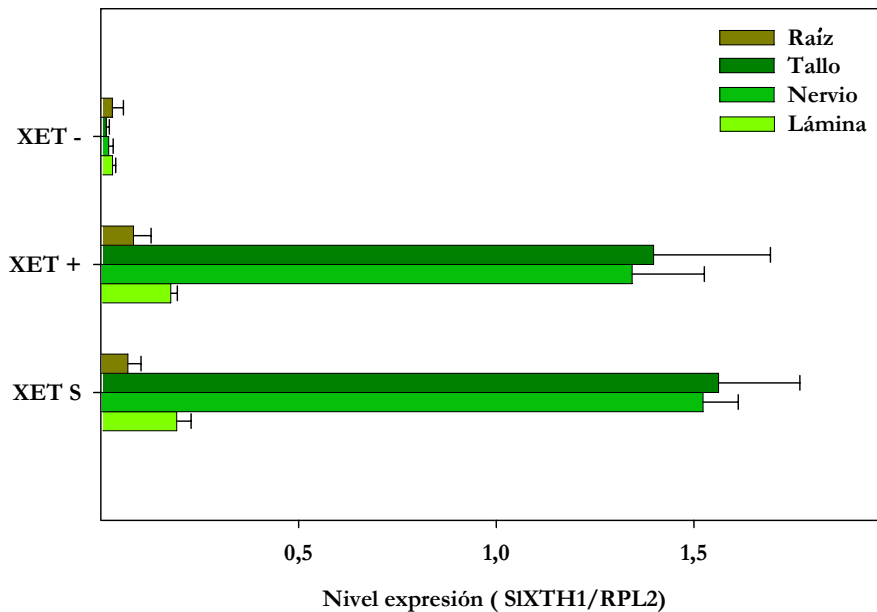


Fig. II.6 Expresión diferencial del gen *SIXTH1* en las distintas partes (lámina y nervio de la hoja, tallo y raíz) de plantas silvestres (XET S) y transgénicas (XET + y XET -) de 12 hojas. Se cuantificó mediante PCR cuantitativo en tiempo real (7000 ABI Prism; Applied Biosystem), usando *PowerSYBR® Green* como fluorocromo. Los valores mostrados son la media \pm SE de 2 experimentos independientes, usando material homogenizado de cada parte estudiada procedente de 12 plantas por línea y por experimento.

Determinación de la actividad xiloglucano endotransglucosilasa

Se analizó tanto la actividad soluble de la XET como la insoluble o covalentemente unida a la pared celular (**Fig. II.7**) en las distintas partes de la planta en periodo de crecimiento vegetativo.

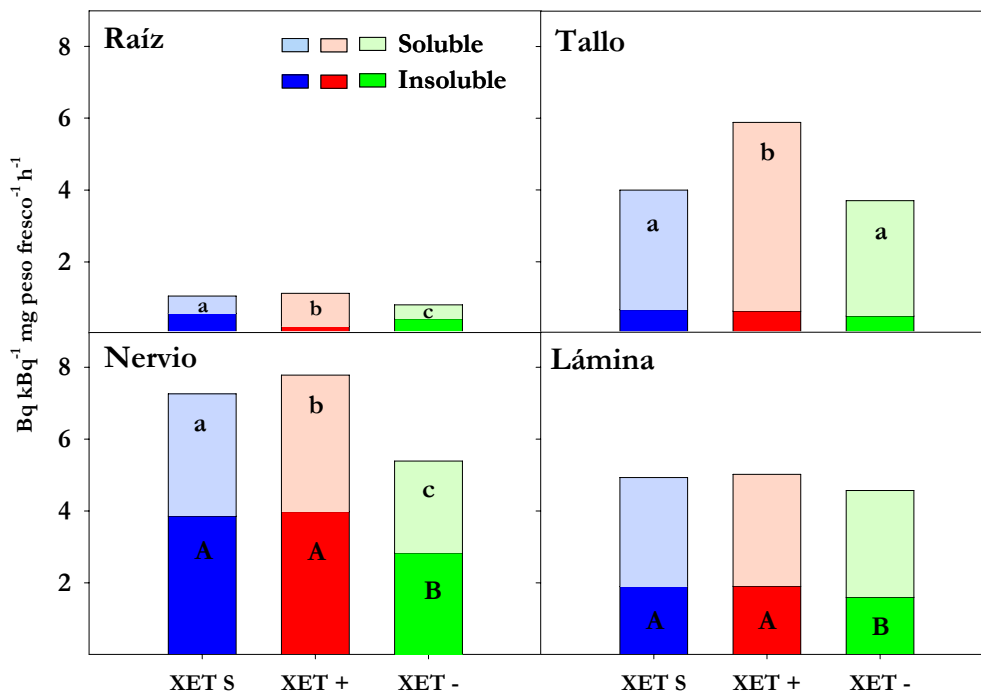


Fig. II.7 Actividad XET soluble e insoluble en raíz, tallo y nervio y lámina de la hoja de plantas de 12 hojas. Las gráficas muestran la media de al menos 3 cosechas recolectados entre 2001-2005 de 12 plantas por líneas cada uno. Distintas letras indican diferencias significativas entre las líneas en la XET soluble (letras minúsculas) y en la XET insoluble (letras mayúsculas) (T- test, p valor < 0,05).

Al analizar los resultados de la XET soluble, podemos apreciar como los mayores niveles enzimáticos, se encontraron en las partes que contienen un elevado porcentaje de tejidos conductores, puesto que su máxima actividad se registró en el tallo, seguida de la actividad en nervio y en la lámina de la hoja y,

por último, en la raíz, en todas las líneas. De modo que un 66,3; 69,0 y 62,7% de la actividad XET soluble total de XET S, XET + y XET -, respectivamente, se encontró en los tejidos vasculares. En la raíz, tallo y nervio, la línea XET S se registró una actividad menor significativamente que en la línea XET +. En raíz y nervio, las líneas XET S y XET + contabilizaron una mayor actividad significativamente a la línea XET -, mientras que en tallo, sólo la XET + fue mayor significativamente a la XET -. En las láminas de las hojas no se encontraron diferencias significativas de la XET soluble entre las líneas estudiadas.

Cuando analizamos la actividad XET insoluble o unida covalentemente a la pared (**Fig. II.7**) se encontraron los mayores valores en los nervios de todas las líneas (un 55,0; 58,9 y 51,8% en XET S, XET + y XET -, respectivamente del total). Mientras que en las láminas de las hojas y tallos la actividad insoluble fue del 37,7; 38,2 y 40% en XET S, XET + y XET -, respectivamente del total. En las raíces la actividad fue mucho menor. La actividad insoluble de las líneas XET S y XET + fue similar en todos los órganos. En nervios y láminas de la hoja, la línea XET - mostró valores inferiores significativamente a las líneas XET S y XET +. En raíces y tallos no se encontraron diferencias significativas entre las tres líneas estudiadas.

Por último, si comparamos la actividad XET soluble frente a la insoluble, obtenemos que en raíz, tallo y lámina la actividad soluble es mayor a la insoluble en todas las líneas. En el caso de los nervios, la actividad soluble e insoluble fue similar y la más destacable registrada en la planta, con un 42,2; 39,0 y 36,6% en XET S, XET + y XET -, respectivamente, de actividad total (soluble e insoluble) de los nervios respecto a la actividad total de la planta. Por último, el 59,8; 66,2 y 62,7% en XET S, XET + y XET -, respectivamente, de la actividad total fue debida a la actividad XET soluble.

De modo general, se puede apreciar que la línea XET + registró una actividad XET soluble e insoluble, ligeramente superior a la línea silvestre. A su vez, la línea XET -, mostró valores claramente inferiores a la línea silvestre.

Estudio de la composición cualitativa del xiloglucano de plantas mediante MALDI-TOF MS

Se analizaron los oligosacáridos del xiloglucano de raíz, tallo y nervio y lámina de hoja de las plantas XET S y XET + de 12 hojas en la **Fig. II.8**. Las áreas relativas de los oligosacáridos del xiloglucano se integraron manualmente a partir de los valores de m/z resultantes de los espectros de masas, identificados por la tabla del Capítulo I, (**Fig. I.5**).

En la **Fig. II.8** puede apreciarse que la distribución de los oligosacáridos en las plantas XET S es menor a las plantas XET + en los distintos órganos. De modo que, XXG y LSGG sólo aparece en la línea transgénica XET +. Los oligosacáridos mayoritarios fueron XXGG y XSGG. En raíz, tallo y lámina, el mayoritario es XXGG, mientras que en nervios fue XSGG en ambas líneas. En la línea silvestre los oligosacáridos mayoritarios oscilan entre 40% y 60% en raíces, tallos y nervios. En las láminas encontramos que XXGG alcanza el 85% y XSGG tan sólo el 15%. En la línea XET + los oligosacáridos mayoritarios oscilan entre el 30% y 50% en tallos, nervios y láminas, mientras que en raíces XXGG alcanza el 65% y XSGG tan solo el 28%. Si comparamos los oligosacáridos por líneas, podemos apreciar que XXGG es inferior en las plantas XET S respecto a las XET + en todos los órganos excepto en las láminas. Con XSGG ocurre lo contrario, siendo mayor en XET S excepto en las láminas. El oligosacárido más complejo, XTGG, se detectó en porcentajes inferiores al 5% en ambas líneas, aunque en raíces solo estuvo presente en la línea transgénica.

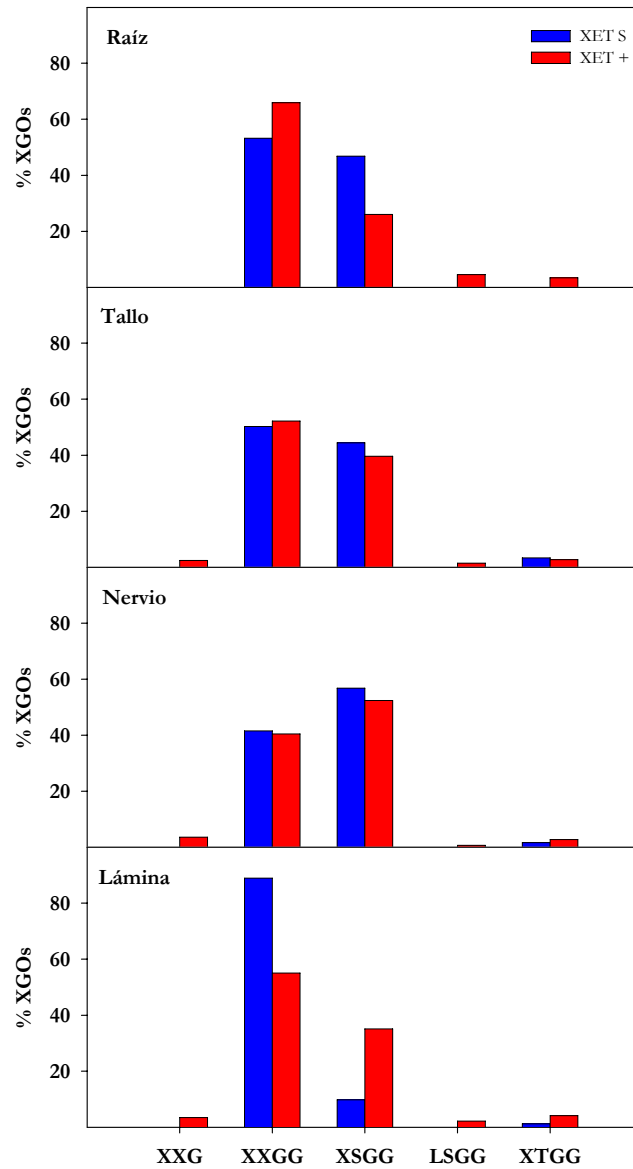


Fig. II.8 Porcentajes relativos de oligosacáridos del xiloglucano presentes en la raíz, tallo y nervio y lámina de hojas de plantas de 12 hojas. Se presentan los resultados obtenidos en la línea silvestre XET S y la transgénica XET +, que muestran la media de dos análisis de 12 plantas por línea de dos cosechas pertenecientes a los años 2005-2006.

Adicionalmente, se realizó un estudio exhaustivo de los oligosacáridos del xiloglucano de los nervios (**Fig. II.9**) y láminas (**Fig. II.10**) desde la 6^a hasta la 9^a hoja en las dos líneas.

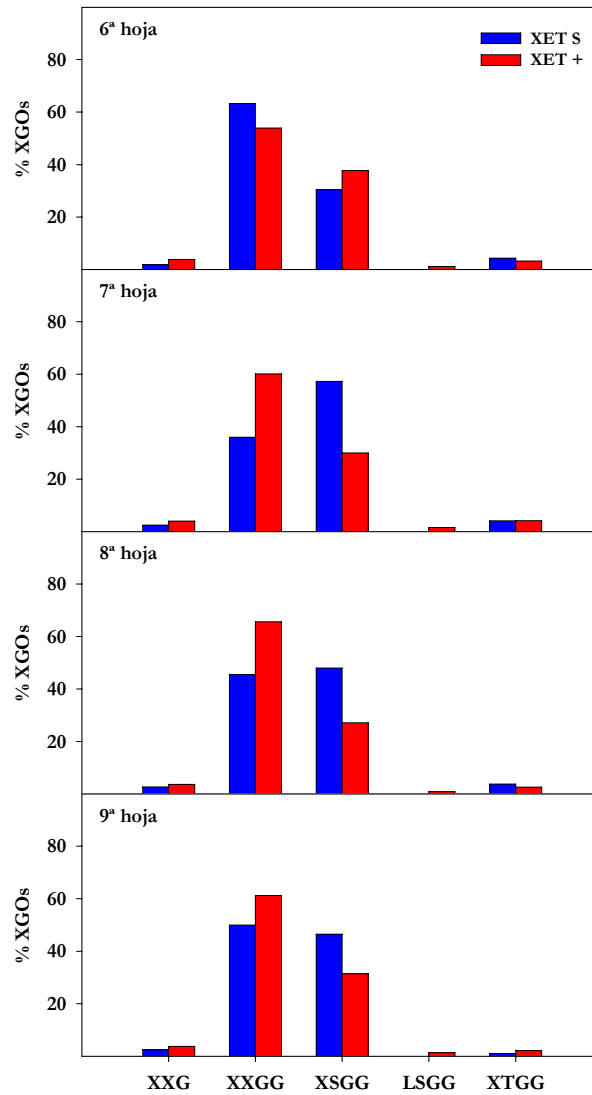


Fig. II.9 Porcentajes relativos de oligosacáridos del xiloglucano presentes en nervio de la 6^a a la 9^a hoja de plantas de 12 hojas. Los resultados muestran la media de dos análisis de 12 plantas pertenecientes a la línea silvestre XET S y a la transgénica XET +.

Los resultados de oligosacáridos del xiloglucano de nervios de las hojas (**Fig. II.9**) muestran una distribución completa de los oligosacáridos estudiados, siendo los mayoritarios XXGG y XSGG en las dos líneas. En los nervios de la hoja no se aprecian notables variaciones a medida que la hoja crece, puesto que los porcentajes de XXGG se mantienen entre 40% y 65% y los de XSGG entre 30% y 40% en la línea transgénica y entre 50% y 60% en la línea silvestre. De modo que en la línea transgénica el XXGG es el oligosacárido mayoritario en todos los nervios de las hojas. Mientras que en la línea silvestre oscila la relación, siendo mayor XXGG en el 6° nervio, menor en el 7° y similar en el 8° y 9°. El oligosacárido más sencillo, XXG, muestra porcentajes que rondan el 4% en la línea XET S y el 5% en la XET + en todas las hojas. El oligosacárido LSGG no se detectó en la línea silvestre y si en la transgénica, aunque con niveles muy bajos que oscilan entre un 2% y un 4%. El oligosacárido más complejo, XTGG, se cuantificó por igual en ambas líneas, disminuyendo su porcentaje paralelamente a la madurez de la hoja.

Los resultados de oligosacáridos del xiloglucano de las láminas de la 6ª a la 9ª hoja, se muestran en la **Fig. II.10**, donde se observa que el oligosacárido mayoritario es XXGG, el cual a medida que la hoja crece, aumenta de 70% hasta 98% en las dos líneas.

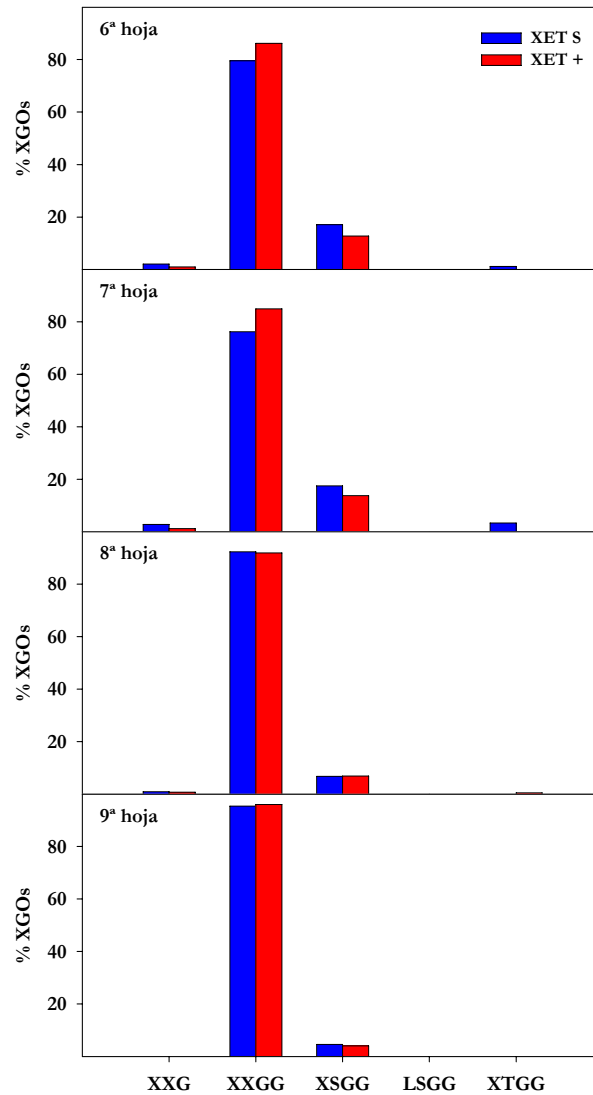


Fig. II.10 Porcentajes relativos de oligosacáridos del xiloglucano presentes en la lámina de la 6ª a la 9ª hoja de plantas de 12 hojas. Los resultados muestran la media de dos análisis de 12 plantas pertenecientes a la línea silvestre XET S y a la transgénica XET +.

El oligosacárido XSGG es el segundo más abundante, pero sus porcentajes tan solo oscilan entre el 15% en la lámina 6ª y el 5% en la lámina 9ª. Las cantidades de oligosacáridos XXGG y XSGG son similares en todas las láminas de las

hojas de las dos líneas. El oligosacárido más sencillo, XXG, disminuye su porcentaje en las tres líneas a medida que la hoja madura (7% en la 6ª lámina y no se detectó en la 9ª). El oligosacárido LSGG no fue detectado en las muestras de láminas de las hojas de las dos líneas y el XTGG, el más complejo, se cuantificó en porcentajes alrededor del 3% en la 6ª lámina que disminuyen hasta que se hacen indetectables a medida que la hoja madura.

Evaluación del crecimiento de la planta frente a estrés salino

Para evaluar la implicación de la XTH en procesos de estrés abiótico salino, se aplicaron concentraciones ascendentes de la NaCl (Control, 25, 50, 75, 100, 200 y 400 mM) y se cuantificó el crecimiento total de la planta a partir de un mes desde la siembra. Los resultados se mostraron en la **Fig. II.11** donde se puede observar el efecto inhibitorio de la sal sobre el crecimiento vegetal. En la figura puede apreciarse como, a medida que aumentó la concentración salina, se ralentizó el crecimiento de las tres líneas, después se produjo una inhibición en el mismo y finalmente tras procesos senescentes, la muerte de la planta. Las concentraciones de 25, 50 y 75 mM provocaron una inhibición similar del 50% en el crecimiento en las tres líneas, aunque no provocaron la muerte de la planta tras 60 días de tratamiento. Las concentraciones de NaCl 100 mM y de 200 mM produjeron una inhibición del 60% y 70% respectivamente y tampoco ocasionaron la muerte de la planta al finalizar el tratamiento. La máxima concentración (NaCl 400 mM) inhibió el crecimiento por completo y ocasionó la muerte de la planta en 30 días. Por lo tanto, el cultivar de tomate, variedad Money Maker, se podría englobar en los cultivos halotolerantes moderados. Si se analiza el comportamiento de las líneas, podemos apreciar una ligera tendencia a una mayor resistencia de las plantas XET + en los tratamientos entre 25 y 100 mM de NaCl. En los tratamientos con NaCl 200 y 400 mM la línea XET S se comporta como la XET +. Mientras que XET -, fue la línea que se mostró más sensible al estrés salino, como se manifiesta en los tratamientos con las concentraciones mayores (200 y 400 mM).

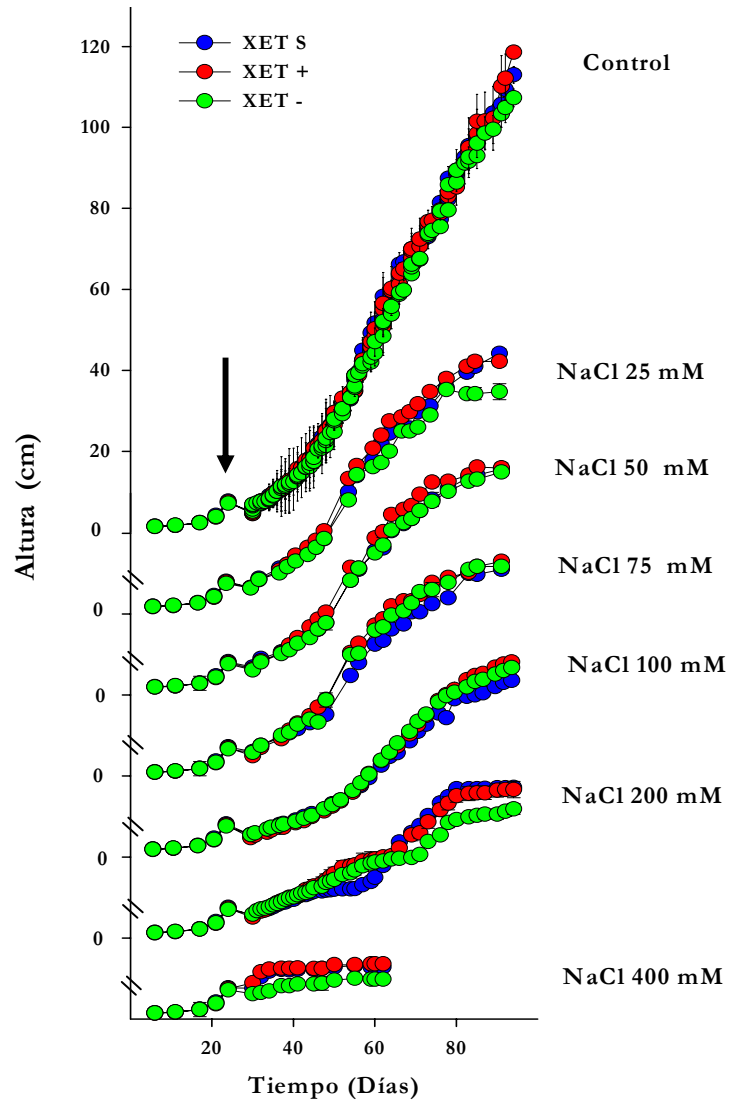


Fig. II.11 Cinética de crecimiento vegetativo en condiciones de estrés salino con NaCl. Se trataron las plantas silvestres (XET S) y las transgénicas (XET + y XET -). Las plantas fueron trasplantadas cuando tenían 30 días y tratadas con riegos de solución nutritiva y la concentración de NaCl oportuna. La flecha indica el momento de iniciarse el tratamiento. Los resultados muestran, al menos, la media \pm SE de dos análisis de 12 plantas por línea y por tratamiento. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las líneas (T-test, p valor $<$ 0,05).

DISCUSIÓN

Para el estudio de la implicación de la XET en la consecución del desarrollo primario y secundario, se valoró la expresión génica de *SXTH1* y la actividad XET en las diferentes partes de las plantas y se correlacionó con el fenotipo obtenido. Se utilizaron plantas jóvenes en crecimiento, de 12 hojas, las cuales contaban con una representación del crecimiento primario y secundario de todos los tejidos.

Los resultados de la **expresión génica de *SXTH1*** (Fig. II.6) en las plantas silvestres mostraron una asociación con las partes de la planta que contenían tejidos conductores, como son el tallo y los nervios de la hoja, que fue aproximadamente diez veces mayor, a la expresión en la lámina de la hoja y unas doce veces la expresión de la raíz. Estos resultados confirman los obtenidos en plantas de tabaco donde se estudió la localización de la expresión del gen *NXTH1* (Herbers *et al.*, 2001), muy próximo filogenéticamente a *SXTH1*, puesto que ambas especies de Solanáceas comparten un 88% de homología en la secuencia nucleotídica y un 91% en la aminoacídica. Las plantas que tienen inhibida la expresión del gen *SXTH1* mostraron una notable disminución de la expresión, fundamentalmente en tallo y nervio, asociando este gen con las zonas de tejidos conductores. Mientras, las plantas transgénicas que sobreexpresan la enzima, XET +, no mostraron diferencias de expresión con las silvestres. El hecho de que en estas plantas, XET +, no se mantenga el comportamiento de expresión registrado en plántulas, pese a que la construcción del transgén sea constitutiva, pone de manifiesto la importancia de las regulaciones transcripcionales, además de una necesidad tisular específica de acuerdo con la función a desarrollar a medida que avanza el crecimiento en la planta.

En los resultados de **actividad enzimática XET** (Fig. II.7) de la línea silvestre, no se observó una correlación cuantitativa entre la expresión y la

actividad en los tejidos estudiados. Una posible explicación es que, cuando analizamos la actividad XET, se cuantifican todas las proteínas XTH con actividad enzimática XET de la familia, mientras que el análisis de la expresión es tan sólo del gen *SXTH1*. Este hecho, también podría explicar como no se traduce el éxito de la represión de *SXTH1* en plantas XET⁻, en una disminución drástica de la actividad XET, aunque si se observan niveles inferiores de actividad enzimática soluble en raíz y nervios, e insoluble en nervios y láminas. Estos resultados de actividad XET de plantas XET⁻ coinciden con los obtenidos en los nervios de plantas de tabaco que tienen reprimido el gen *NXTH1* (Herbers *et al.*, 2001). Este hecho permite establecer comparativas entre ambos estudios, por lo que, nuestros resultados confirman la asociación de la enzima con el desarrollo de los tejidos vasculares en plantas en crecimiento. En las plantas XET⁺, la actividad XET soluble de los tejidos conductores y de la raíz, fue superior a las plantas silvestres, obteniéndose diferencias que no se observan en la expresión. Estas discrepancias pueden ser debidas, a que se ejerza un control traduccional o/y post-traduccional de los niveles de proteína, ya sea espacial, dependiente de órgano, o temporal, asociado a un momento del desarrollo concreto.

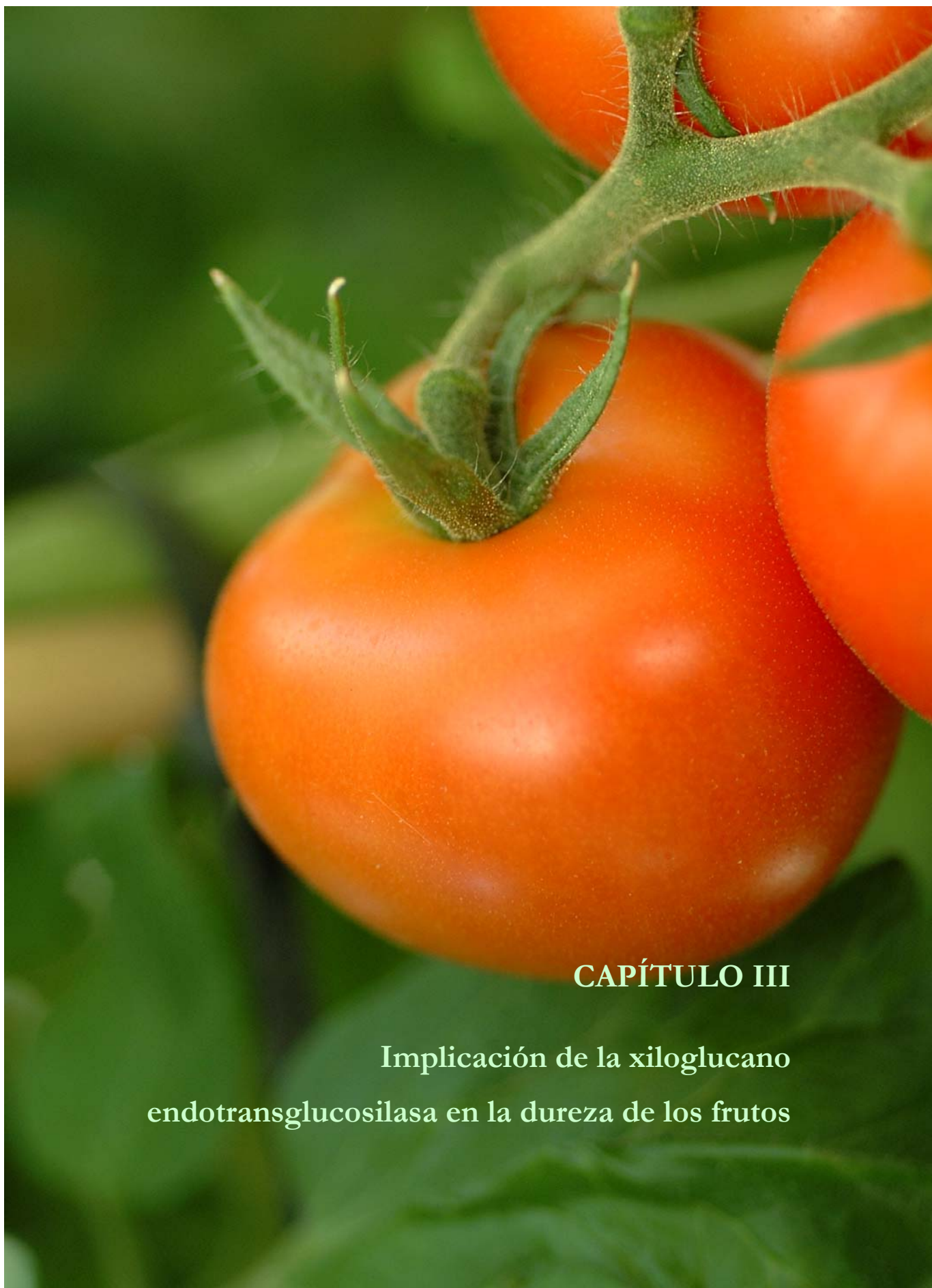
Estos resultados de expresión y actividad en las plantas silvestres y transgénicas, no reflejaron diferencias en las cinéticas de crecimiento en altura/longitud (**Fig. II.1 y II.2**). Sin embargo, es destacable la implicación que puede ejercer la isoenzima codificada por *SXTH1*, tanto en el **diámetro** del tronco de la planta (**Fig. II.3**) como en su **biomasa** (**Fig. II.4**), puesto que, en las plantas transgénicas donde la actividad fue menor, el tronco de las plantas fue más delgado y pesaron menos. Este hecho parece apuntar a una necesidad transglucosiladora de la XET que permite metabolizar el xiloglucano para permitir una diferenciación de las paredes celulares. Varios estudios han relacionado la proteína XTH con la formación y desarrollo de la estructura secundaria de los tejidos conductores y de sostén (Xu *et al.*, 1995; Antosiewicz *et al.*, 1997; Oh *et al.*, 1998; Vissenberg *et al.*, 2000 y 2001; Herbers *et al.*, 2001; Bourquin *et al.*, 2002; Matsui *et al.*, 2005). Además, la **productividad de la planta** (**Fig. II.5**) en la línea que cuenta con menor expresión de *SXTH1* fue

ligeramente superior al resto. Todos estos resultados sugieren la posibilidad de que la isoenzima codificada por *SXTH1* sea necesaria para el completo desarrollo, tanto primario como secundario, de los tejidos conductores y de sostén, mediante la diferenciación de las paredes celulares, lo que justificaría la merma de biomasa en las plantas con menor *SXTH1*.

Los resultados del análisis de los **XGOs** del xiloglucano (**Fig. II.8-10**) mediante MALDI-TOF MS, para poder comprobar si la actuación de la XET sobre los distintos tejidos de la planta, modificaba la composición del xiloglucano cualitativamente, parecen no mostrar diferencias, ni interlineales ni tisulares. Estos resultados sugieren que los niveles de actividad XET, aunque no afectan a la estructura del xiloglucano, podrían afectar a los cortes enzimáticos, modificando la incorporación y longitud de las cadenas de xiloglucano que se producen en el metabolismo característico del desarrollo de las plantas. O bien, como se muestra en el Capítulo anterior, a los tipos de enlaces que se establecen entre los componentes que se incorporan y los ya existentes previamente en la pared, como pectinas y hemicelulosas.

La influencia del **estrés salino** afecta en mayor o menor grado al crecimiento de las plantas en función del momento del desarrollo, entre otras razones, porque la composición y estructura de las paredes es distinta. Estudios previos habían mostrado como, el aumento de la expresión de un gen de la XTH en respuesta al estrés salino, provocaba modificaciones en la estructura de la pared celular (Cho *et al.*, 2006). En nuestros resultados previos, habíamos descrito que las plantas XET⁻, con una menor actividad XET, provocada por una menor expresión de *SXTH1*, tenían una biomasa inferior y presumiblemente diferencias en la estructura de la pared celular. Estas plantas XET⁻ (**Fig. II.11**), mostraron una respuesta diferencial frente al estrés salino, comparándolo con el encontrado en las plantas silvestres, ya que crecieron menos, sobre todo bajo las condiciones abióticas más adversas, aunque no se obtuvieron diferencias significativas entre las líneas. Cabe anotar que estos resultados son similares a los que encontramos en la respuesta de las plántulas al estrés salino.

A modo de resumen, podemos decir que nuestros resultados sugieren que el gen *SXTH1* podría estar implicado en la diferenciación de los haces vasculares, ya que la expresión de *SXTH1* y la actividad XET total fue notable en estos tejidos y, las plantas XET⁻, fueron más delgadas y pesaron menos.



CAPÍTULO III

Implicación de la xiloglucano
endotransglucosilasa en la dureza de los frutos

INTRODUCCIÓN

La maduración de los frutos es un proceso fisiológico programado genéticamente (Fischer y Bennett, 1991; Brummell, 2006) que suele estar acompañado de transiciones bioquímicas como síntesis y acumulación de pigmentos, degradación de otros, producción de aromas y azúcares, además de ablandamiento, inducido por cambios en la estructura de la pared celular y la lámina media, que provocan como resultado la pérdida de la integridad de los tejidos (Huber, 1983).

Durante décadas se pensó en las **pectinas** como las únicas responsables de esos cambios en firmeza, puesto que normalmente, el ablandamiento que sufren los frutos durante el proceso de maduración, se debe a la pérdida de adhesión celular por la degradación de la lámina media. Este hecho se debe a la solubilización de los polisacáridos pécticos y a la pérdida de los residuos de galactosa y arabinosa de las cadenas laterales de las pectinas (Gross y Sams, 1984; John y Dey, 1986; Redgwell *et al.*, 1997 a y 1997 b). Tanto los arabinanos como galactanos juegan un papel muy importante en la estructura y función de la pared celular, puesto que afectan a las cadenas laterales de las pectinas, modificando la rigidez/flexibilidad de la pared, además de la porosidad, regulando los cambios en firmeza y textura de los frutos (Smith *et al.*, 2002; Brummell *et al.*, 2004 a y 2004 b).

Las **enzimas** responsables del metabolismo de esta red de pectinas son la **poligalacturonasa, la pectin metil-esterasa y la pectato liasa** (Carrari y Fernie, 2006). Todas ellas provocan las modificaciones enzimáticas sobre las pectinas durante la maduración de los frutos. Pero no debemos olvidar que, a lo largo de estos procesos de crecimiento y maduración, la estructura de la pared celular está envuelta en evidentes reacciones de hidrólisis, pero también de síntesis.

Si estudiamos los procesos de hidrólisis que ocurren en la maduración, son notables los trabajos que hablan de la poligalacturonasa como máxima responsable del metabolismo de las pectinas, ya que inicialmente se había propuesto a esta enzima como la única responsable de la maduración de frutos. Sin embargo, los estudios moleculares y genéticos posteriores, con plantas transgénicas de tomate, donde se habían disminuido los niveles de poligalacturonasa hasta un 1% en frutos de tomate, mostraron que su maduración fue igual a la de los silvestres (Smith *et al.*, 1988; Giovannoni *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1990). Este hecho, confirmó la posibilidad de que la depolimerización de las pectinas quizá era insuficiente para explicar la pérdida de firmeza de los frutos a medida que avanza la maduración (Wakabayashi, 2004).

Por esa razón, actualmente está aceptada la idea de que el proceso de maduración es el resultado tanto de la desestructuración de la red de pectinas (Fischer y Bennett, 1991; Brummell, 2006) como de las **hemicelulosas** (Yakushiji *et al.*, 2001; Wakabayashi, 2004), principalmente el **xiloglucano** (Sakurai y Nevins, 1993; Brummell, 2006). Distintos trabajos muestran un cambio en la distribución de la masa molecular media de las hemicelulosas, en particular del xiloglucano, a lo largo de la maduración en tomate (Tong y Gross, 1988; Sakurai y Nevins, 1993; Maclachlan y Brandy, 1994; Brummell *et al.*, 1999; Harpster *et al.*, 2002 b), aguacate (O'Donoghue y Huber, 1992; Sakurai y Nevins, 1997), guindilla (Gross *et al.* 1986), kiwi (Redgwell *et al.*, 1991), pepino (O'Donoghue *et al.*, 1997), pimiento (Harpster *et al.*, 2002 a), melocotón (Brummell *et al.*, 2004 a), melón (McCollum *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1998) y kaki (Cutillas-Iturralde *et al.*, 1994). Se ha estudiado que a lo largo del crecimiento del fruto, se produce una elevada incorporación de polisacáridos en la pared celular, que disminuye progresivamente a medida que avanza la misma (Mitcham *et al.*, 1989 y 1991). Así, varios trabajos confirman que en la fracción hemicelulósica se observó un aumento de galactosa y una disminución de xilosa, glucosa y particularmente manosa (Greve y Labavitch, 1991). Sin embargo, durante la maduración del mango, se ha confirmado una depolimerización progresiva de pectinas y hemicelulosas, con una pérdida significativa de

galactosa, arabinosa y manosa (Yashoda *et al.*, 2005). En uva, se registró una acumulación de glucosa y una disminución de galactosa (Barnavon *et al.*, 2000). La pérdida de galactosa ha sido relacionada temporalmente con la solubilización de pectinas en melón y con un aumento de las β -galactosidasas en los estadios iniciales de la maduración en papaya (Rose *et al.*, 1998; Zainon *et al.*, 1998). Sin embargo, en tomate, no se perdió galactosa en la fracción hemicelulósica del KOH 4%, pero sí en la fracción hemicelulósica extraída con álcali concentrado, KOH 24% (Tong y Gross, 1988), además la pérdida de arabinosa fue escasa, menor del 25% (Brummell, 2006).

De modo que, las **enzimas** que están implicados en la metabolización de estos componentes adquieren una notable importancia en el proceso. Las enzimas responsables del metabolismo de esta red de hemicelulosas son la **α -L-arabinofuranosidasa**, **endo- β -(1 \rightarrow 4)-D-glucanasa**, **celulasa**, **β -D-galactosidasa** y **xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa (XTH)** (Rose y Bennett, 1999; Brummell y Harpster, 2001; Ishimaru y Kobayashi, 2002), además de las **peroxidases** (Andrews *et al.*, 2002). Todas ellas provocan las modificaciones enzimáticas que se producen en las hemicelulosas durante la maduración de los frutos.

Así, la **glucanasa** adquiere una notable importancia junto con la acción de la proteína XTH, puesto que ambas hidrolizan el mismo polisacárido hemicelulósico, el xiloglucano (Fry, 2004 b). Aunque, en los trabajos previos no se observó apenas actividad glucanasa en los estadios de crecimiento del fruto, sí se observó un aumento de la misma paralelamente con la maduración de los frutos de tomate (Campbell *et al.*, 1990; Lashbrook *et al.*, 1994), implicando al menos tres tipos diferentes de glucanasas (Maclachlan y Brady, 1992). Así, varios estudios, identificaron hasta siete miembros de la familia de las glucanasas en frutos de tomate. Sin embargo, la modificación génica que provocó la disminución de la expresión de uno de sus miembros durante la maduración, no provocó cambios en el proceso (Brummell *et al.*, 1999).

La **XTH** también se ha relacionado con el proceso de maduración de los frutos. Durante la maduración en peras, se encontró un aumento de la actividad XET

durante el crecimiento del fruto y su expresión mantenida con el transcurso de la maduración (Fonseca *et al.*, 2005). Los resultados se confirmaron en tres cultivares de peras, sugiriendo la expresión constitutiva de XTH (Hiwasa *et al.*, 2004), subrayando la importancia de la enzima en la renovación y mantenimiento de la firmeza del fruto (Campbell y Braam, 1999 a; Fonseca *et al.*, 2005). Como proponen algunos autores, la actividad XET puede desarrollar un papel de mantenimiento de la pared durante la maduración por la incorporación de nuevo material a la misma (Mitcham *et al.*, 1989; Greve y Labavitch, 1991; Brummell y Harpster, 2001). Así, la elongación celular que acompaña al crecimiento de los frutos de tomate, donde la incorporación de nuevo material y su reestructuración es tan importante, se ve acompañada del notable aumento de los niveles enzimáticos de **XET** (Arrowsmith y de Silva, 1995; Catala *et al.*, 1997 y 2000; Saladie *et al.*, 2006). Además, en un estudio realizado entre varios genes que codifican para las enzimas implicadas en la degradación de las hemicelulosas en uva, resultó que tan sólo la XTH mostró una relación directa con la maduración (Ishimaru y Kabayashi, 2002). Otro estudio muestra que la expresión de fragmentos de *SXTH1*, estuvo muy bien representada en todos los estadios del desarrollo del fruto hasta la finalización de su crecimiento (Catala *et al.*, 2000). Mientras, *SXTH5* (Grupo 2) no fue expresado durante el crecimiento del fruto, pero sí durante la maduración (Saladie *et al.*, 2006). Asimismo, se han identificado varias isoenzimas de la XTH pertenecientes al Grupo 1, implicadas en el crecimiento del fruto, como una XTH de kiwi, *AdXTH5* (cuya proteína se caracterizó con ambas actividades enzimáticas: XET y XEH) (Schroder *et al.*, 1998) y una XTH de tomate identificada en el estadio verde pequeño (de Silva *et al.*, 1994). Mientras que un cDNA de XTH de tomate, perteneciente al Grupo 2, se expresa mayoritariamente en el estadio naranja de maduración (Arrowsmith y de Silva, 1995). A la vista de estos estudios podemos intentar establecer asociaciones entre las similitudes y discrepancias de los grupos filogenéticos con el tipo de actividad XET general de cada uno de ellos.

En los Capítulos anteriores habíamos determinado la implicación de la XET en los procesos de crecimiento de las plantas, en concreto, en los procesos de

mantenimiento de la pared celular, tanto en el crecimiento primario como en el secundario de la pared celular. Teniendo en cuenta estos resultados, así como los descritos por otros autores, nos propusimos analizar la implicación de la XET durante el desarrollo y la maduración de los frutos, centrándonos en el efecto sobre la estructura de la pared y en consecuencia, sobre la dureza de los frutos, mediante el uso de frutos de plantas silvestres y transgénicas que tienen aumentada la expresión de *SXTH1*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El trabajo experimental se llevó a cabo con frutos de tomate silvestre (XET S) (*Solanum lycopersicum* L. variedad Money Maker) y frutos de dos líneas transgénicas, una con los niveles de expresión para el gen *SXTH1* sobreexpresados (XET +) y la otra con los niveles para el gen *SXTH1* inhibidos (XET -).

Las plantas fueron cultivadas en las cabinas del invernadero del SCSIE de la Universitat de València, destinadas a cultivos transgénicos, hasta la obtención de frutos.

Caracterización de los estadios de desarrollo

En la caracterización de los estadios de desarrollo, se definieron dos estadios de crecimiento del fruto, caracterizados por la medida del diámetro ecuatorial, y cuatro estadios más de maduración del fruto. La clasificación colorimétrica se hizo en base al valor de los parámetros **a** (canal del rojo) y **b** (canal del amarillo/azul) medidos con un colorímetro Minolta CR-300 (Madrid, España). También se analizó el color mediante foto digital y tratamiento con el programa

Adobe Photoshop 6.0, determinando los valores de RGB (canal rojo/verde/azul) en un histograma de 256 colores (0-255: 2^n ; $n=8$, por ser los bits, o dígitos binarios, que tiene un byte actualmente, siendo está la unidad de almacenamiento de información).

Cinética de crecimiento

Alrededor de dos meses y medio tras su siembra, y tras el cuajado de las flores, comienzan a formarse los tomates en el primer racimo. Se evaluó la cinética de crecimiento del fruto, mediante la medida del diámetro ecuatorial y la determinación del peso.

Extracción de mRNA. Síntesis de cDNA. PCR cuantitativo en tiempo real

Se realizó como se expone en el Capítulo I, teniendo en cuenta que el mRNA de frutos es más complejo de extraer al encontrarse en una matriz con elevado contenido en azúcares. Por ello, se obvió la incubación a 65 °C puesto que podría gelatinizarlos e interferir en la extracción del mRNA. El mRNA se eluyó con 20 μ l de agua miliQ.

Actividad xiloglucano endotransglucosilasa soluble

Para la **extracción de las proteínas del fruto**, se homogeneizaron 10 g de pericarpio de al menos 10 frutos de tomate con 20 ml de tampón acetato sódico 40 mM pH 5,0 que contenía CDTA 13 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, PVP 10 al 1% (p/v) y NaCl 1M con un homogenizador IKA Ultraturrax T25 (IKAWerke. Stanfen, Alemania) y se mantuvieron en agitación durante 18 horas a 4 °C. De este modo se extrajeron tanto las proteínas solubles como las unidas iónicamente a la pared. Transcurrido este periodo se centrifugaron las muestras a 15000 g durante 10 minutos. Del residuo se obtuvieron las paredes celulares enzimáticamente activas, que tras lavarse con agua dos veces y acetona

otras dos, se secaron y congelaron a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se precipitó con sulfato amónico con una saturación final del 80% (p/v), se centrifugó a 35000 g durante 15 minutos y el precipitado se disolvió en tampón acetato sódico 40 mM con el pH adecuado para los posteriores ensayos enzimáticos. Se cuantificaron las proteínas y se congelaron a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su ensayo posterior. Todo el protocolo se realizó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El ensayo de la **actividad XET soluble** se realizó siguiendo el protocolo expuesto en el Capítulo I.

Actividad β (1 \rightarrow 4)glucanasa de los estadios de desarrollo

Se cuantificó el descenso en viscosidad que provoca la enzima en un sustrato comercial o extraído. Se incubaron alícuotas de 0,3 ml de carboximetil celulosa (sal sódica, de alta viscosidad, Sigma Che. Co.) al 1,1% (p/v) en tampón acetato sódico 40 mM pH 6,0, junto con 0,2 ml de extracto de proteínas (0,5-0,6 mg ml⁻¹) en tampón acetato sódico 40 mM pH 6,0. La mezcla de reacción se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se midió su descenso de viscosidad al caer por una pipeta de 0,2 ml, a intervalos de 10 minutos, durante 1 hora. Como controles negativos se usaron extractos enzimáticos inactivados por calor a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos.

Evaluación de la firmeza de los frutos

La dureza de los frutos se midió usando un texturómetro Bishop, Model FT 327 (Effegi, Italia). Se tomaron 4 medidas equidistantes en la parte ecuatorial de cada fruto, para lo cual, se peló un área de $1,2\text{ cm}^2$ de epidermis de 1 mm de grosor. Los resultados se expresaron como el valor de la fuerza de resistencia (kg) que ofrece el pericarpo pelado a un área de $0,95\text{ cm}^2$.

Extracción de paredes celulares y fraccionamiento de los polisacáridos hemicelulósicos

Extracción de las paredes celulares

Se recogió un total de 100 g de material vegetal de al menos 10 muestras y se homogeneizó con un IKA Ultraturrax T25 (IKAWerke, Stanfen, Alemania) en metanol. Se hirvió durante 30 minutos, se lavó dos veces con metanol, dos con acetona, dos veces con metanol/cloroformo (1:1; v/v) y finalmente con éter dietílico. Se dejó secar al aire hasta peso seco constante.

Fraccionamiento de polisacáridos hemicelulósicos

Se tomaron 300 mg de paredes celulares y se eliminaron las pectinas con 30 ml de KOH al 0,5% que contenía NaBH₄ 20 mM, manteniendo la mezcla en agitación durante 24 horas en atmósfera de nitrógeno. Se centrifugó y el residuo fue re-extraído del mismo modo. El residuo resultante se mantuvo en agitación durante 24 horas en atmósfera de nitrógeno con KOH al 4% que contenía NaBH₄ 20 mM. Se centrifugó durante 10 minutos a 30000 g y el residuo se re-extrajo de nuevo. El residuo resultante se extrajo dos veces durante 24 horas con KOH al 24% que contenía NaBH₄ 20 mM, bajo atmósfera de nitrógeno. Los dos sobrenadantes se mezclaron y constituyeron la fracción KOH 24%. La fracción del KOH 24% se neutralizó con ácido acético glacial, se dializó frente a agua destilada, se concentró en rotavapor y se congeló a -25 °C hasta su análisis posterior.

Análisis de la composición de las fracciones hemicelulósicas por cromatografía de exclusión molecular

Las fracciones se analizaron por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sepharosa CL-4B (115 cm x 1,4 cm) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Se usó NaOH 1M como eluyente. Las columnas se calibraron con patrones de dextrano de 9,4, 70, 510 y 5000 kDa (Pharmacia & Sigma Che. Co.). Se cargaron 3 mg de azúcares totales de cada muestra y se eluyó con un flujo de 17,3 ml h⁻¹, recogiéndose un total de 60 fracciones de 2 ml cada una. Se cuantificaron los azúcares totales por el método de Dubois y el xiloglucano por

el de Kooiman, como se explica en el Anexo I de Metodología General, de las fracciones hemicelulósicas. Se estimó la masa molecular, haciendo uso de los patrones moleculares, mediante la siguiente fórmula (Nishitani y Masuda, 1981):

$$M = \sum(M_i \times W_i) / \sum W_i$$

Donde: **M**: masa molecular, **W_i**: contenido de azúcares de la fracción *i* y **M_i**: contenido estimado de azúcares por la curva de calibración de cada fracción *i*.

Análisis de los oligosacáridos del xiloglucano por espectroscopía de masas (MALDI-TOF MS)

Para el análisis por espectroscopía de masas se siguió el protocolo explicado en el Capítulo I.

RESULTADOS

Caracterización de los estadios de desarrollo

La caracterización de los estadios de desarrollo utilizados en los ensayos posteriores, fueron determinados mediante el tamaño del fruto y la clasificación colorimétrica (**Fig. III.1**) que nos permitió clasificar los tomates en 6 estadios.

Los dos primeros, verde pequeño (VP) y verde grande (VG), representan el **crecimiento** del fruto hasta su tamaño final. Así, el verde pequeño, midió aproximadamente 3,3 cm de diámetro ecuatorial y alcanzó su tamaño final a partir del estadio verde grande, que midió unos 5,5 cm. Los otros cuatro estadios representan la **maduración** del fruto, de modo que su tamaño no varía, pero la coloración de los frutos vira de verde a rojo. Así, según la clasificación mediante el colorímetro Minolta, los frutos Pintón Verde (PV)

tienen valores del canal del rojo negativos, entre -10 y -1. Los frutos pintón (P) registraron valores de *a* que oscilaron entre 1 y 5. Los frutos naranja (N) mostraron valores de entre 5 y 16, y los maduros (M) lo hicieron entre 16 y 22. Si atendemos a la clasificación en base al histograma, se observa cómo los valores del canal rojo aumentan progresiva y paralelamente a como caen los del canal verde, que prácticamente desaparece en los frutos maduros. El color azul, también desaparece a lo largo de la maduración.



A)	VP y VG	PV	P	N	M
a	-14 » -10	-10 » -1	1 » 5	5 » 16	16 » 22
b				> 14	< 12
B)	VP y VG	PV	P	N	M
R	190	200	220	235	250
G	230	200	170	125	45
B	80	60	40	20	0

Fig. III.1 Caracterización de los frutos silvestres (XET S) y transgénicos (XET + y XET -) en los distintos estadios de crecimiento y maduración. **A)** Indica el valor de *a* (canal del rojo) y *b* (canal del amarillo/azul) correspondiente a cada estadio medido con un colorímetro Minolta CR-300. **B)** Indica el valor de RGB (canal rojo, canal verde y canal azul) medido con el programa Adobe Photoshop 6.0. **VP:** Verde Pequeño, **VG:** Verde Grande, **PV:** Pintón Verde, **P:** Pintón, **N:** Naranja, **M:** Maduro.

No se observaron diferencias colorimétricas ni morfológicas entre la línea silvestre y las transgénicas a lo largo del desarrollo del fruto (resultados no mostrados).

Cinética de crecimiento del fruto

En la cinética de crecimiento de los frutos se cuantificó la evolución de los frutos desde el cuajado de la flor hasta su completo desarrollo y maduración.

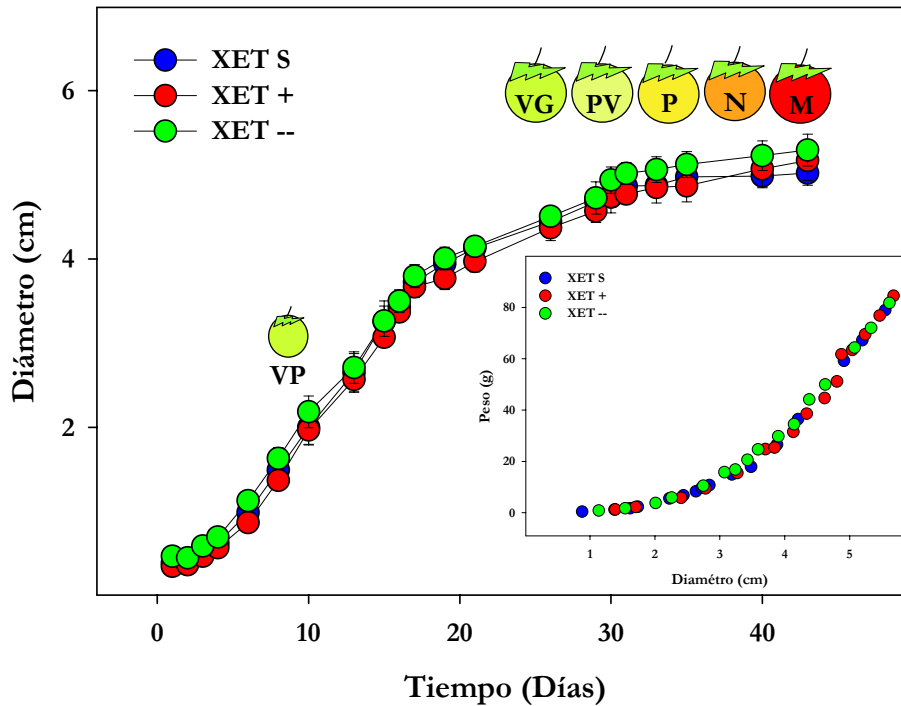


Fig. III.2 Cinética de crecimiento y maduración de los frutos silvestres (XET S) y transgénicos (XET + y XET -). Los valores mostrados son la media \pm SE de cosechas independientes entre los años 2003-2006. En la parte inferior derecha, se muestra la relación entre el diámetro del fruto y su peso. **VP**: Verde Pequeño, **VG**: Verde Grande, **PV**: Pintón Verde, **P**: Pintón, **N**: Naranja, **M**: Maduro.

En la **Fig. III.2** se muestra el crecimiento en tamaño de los frutos y su evolución colorimétrica durante la maduración. Podemos ver que el crecimiento, expresado mediante la medida del diámetro ecuatorial máximo, describe una cinética sigmoide. Se observa un crecimiento lento en los 5 primeros días que se acelera exponencialmente hasta el vigésimo día, tanto en la línea silvestre como en las transgénicas. A partir de este momento, la velocidad

de crecimiento disminuye, alcanzando el diámetro máximo aproximadamente a los 30 días desde el inicio de su formación. Llegado a este punto, los frutos de las tres líneas cesan en su crecimiento y comienza la maduración colorimétrica que alcanza el estado de maduro alrededor de los 45 - 50 días. La cinética de crecimiento de los frutos no muestra diferencias significativas entre la línea silvestre y las líneas transgénicas.

En la parte inferior derecha de la **Fig. III.2** se muestra la relación entre el diámetro del fruto y su peso. El peso de los frutos aumenta progresivamente con el diámetro hasta el tamaño final que se alcanza antes de comenzar la maduración colorimétrica. De modo que los frutos maduros cuentan con un diámetro ecuatorial máximo medio de 5,5 cm y un peso medio de 78 g, en las tres líneas estudiadas, puesto que todas ellas muestran una relación peso/diámetro similar.

Estudio de la expresión de la *SXTH1* mediante PCR cuantitativo en tiempo real de los frutos

En la **Fig. III.3** se muestra la expresión cuantitativa del gen *SXTH1*. En la **Fig. III.3 A** se representó el nivel de expresión del gen en la línea silvestre y en las dos transgénicas, a lo largo de los estadios de desarrollo. Como se aprecia en la gráfica, la línea XET S muestra una expresión menor que la línea XET + en todos los estadios del desarrollo, mientras que si comparamos XET S con la XET -, la línea silvestre presenta una expresión del gen *SXTH1* mayor durante el desarrollo, aunque las diferencias son menores en este último caso. Si estudiamos el comportamiento cuantitativo de las tres líneas, podemos observar que los valores aumentan del estadio verde pequeño al verde grande, donde son máximos, para ir descendiendo progresivamente hasta el estado maduro en ambas líneas.

En la **Fig. III.3 B** se representa la expresión relativa del gen *SXTH1* de las plantas XET + y XET - frente a la expresión de las plantas XET S a lo largo de los estadios del desarrollo.

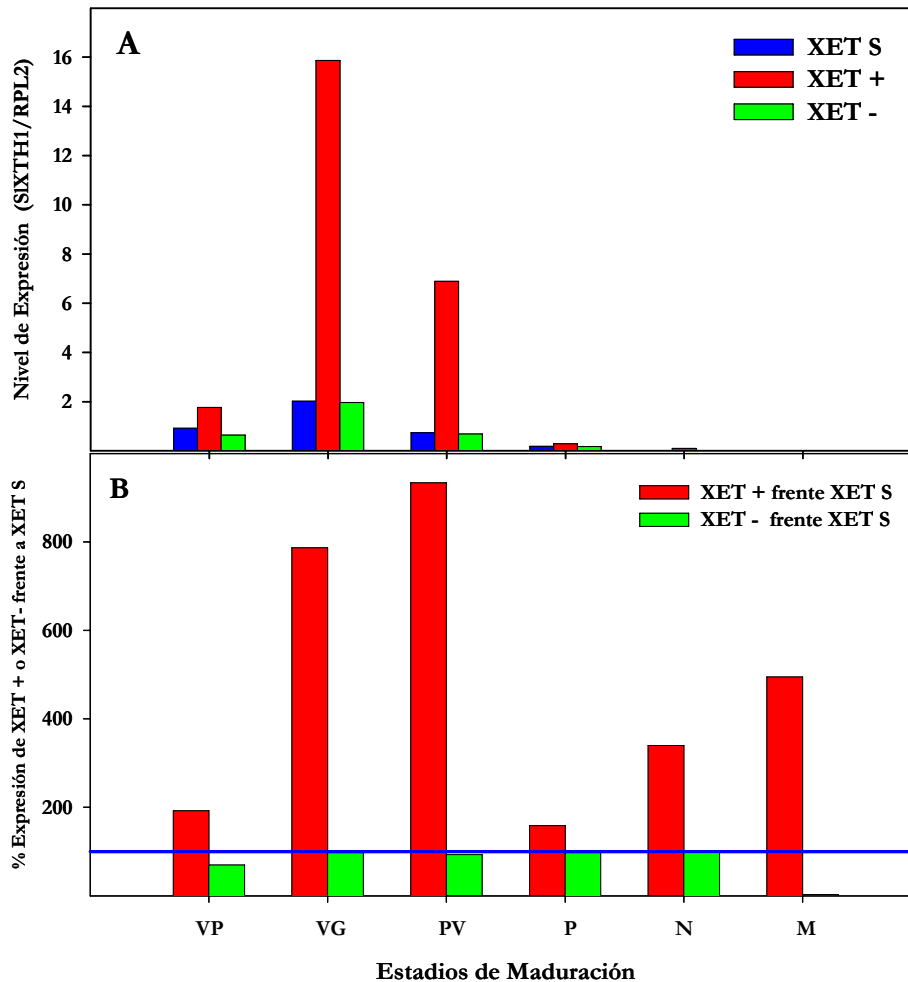


Fig. III.3 Expresión del gen *SIXTH1* de los frutos silvestres (XET S) y transgénicos (XET + y XET -) a lo largo de los estadios de crecimiento y maduración, medido mediante PCR cuantitativo en tiempo real (7000 ABI Prism; Applied Biosystem), usando *PowerSYBR® Green* como fluorocromo. **A)** Niveles de expresión cuantitativos del gen *SIXTH1* en las tres líneas estudiadas. **B)** Nivel de expresión relativo del gen *SIXTH1* de XET + frente a XET S y nivel de expresión relativo del gen *SIXTH1* de XET - frente a XET S. La línea horizontal azul indica el 100% de la expresión de XET S. Los valores mostrados son la media \pm SE de 2 experimentos independientes, usando material homogenizado de pericarpo de 10 frutos en cada experimento. **VP:** Verde Pequeño, **VG:** Verde Grande, **PV:** Pintón Verde, **P:** Pintón, **N:** Naranja, **M:** Maduro.

Puede observarse cómo los niveles relativos de expresión en los frutos XET + frente a XET S aumentan con el crecimiento del fruto hasta alcanzar los valores máximos en los estadios de verde grande y Pintón Verde. Posteriormente se produce una caída relativa de la expresión en los frutos pintón, para aumentar a continuación en los estadios de naranja y maduro. Mientras que los niveles relativos de expresión en los frutos XET – frente a XET S, no registraron diferencias asociadas al crecimiento o maduración de los frutos, mostrando una expresión análoga a los frutos silvestres, a excepción del estadio maduro, donde la expresión de XET – fue muy inferior al silvestre.

Cuantificación de la actividad xiloglucano endotransglucosilasa soluble

Al analizar la actividad XET soluble en los estadios de crecimiento y maduración de frutos se obtuvieron los resultados que se muestran en la **Fig. III.4**. Si analizamos el comportamiento en cada uno de los estadios, se observó que la actividad de la línea XET + fue mayor (una media de $3,80 \pm 0,30$ veces) a la silvestre en todos los estadios estudiados. Mientras que la línea XET –, registró una actividad XET que fue inferior (una media de $2,34 \pm 0,68$ veces) a la línea silvestre. Asimismo, podemos apreciar que a medida que avanza el crecimiento y maduración de los frutos, la actividad XET disminuye de modo diferente entre las tres líneas, puesto que mientras que en la línea silvestre desciende un 57,09%, en la XET + sólo lo hace un 33,76% y en la XET – un 33,33%. La evolución de esta disminución se puede ajustar a tres rectas (datos no mostrados). Así, la pendiente de la recta de la línea XET + fue superior a la línea silvestre (-0,4225 frente a -0,2858), mientras que la pendiente de la línea XET – fue inferior a la línea XET S (-0,1888 frente a -0,2858).

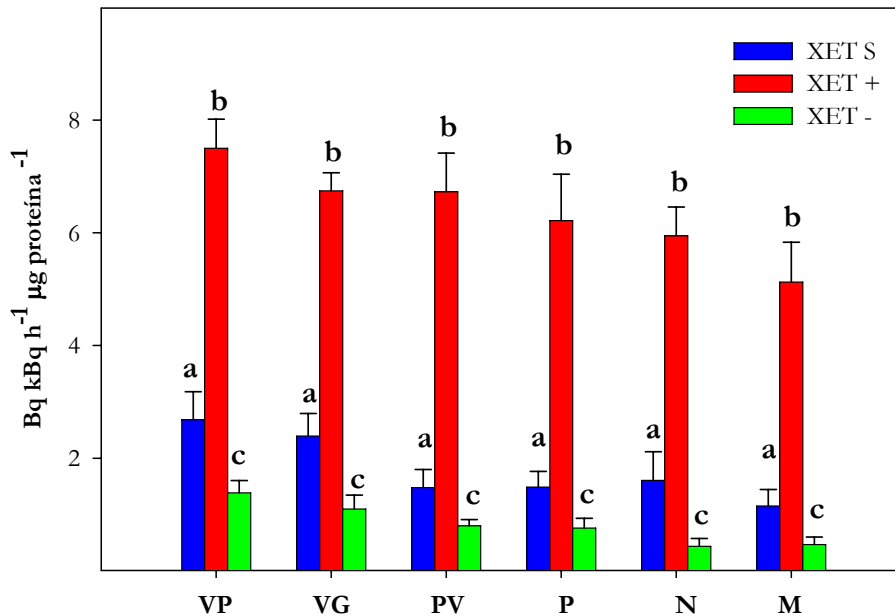


Fig. III.4 Actividad XET soluble de frutos silvestres (XET S) y transgénicos (XET + y XET -) en los sucesivos estadios de crecimiento y maduración. Los valores mostrados son la media \pm SE de 5 experimentos independientes, usando proteína de pericarpio de 10 frutos en cada experimento. **VP:** Verde Pequeño, **VG:** Verde Grande, **PV:** Pintón Verde, **P:** Pintón, **N:** Naranja, **M:** Maduro. Distintas letras indican diferencias significativas entre las líneas (T-test, p-valor < 0,05).

Análisis de la actividad β (1 \rightarrow 4) glucanasa en frutos

En la **Fig. III.5** se muestra la evolución de la actividad glucanasa a lo largo del crecimiento y maduración de los frutos.

A medida que la maduración avanza la actividad glucanasa aumenta, oscilando entre valores de 90-80% en los estadios verde pequeño y verde grande, y disminuyendo hasta valores del 60% de caída lineal de la viscosidad en el estadio maduro. En los estadios iniciales del crecimiento y maduración, verde pequeño, verde grande y Pintón Verde, la actividad glucanasa fue ligeramente superior en los frutos de la línea silvestre que la transgénica. Sin embargo, en los estadios pintón, naranja y maduro, la actividad XET se igualó entre ambas líneas, describiendo un comportamiento similar.

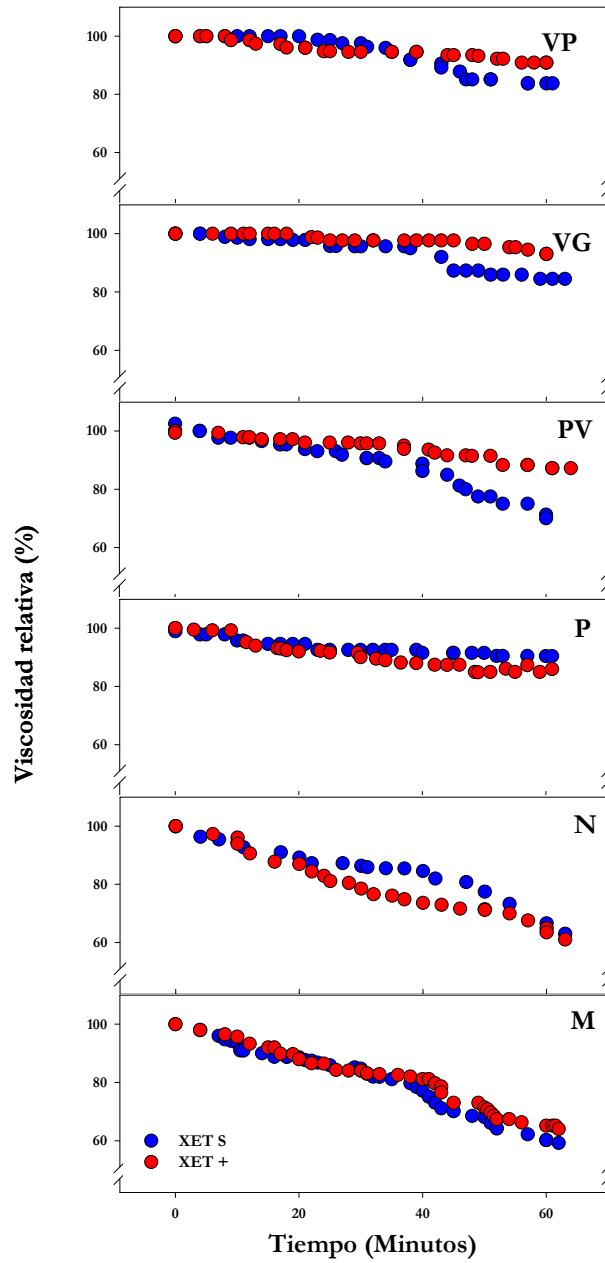


Fig. III.5 Actividad glucanasa de los frutos silvestres (XET S) y transgénicos (XET +) en los sucesivos estadios del desarrollo. Los valores mostrados son la media \pm SE de al menos 3 experimentos independientes, usando 120 μ g proteína extraída del pericarpo de 10 frutos en cada experimento. **VP:** Verde Pequeño, **VG:** Verde Grande, **PV:** Pintón Verde, **P:** Pintón, **N:** Naranja, **M:** Maduro.

Análisis de la dureza de los frutos

Los resultados de la dureza de los estadios de desarrollo de los frutos silvestres, XET S, y de la línea transgénica, XET +, se presentaron en la **Fig. III.6**, donde se puede observar cómo se reduce ligeramente la firmeza en los estadios de crecimiento, mientras que disminuye notablemente a medida que avanza la maduración, reduciéndose en unas 5 veces. La dureza de los frutos XET + fue superior significativamente a los frutos XET S a lo largo de toda la maduración, describiendo una recta asociada a la disminución de la dureza superior a la que describe la línea XET S y con la misma pendiente, como se muestra en la parte superior derecha de la figura.

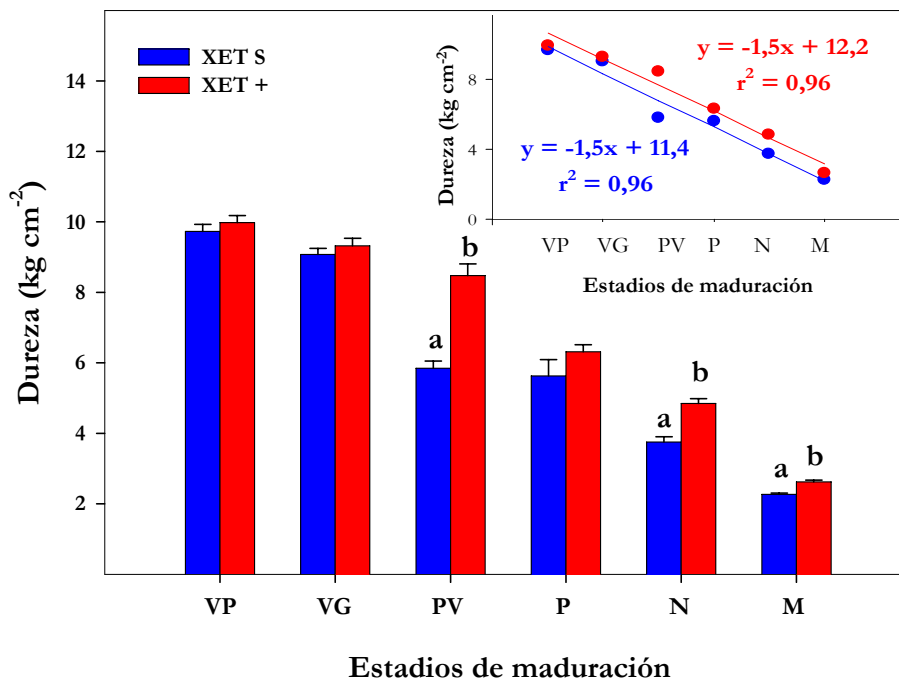


Fig. III.6 Análisis de la dureza de los frutos silvestres (XET S) y transgénicos (XET +) en los sucesivos estadios de desarrollo. Se tomaron 4 medidas equidistantes en la parte ecuatorial de cada fruto. Los valores muestran la media \pm SE del valor de la fuerza de resistencia (kg) que ofrece el pericarpio pelado por unidad de área de más de 150 frutos muestreados. En la parte superior derecha, se muestran las rectas que describen la pérdida de dureza de los frutos. Distintas letras indican diferencias significativas entre líneas (T-test, p-valor < 0,05). **VP**: Verde Pequeño, **VG**: Verde Grande, **PV**: Pintón Verde, **P**: Pintón, **N**: Naranja, **M**: Maduro.

El análisis estadístico del T-test mostró diferencias significativas entre las líneas en los estadios de maduración organoléptica Pintón Verde, naranja y maduro, sin encontrarse diferencias en los estadios de crecimiento del tomate.

Se realizó un análisis bayesiano (**Fig. III.7**) comparando todos los datos en conjunto de la dureza de los estadios del desarrollo de los frutos entre ambas líneas. Los resultados del análisis bayesiano en conjunto, desprenden una probabilidad de 0,91 de que las dos poblaciones son diferentes, lo que corrobora que los frutos de la línea XET + son más duros que los de la línea silvestre.

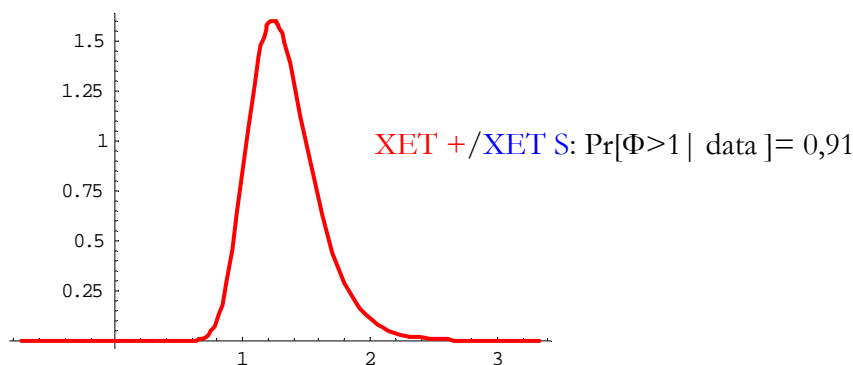


Fig. III.7 Análisis bayesiano de la firmeza a lo largo de los estadios de desarrollo de los frutos silvestres (XET S) y transgénicos (XET +). La gráfica muestra la distribución de los valores de frutos transgénicos frente a silvestres y el dato de probabilidad. Para este análisis se utilizaron, al menos, 600 datos de dureza de ambas líneas.

Análisis de la composición de la pared celular del fruto

Composición de la pared celular de los frutos de tomate silvestres y transgénicos

En primer lugar estudiamos la composición en azúcares totales y xiloglucano en las fracciones de hemicelulósicas del KOH 4 y 24%, como se muestra en la **Tabla III.1**.

Tabla III.1 Contenido de azúcares totales y xiloglucano (% peso seco) de las fracciones KOH 4 y 24% obtenidas de los estadios de maduración de frutos de tomate silvestres y transgénicos. Los valores muestran la media \pm SE de tres experimentos independientes, usando 20 frutos para cada experimento. **VP:** Verde Pequeño, **VG:** Verde Grande, **PV:** Pintón Verde, **P:** Pintón, **N:** Naranja, **M:** Maduro.

Fracción KOH 4% % peso seco		Estadios de Maduración					
		VP	VG	PV	P	N	M
Azúcares Totales	XET S	14,15 \pm 4,09	12,56 \pm 5,86	5,05 \pm 0,31	4,52 \pm 0,80	4,57 \pm 0,86	4,70 \pm 1,00
	XET +	14,51 \pm 6,26	9,87 \pm 3,62	8,74 \pm 1,99	4,98 \pm 0,54	6,64 \pm 0,70	5,28 \pm 1,40
Xiloglucano	XET S	2,17 \pm 0,71	3,57 \pm 1,63	1,19 \pm 0,26	1,20 \pm 0,32	1,23 \pm 0,40	1,13 \pm 0,40
	XET +	2,77 \pm 1,59	3,32 \pm 1,32	1,43 \pm 0,19	1,22 \pm 0,31	1,68 \pm 0,37	1,31 \pm 0,45

Fracción KOH 24% % peso seco		Estadios de Maduración					
		VP	VG	PV	P	N	M
Azúcares Totales	XET S	6,73 \pm 2,63	6,49 \pm 2,31	6,37 \pm 1,52	6,25 \pm 1,49	6,19 \pm 1,25	5,33 \pm 1,04
	XET +	5,39 \pm 0,97	7,67 \pm 3,82	5,87 \pm 1,71	7,35 \pm 1,78	5,20 \pm 1,00	5,20 \pm 1,80
Xiloglucano	XET S	2,43 \pm 0,81	2,58 \pm 0,81	2,52 \pm 0,82	2,21 \pm 0,73	2,53 \pm 0,68	2,43 \pm 0,69
	XET +	2,27 \pm 0,22	2,77 \pm 1,12	2,07 \pm 0,69	2,19 \pm 0,46	2,55 \pm 0,72	2,31 \pm 0,80

En la fracción hemicelulósica del KOH 4% se observa cómo disminuyen los azúcares totales y el xiloglucano en ambas líneas a lo largo de la maduración de los frutos, siendo ligeramente superiores en la línea XET +. La proporción de xiloglucano en esta fracción fue aproximadamente del 20% en todos los estadios. En la fracción hemicelulósica del KOH 24% se observaron escasos descensos de las cantidades de azúcares y xiloglucano a lo largo de la maduración, siendo similares en ambas líneas. Sin embargo, la proporción de xiloglucano frente al total de los azúcares en esta fracción fue del 45% en todos

los estadios. Por esta razón se continuó con el estudio exhaustivo de la fracción hemicelulósica extraída con KOH al 24%.

Perfiles de elución de azúcares totales y xiloglucano de la fracción KOH 24% de los frutos de tomate silvestres y transgénicos

En la **Fig. III.8** se presentan los perfiles de elución de los azúcares totales de la fracción KOH 24%, en los distintos estadios de desarrollo del fruto. Puede apreciarse que los perfiles de azúcares totales describen tres picos en el cromatograma, donde se registraron las diferencias más notables entre las líneas estudiadas. Así, el primer pico, correspondiente al volumen vacío (V_0), fue mucho mayor en la línea XET + que en la silvestre en todos los estadios, y va disminuyendo hasta su desaparición en el estadio maduro.

El segundo pico se localiza alrededor de la fracción $\approx n^\circ 47$, y en el caso de la línea XET S, se va desplazando hacia zonas del cromatograma con menor masa molecular a medida que avanza la maduración, de forma notable en los estadios naranja y maduro. Mientras, en la línea XET +, se mantiene en los cromatogramas que definen los estadios de maduración sucesivos. El tercer pico del cromatograma de elución, (fracción $\approx n^\circ 63$) aumenta progresivamente con la maduración y se desplaza hacia zonas del cromatograma con menor masa molecular a medida que se avanza en la misma, hecho que se refleja notablemente en la línea silvestre. De forma global, el cromatograma de elución descrito por la línea XET + está ligeramente retrasado hacia zonas del cromatograma de mayor masa molecular en comparación con el que describe la línea XET S. Esta diferencia se observa en los estadios verde pequeño, verde grande, Pintón Verde y pintón, acentuándose en los estadios naranja y maduro, de modo que los azúcares totales de la línea XET +, registraron una masa molecular mayor a la largo de la maduración.

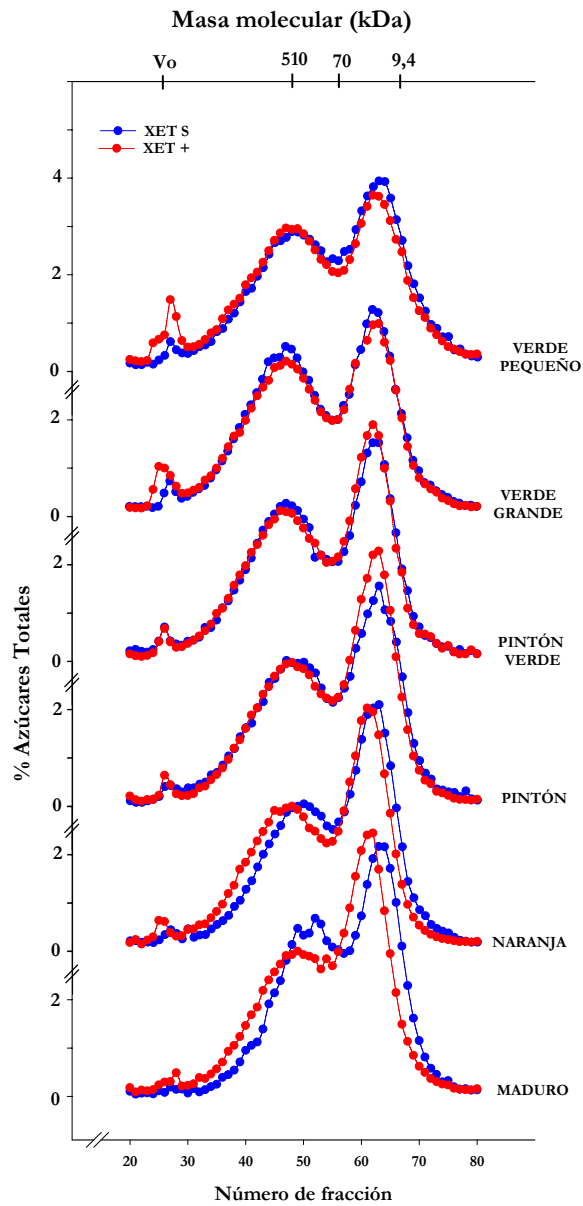


Fig. III.8 Evolución del cromatograma de elución de azúcares totales de los frutos silvestres (XET S; ●) y transgénicos (XET +; ●) a lo largo del crecimiento y maduración de los frutos. Tras la obtención de la fracción KOH 24%, se llevó a cabo la separación de las hemicelulosas mediante cromatografía de exclusión molecular en Sepharosa CL-4B, usando NaOH 1M como eluyente. En este análisis se cuantificaron los azúcares totales de fracciones de 2 ml entre la 20 y la 80. Para el calibrado de la columna se utilizó azul de dextrano como volumen vacío y los marcadores de tamaño molecular de dextrano de 510 kDa, 70 kDa y 9,4 kDa (Sigma Che. Co.). Los valores mostrados son la media de 3 fraccionamientos pertenecientes a 3 cosechas independientes entre los años 2003-2006.

En la **Fig. III.9**, se presentan los cromatogramas de elución del xiloglucano a lo largo del desarrollo de los frutos silvestres y transgénicos. Los cromatogramas describieron tres picos, siendo el localizado en la fracción $\approx n^{\circ}$ 47 el mayoritario. El primero de ellos se corresponde con el V_0 , situado aproximadamente en la fracción $\approx n^{\circ}$ 27, siendo este pico del cromatograma superior en la línea XET +. El segundo pico del cromatograma fue similar en ambas líneas en los estadios de verde pequeño, verde grande, Pintón Verde y pintón. Mientras que en los estadios de maduración, naranja y maduro el pico del cromatograma perteneciente a los frutos XET + registró un retraso hacia zonas con mayor masa molecular. El tercer pico del cromatograma (fracción $\approx n^{\circ}$ 62) va disminuyendo hasta casi desaparecer en los frutos maduros. En general, el perfil de elución del xiloglucano de la línea XET S estuvo más adelantado hacia zonas del cromatograma con menor masa molecular, mientras que el cromatograma que describe la línea XET +, marcadamente en los estadios naranja y maduro, se retrasó a zonas de mayor masa molecular.

Si comparamos los perfiles de elución de azúcares totales y xiloglucano, podemos observar que el primer pico del cromatograma de azúcares (fracción $\approx n^{\circ}$ 47) coincide con el que se muestra en los perfiles de elución del xiloglucano. A su vez, el segundo pico del cromatograma de ambos análisis (fracción $\approx n^{\circ}$ 62), también coincide, mostrando la relación entre ambos sustratos.

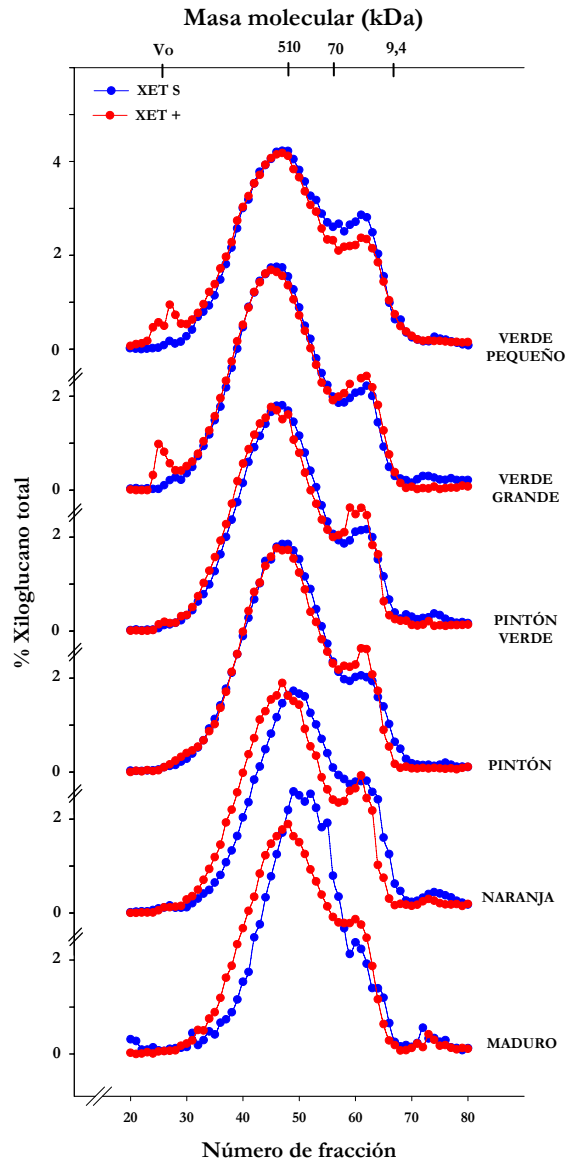


Fig. III.9 Evolución del cromatograma de elución de xiloglucano de los frutos silvestres (XET S; ●) y transgénicos (XET +; ●) a lo largo del crecimiento y maduración de los frutos. Tras la obtención de la fracción KOH 24%, se llevó a cabo la separación de las hemicelulosas mediante cromatografía de exclusión molecular en Sepharosa CL-4B, usando NaOH 1M como eluyente. En el análisis se cuantificó el xiloglucano de fracciones de 2 ml entre la 20 y la 80. Para el calibrado de la columna se utilizó azul de dextrano como volumen vacío y los marcadores de tamaño molecular de dextrano de 510 kDa, 70 kDa y 9,4 kDa (Sigma Che. Co.). Los valores mostrados son la media de 3 fraccionamientos pertenecientes a 3 cosechas independientes entre los años 2003-2006.

Análisis de la masa molecular media de la fracción KOH 24% de los frutos de tomate silvestres y transgénicos

A las fracciones hemicelulósicas fraccionadas mediante cromatografía de exclusión molecular de la fracción KOH 24%, les fue analizada la masa molecular media de los azúcares totales y el xiloglucano, mediante la ecuación propuesta por Nishitani y Masuda, 1981. Los datos obtenidos se muestran en la **Tabla III.2.**

Tabla III. 2 Masas moleculares de los polisacáridos que componen la fracción KOH 24% de la pared celular de frutos silvestres (XET S) y transgénicos (XET +) en los sucesivos estadios de desarrollo. AT: azúcares totales; XG: xiloglucano. Los valores muestran la masa molecular media (kDa) \pm SE de tres experimentos independientes, usando 20 frutos para cada experimento. **VP:** Verde Pequeño, **VG:** Verde Grande, **PV:** Pintón Verde, **P:** Pintón, **N:** Naranja, **M:** Maduro.

FRACCIÓN KOH 24%		ESTADÍOS DE MADURACIÓN					
		VP	VG	PV	P	N	M
Masa molecular AT (kDa)	XET S	818,9 \pm 225,2	1075,4 \pm 107,1	1100,4 \pm 85,0	948,8 \pm 139,8	779,5 \pm 129,0	562,8 \pm 5,0
	XET +	1171,7 \pm 164,8	1238,2 \pm 120,9	1028,9 \pm 141,1	840,9 \pm 84,2	1007,9 \pm 137,8	776,8 \pm 77,4
Masa molecular XG (kDa)	XET S	1074,7 \pm 314,2	1497,2 \pm 46,2	1441,6 \pm 140,4	1242,2 \pm 127,7	938,3 \pm 112,1	843,4 \pm 112,1
	XET +	1505,0 \pm 268,1	1595,7 \pm 135,2	1479,9 \pm 148,6	1271,8 \pm 69,7	1216,7 \pm 117,3	1108,6 \pm 81,2

Al calcular el valor de la masa molecular de los azúcares totales y del xiloglucano, en la fracción KOH 24%, se observa cómo ambos valores disminuyen notablemente a medida que avanza la maduración en los frutos de ambas líneas. Si nos fijamos en los azúcares totales, ambas líneas experimentaron un aumento de la masa molecular entre los frutos verde

pequeño y verde grande, siendo superiores los valores de masa molecular en la línea XET +. A partir de este momento, la línea silvestre, XET S, registró unos valores menores en todos los estadios (a excepción del Pintón Verde), que descendieron un 47,6% en el caso de los frutos XET S y un 37,2% en los frutos XET + hasta el estadio maduro. Si analizamos lo que le sucede a la masa molecular del xiloglucano, describe un comportamiento similar. Los valores de los frutos XET S fueron inferiores a los XET + en todos los estadios estudiados. La línea silvestre registró un aumento destacable entre el estadio verde pequeño y verde grande mientras que la transgénica apenas subió ligeramente, manteniendo los valores altos en ambos estadios. Los valores registraron una caída del 43,6% en la línea XET S y un 30,5% en la XET +.

De forma global, tanto en la masa molecular de azúcares totales como en el de xiloglucano, las diferencias más notables se producen, por un lado, en el crecimiento, donde aumenta la masa molecular, y por otro, al final de la maduración (estadios naranja y maduro), en la que hay disminución del mismo, siendo menor esta disminución en los frutos de las plantas transgénicas.

Análisis cualitativo del xiloglucano de frutos por espectroscopía de masas

Los oligosacáridos del xiloglucano de los frutos de las líneas silvestre y transgénica, fueron analizados mediante espectroscopía de masas. Los resultados obtenidos pueden verse en la **Fig. III.10**. A medida que avanzó la maduración de los frutos, se observó una tendencia general de ambas líneas a reducir la cantidad de XXGG y aumentar la de XSGG, acompañado del incremento de los oligosacáridos complejos como LSGG y XTGG.

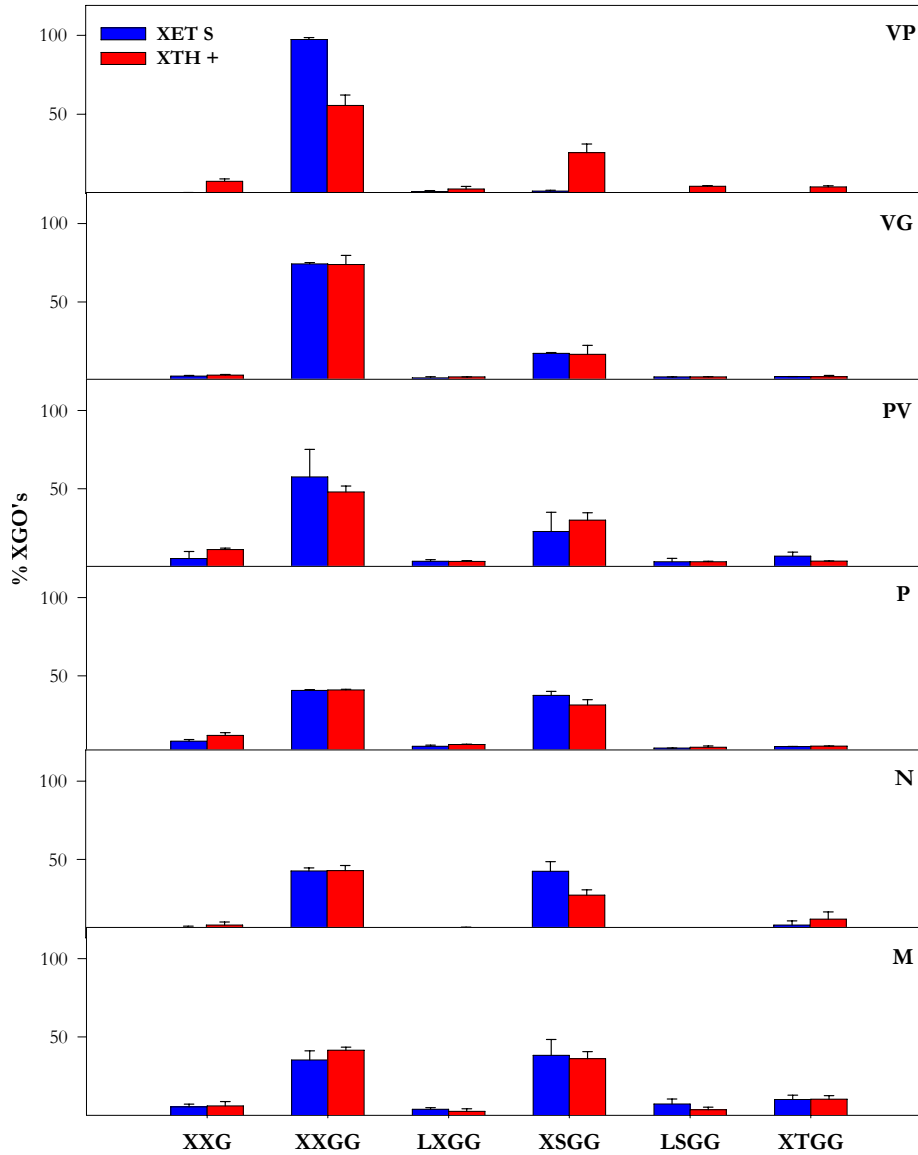


Fig. III.10 Estructura cualitativa del xiloglucano de la pared celular por espectroscopía de masas MALDI-TOF MS de los estadios de desarrollo de frutos silvestres (XET S) y transgénicos (XET +). En la gráfica se muestran los porcentajes relativos de los oligosacáridos del xiloglucano identificados mediante el valor m/z. Los resultados que se representan son la media \pm SE de tres experimentos independientes. Las paredes celulares usadas para el análisis provienen de, al menos, 20 frutos pertenecientes a cosechas anuales entre 2002-2005. **VP:** Verde Pequeño, **VG:** Verde Grande, **PV:** Pintón Verde, **P:** Pintón, **N:** Naranja, **M:** Maduro.

En el estadio verde pequeño, la línea silvestre registró un porcentaje muy elevado de XXGG, siendo el resto de los oligosacáridos casi inexistentes, mientras que en la línea XET+, XXGG rondó el porcentajes del 58% y un 22% de XSGG. Además, se contabilizaron porcentajes de entre 5 y 10% en XXG, LXGG, LSGG y XTGG. En el estadio verde grande, ambas líneas se comportaron similarmente, cuantificándose porcentajes de 75% de XXGG y del 18% en XSGG. El resto de los oligosacáridos se detectaron pero sus porcentajes fueron de alrededor de un 2%. En los estadios Pintón Verde, pintón, naranja y maduro disminuyeron los porcentajes de XXGG y XSGG, para un aumento del resto de los oligosacáridos. Se registró un aumento en XXG y LXGG en los estadios Pintón Verde y pintón, descendiendo después en naranja y maduro. Sin embargo, LSGG y XTGG aumentaron paralelamente a la maduración de los frutos. En general, no se encontraron diferencias entre los oligosacáridos del xiloglucano de los frutos de las dos líneas estudiadas.

DISCUSIÓN

En este capítulo investigamos la implicación de la actividad enzimática XET en la maduración de los frutos, haciendo uso de plantas silvestres de tomate y de dos líneas transgénicas, una que tiene valores elevados del gen *SXTH1* y otra que los tiene reducidos. Se caracterizaron seis estadios de desarrollo de los frutos a utilizar en el resto del Capítulo, definiendo dos estadios de crecimiento y cuatro de maduración organoléptica, atendiendo tanto a los parámetros de tamaño como de color (**Fig. III. 1**).

Al analizar los **niveles de expresión de *SXTH1*** en los frutos silvestres (**Fig. III.3**), se observó que estos aumentaron paralelamente con el crecimiento del fruto y disminuyeron progresivamente con la maduración, de modo que corroboran los resultados obtenidos previamente por otros autores (Catala *et al.*, 2000; Saladie *et al.*, 2006). A su vez, los resultados de la expresión génica de

SXTH1 de los frutos transgénicos que sobre-expresan la enzima, se correspondieron con la modificación génica realizada. Es muy destacable el hecho de que estos son los primeros frutos transgénicos donde, mediante un promotor constitutivo que sobre-expresa el gen *SXTH1*, se obtiene un incremento de la expresión de este gen de la XTH. Recordemos que tanto en el Capítulo I de plántulas como en el Capítulo II de planta, la expresión de *SXTH1* en la línea que sobre-expresa es superior a la silvestre, pero no de modo tan notable a como ocurre en frutos. Sin embargo, en la línea que tenía reducidos los niveles de expresión de *SXTH1*, no se observó una reducción proporcional, obteniéndose unos niveles muy similares a las plantas silvestres (**Fig. III.3**). En las líneas transgénicas, la expresión de la *SXTH1* esta controlada por un promotor constitutivo, por lo que las diferencias encontradas, nos sugieren de nuevo una posible regulación transcripcional diferencial del gen *SXTH1* espacial y temporal, es decir, en las diferentes partes u órganos de la planta a lo largo de su crecimiento y durante el desarrollo de los frutos.

Los niveles de **actividad enzimática XET** (**Fig. III.4**) de las plantas silvestres mostraron una relación inversamente proporcional con el avance del desarrollo de los frutos, subrayando los elevados niveles de actividad que se registraron en los dos estadios de crecimiento, lo que sucede análogamente en las tres líneas. En los frutos que sobre-expresan el gen, se obtuvo una elevada actividad (375% mayor que la existente en las plantas silvestres) mientras que los frutos que tienen inhibida la expresión del gen mostraron una disminución de la actividad menos acusada pero considerable (45% como media respecto a las silvestres). Estos resultados discrepan del comportamiento de actividad XET registrada en las plántulas y las plantas, lo que de nuevo sugiere una posible regulación traduccional de la enzima, tanto a nivel tisular como temporal.

En otros estudios donde se analizaron las enzimas que metabolizan la pared celular durante la maduración en peras, se observó un aumento de la actividad XET durante el crecimiento del fruto y su expresión mantenida con el transcurso de la maduración (Fonseca *et al.*, 2005). Los resultados se

confirmaron en tres cultivares de peras, sugiriendo la expresión constitutiva de XTH (Hiwasa *et al.*, 2004), subrayando la importancia de la enzima en la renovación y mantenimiento de la firmeza del fruto (Campbell y Braam, 1999 a; Fonseca *et al.*, 2005). Asimismo, otro análisis de frutos de tomate mostró una ligera disminución de la actividad XET con el avance de la maduración (Eriksson *et al.*, 2004). Sin embargo, otros autores contradicen estos resultados, mostrando un incremento de la actividad XET y la acumulación de su mRNA, y su correlación con el ablandamiento del fruto de tomate (Arrowsmith y de Silva, 1995).

Para valorar la influencia de esta modificación génica sobre el desarrollo de los frutos, se estudió la **cinética de desarrollo** de los mismos en las tres líneas (**Fig. III.2**). Los resultados mostraron una similitud morfológica en la cinética de los frutos indicando que las diferencias en actividad XET no se reflejan en el crecimiento.

A continuación, se optó por continuar la investigación con los frutos pertenecientes a la línea silvestre y a la transgénica que sobre-expresa el gen *SXTH1*, debido a que en esta línea fue donde encontramos las mayores diferencias de expresión y actividad XET en relación con la línea silvestre. Como continuación de la caracterización fenotípica de los frutos, se valoró la **dureza de los frutos** en los estadios descritos, de ambas líneas (**Fig. III.6**). Los resultados no mostraron diferencias entre las líneas en los estadios de crecimiento, mientras que a lo largo de los estadios de maduración, los frutos con mayor actividad XET, registraron una dureza mayor significativamente. Esto pone de manifiesto que un aumento de la actividad XET provoca que los frutos sean más duros.

Seguidamente, se comprobó que en los frutos transgénicos, los cambios registrados en firmeza, posiblemente por una alteración de la estructura del xiloglucano de la pared celular, se debían a la acción de la XET, y que el aumento de esta actividad enzimática no estaba alterando la actividad glucanasa, que es la otra actividad enzimática que actúa sobre el metabolismo del xiloglucano. El estudio la **actividad glucanasa** a lo largo del desarrollo de los

frutos (**Fig. III.5**) no mostró diferencias significativas entre la línea que cuenta con mayor actividad XET y las silvestres. Esto sugiere que las diferencias de firmeza en los frutos transgénicos se deben a la acción principal de la XET.

Puesto que estos cambios en la firmeza, son el resultado del metabolismo del xiloglucano de la pared celular, se analizó la composición hemicelulósica de la misma y la **estructura del xiloglucano**. Los resultados indican que tanto la masa molecular media de los azúcares totales como el xiloglucano, disminuyen paralelamente con el avance de la maduración en ambas líneas (**Tabla III.2**). Nuestros resultados coinciden con la reducción de la masa molecular media del xiloglucano encontrado en tomate a lo largo de la maduración (Sakurai y Nevins, 1993; Seymour y Gross, 1996) y en dos cultivares de mango (Mitcham y McDonald, 1992; Yashoda *et al.*, 2005). Además, nuestros resultados indican que a una mayor masa molecular del xiloglucano la dureza de los frutos es mayor, lo que coincide con los estudios en tomates con la mutación *rin* (ripening inhibitor; Robinson y Tomes, 1968), donde se establece un paralelismo entre el mantenimiento de la masa molecular del xiloglucano y la dureza de los frutos (Maclachlan y Brady, 1994). Hasta el momento no se conocía quien regulaba esta relación, pero nuestros resultados nos han permitido sugerir por primera vez, que sea la actividad XET la que relacione la masa molecular del xiloglucano con la dureza, puesto que los frutos con mayor actividad XET cuentan con mayor masa molecular y son más duros.

Para profundizar en la implicación de la XET en el metabolismo del xiloglucano durante la maduración, se estudio la **composición en XGOs del xiloglucano** durante el desarrollo de los frutos, comprobando que no existían diferencias entre la línea silvestre y transgénica (**Fig. III.10**). Aunque, si se observan modificaciones a medida que avanza la maduración de los frutos. En el Capítulo II, donde estudiamos la implicación de la XET en el crecimiento de las plántulas, se puso de manifiesto cómo las diferencias entre las paredes celulares de las tres líneas estudiadas no se encuentran en la composición del xiloglucano, sino en sus enlaces y uniones con el resto de los componentes de la pared, sugiriendo que en frutos pueda suceder lo mismo.

Los resultados de la evolución de la composición de la pared celular confirman los obtenidos previamente en el estudio de la firmeza de los frutos, puesto que los tomates con una mayor actividad XET sufren una depolimerización menor de las hemicelulosas a lo largo de la maduración, concretamente del xiloglucano, lo cual se correlaciona con un aumento de la dureza en estos frutos. No obstante, nuestras plantas transgénicas cuentan con un aumento de la actividad XET total debido a la sobre-expresión del gen *SXTH1*, sin embargo, no podemos saber si el aumento de otra isoenzima de la familia produciría el mismo efecto o es concretamente esta isoenzima la responsable de la transglucosilación que se produce durante la maduración de los frutos. Es decir, la intensidad de la depolimerización de la pared celular durante la maduración de los frutos por la acción XET, esta supeditada a numerosos factores como son el balance final de la actividad enzimática de las isoenzimas de la familia expresadas, la naturaleza del sustrato y la inducción hormonal, todo ello bajo la coordinación genética programada, tisular y temporalmente.

Por ello, todos los resultados anteriores parecen sugerir que la XET es necesaria para el mantenimiento de la integridad estructural de la pared celular durante la maduración, ya que si la actividad disminuye se ablanda el fruto.



CAPÍTULO IV

Implicación de la xiloglucano
endotransglucosilasa durante la infección
de frutos por *Penicillium expansum* Link. A.

INTRODUCCIÓN

En este Capítulo nos centramos en los **estreses bióticos producidos por patógenos fúngicos**, concretamente por *Penicillium expansum* Link. A., en dos sistemas modelos en frutos maduros. El primer sistema es la manzana, *Malus domestica* L. variedad Golden Delicious, del que *Penicillium expansum* Link. A. es hospedador habitual, provocando pérdidas millonarias durante la post-cosecha (Rosember, 1990). El segundo sistema es el tomate, *Solanum lycopersicum* L. variedad Canario y variedad Money Maker. La elección de ambos sistemas fue debida, por una parte, a la diferencia de especificidad patogénica, y por otra parte, a la estructura y composición diferencial de la pared celular de ambos frutos, puesto que la estructura del xiloglucano de manzana está formada por oligosacáridos XXXG, mientras que la del tomate es XXGG (Vincken *et al.*, 1997 b).

La pared celular constituye una barrera natural frente a las infecciones por patógenos. Sin embargo, la existencia de pequeñas heridas o la desestructuración de la misma, facilita el comienzo de la infección. Normalmente, se pone en marcha una batería enzimática del hongo que hidroliza tanto pectinas como hemicelulosas. Así, la activación de las enzimas que degradan las **pectinas** de la pared celular durante la infección fúngica, son consideradas básicas para determinar el factor de patogeneidad de cada hongo. Por ello, existen numerosos trabajos que estudian la relación de varias de estas enzimas con la infección fúngica. Así, las **pectinasas** son las primeras enzimas sintetizadas, degradando las pectinas de la pared y provocando una desestructuración de las redes tridimensionales de celulosa y xiloglucano, además de provocar una respuesta hipersensible que elimina a las propias células vegetales (Cooper, 1983). A continuación las **pectin metil-esterasas**, provocan la desesterificación de las pectinas y disminuyen el pH, lo cual facilita e induce la actuación de las **poligalacturonasas** (Yao *et al.*, 1996; Oeser *et al.*,

2002; Sánchez-Torres y González-Candelas, 2003) y de las **pectato liasas** (Rogers *et al.*, 2000; Yacoby *et al.*, 2001).

Sin embargo, la degradación de las **hemicelulosas** no ha sido tan estudiada, pese a que constituye un importante componente para la desestructuración integral de la pared celular y la colonización de los tejidos de la planta (Carpita y Giberaut, 1993). En concreto, la degradación del xiloglucano por la glucanasas del hongo (Real *et al.*, 2004), permite la actuación de las celulasas fúngicas que degradan las microfibrillas de celulosa de la pared celular. Las **glicosidasas** intervienen en los cortes de las cadenas laterales del xiloglucano y facilitan el acceso al sustrato a otras enzimas de la planta y del patógeno que degradan la pared (Keon *et al.*, 1987).

Aunque no existen estudios al respecto, es previsible la implicación de una enzima relacionada con la renovación y metabolismo del xiloglucano, como es la **XET** (Rose *et al.*, 2002), por lo que pensamos que esta enzima pueda también estar implicada potencialmente en la degradación del xiloglucano que se produce durante la infección de los frutos. Sin embargo, la actuación de esta enzima, solo ha sido investigada tanto por su relación con la expansión celular durante el crecimiento, como en procesos de degradación de la pared, como los que ocurren durante la maduración de los frutos. Así, como hemos visto en el Capítulo anterior, el aumento de la actividad XET provoca un aumento de la dureza de los frutos, sugiriendo que la XET es necesaria para el mantenimiento de la integridad estructural de la pared celular durante la maduración de los mismos.

Por lo tanto, el objetivo de este Capítulo se centró en esclarecer el mecanismo de infección fúngica, valorando las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de la pared celular en manzanas y tomates durante la infección por *Penicillium expansum* Link. A., así como los cambios en la estructura de la pared celular durante la infección en ambos frutos. En particular, estábamos interesados en determinar la posible implicación de la XET en el mecanismo de infección y su repercusión en la estructura de las hemicelulosas y del xiloglucano. Junto con los frutos maduros de manzana y tomate canario,

utilizamos tomates transgénicos maduros que cuentan con niveles superiores de enzima con actividad XET, lo que provoca que tengan alterada la estructura de la pared, como se mostró en el Capítulo anterior.

Para completar el estudio de la implicación de la XET en el metabolismo del xiloglucano de la pared celular durante la infección de los frutos, se cuantificó la expresión génica de las *SXTHs* descritas para tomate en frutos de tomate maduros, de la variedad Money Maker y Canario, así como su actividad XET.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron dos sistemas modelos de frutos maduros. El primer sistema fue la **manzana**, *Malus domestica* L. variedad Golden, la cual se consiguió en el mercado local, seleccionando tamaños y estadios de maduración similares. El segundo sistema es el **tomate**, *Solanum lycopersicum* L. del cual se utilizaron dos variedades. La primera fue la variedad **Canario**, que fue comprado en el mercado local, seleccionando tamaños y el mismo grado de maduración, y la segunda fue la variedad **Money Maker**, de la cual se utilizaron dos líneas: una silvestre (XET S) y otra transgénica (XET +), esta última, cultivada en las cabinas destinadas a transgénicos del invernadero del SCSIE de la Universitat de València.

Infección de *Malus domestica* L. y *Solanum lycopersicum* L. variedad Canario con *Penicillium expansum* Link. A.

Infección fúngica de frutos

La cepa fúngica de *Penicillium expansum* Link. A (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>) fue suministrada como un liofilizado de esporas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT: 20140; <http://www.cect.org/>). Esta cepa se sembró en medio agar patata dextrosa (PDA, Difco Laboratories, EEUU) y se mantuvo como un cultivo esporulado a 24 °C, para lo cual fue re-sembrando semanalmente.

Para la infección de los frutos maduros se utilizó un inóculo de esporas de 7 días, que fue resuspendido en agua miliQ estéril y filtrado con lana de vidrio. Posteriormente, se preparó una solución de esporas de 2×10^6 esporas ml⁻¹, empleando una cámara cuentaglobulos, Neubauer (Tiefe 0,100 mm, W-Germany). Los **frutos infectados** fueron infiltrados con 10 µl (**Fig. IV.1 A1**), en cada uno de los cuatro pinchazos equidistantes realizados en el perímetro ecuatorial, con una microjeringa Hamilton, Gastight # 1705 de 50 µl (Bonaduz, Suiza). La profundidad del pinchazo fue de 0,5 cm. Los **frutos control** se pincharon con la misma cantidad de agua miliQ estéril. Los frutos se almacenaron a 24 °C y 60% de humedad relativa durante 3 días. Transcurrido este periodo se evaluó la infección externa e interna, eliminando la cutícula y recogiendo un cilindro de pericarpo del fruto de 1 cm de diámetro alrededor del punto de infiltración (**Figs. IV.1 A1 y B1**). Se muestra la evolución externa (**Fig. IV.1 A2**) e interna (**Fig. IV.1 A3**) de la infección en manzanas y se presenta la evolución exterior (**Figs. IV.1 B1-B3**) de la infección de tomates y la evolución interior (**Figs. IV.1 B4-B6**). Las muestras se almacenaron por duplicado y se congelaron a -80 °C y/o a -25 °C según la exigencia de los experimentos a realizar posteriormente.

Adicionalmente, se realizaron tratamientos de autoclavado a 121 °C durante una hora, previos a la infección. Posteriormente, se procedió a la infección del mismo modo al explicado anteriormente y, tras recoger el material por duplicado, se congelaron a -80 °C y/o a -25 °C según la exigencia de los experimentos a realizar posteriormente.

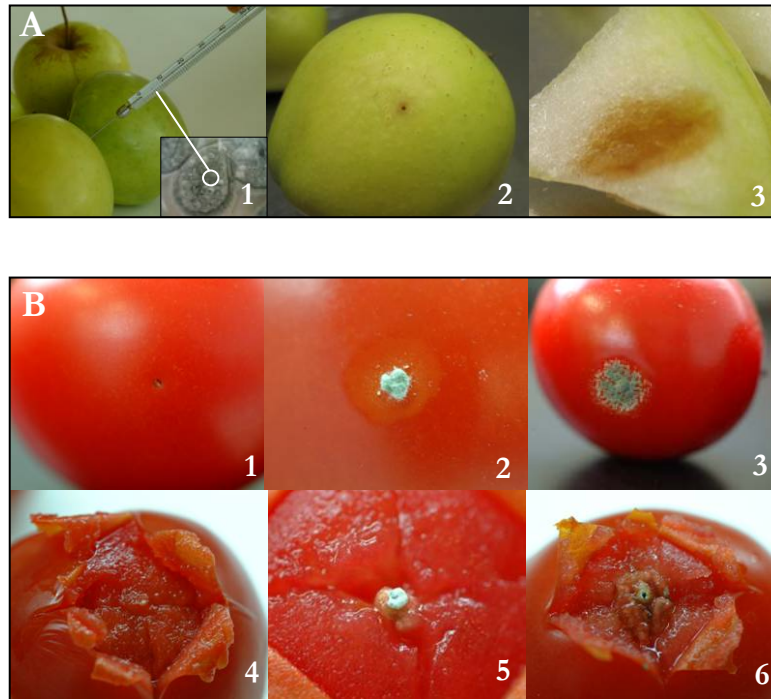


Fig. IV.1. Fotos que ilustran el proceso de infección fúngica y el desarrollo de la misma en frutos de manzana y en frutos de tomate maduros. **A)** Se observa la jeringa de inyección con el inóculo de esporas de *Penicillium expansum* Link. A. (1) y la evolución externa (2) e interna (3) de la infección en manzanas. **B)** Se presenta la evolución exterior de la infección de tomates (1-3) y la evolución interior (4-6)

Actividades enzimáticas de la pared celular de manzanas y tomates durante la infección fúngica

Obtención del extracto enzimático

Se extrajeron las proteínas del material congelado, perteneciente a los frutos control e infectados, como se explica en el Capítulo III. Adicionalmente, para el ensayo de la glucanasa, se autoclavarón frutos de manzana y tomate para inactivar las actividades enzimáticas de los mismos y, posteriormente, fueron infectados. A estos frutos se les extrajo la proteína como se ha explicado

previamente. Para el ensayo de la actividad XET, se realizaron tres extracciones proteicas diferentes. La primera consistió en el extracto proteico de frutos autoclavados e infectarlos después. En la segunda, se obtuvieron los extractos proteicos de los frutos control e infectados y a posteriori se mezclaron. Y en la tercera, consistió en unir el material obtenido de los frutos control e infectado y a la mezcla, extraerle las proteínas.

Actividad endopoligalacturonasa

Se estimó el descenso en viscosidad que provoca el extracto enzimático sobre un sustrato comercial. La mezcla de reacción consistió en 0,3 ml de ácido poligalacturónico (sal sódica Sigma Che. Co.) al 12% (p/v) en tampón acetato sódico 40 mM pH 5,0 y 0,2 ml de extracto de proteínas (0,5-0,6 mg ml⁻¹) en tampón acetato sódico 40 mM pH 5,0. Se incubó a 37 °C y se evaluó la viscosidad relativa de la mezcla de reacción al caer por una pipeta de 0,2 ml a intervalos de 5-10 minutos durante 60 minutos. Como controles negativos de la actividad enzimática se usaron extractos enzimáticos inactivados por calor a 100 °C durante 10 minutos.

Actividad exopoligalacturonasa

Se cuantificó la liberación hidrolítica de azúcares reductores que provoca la enzima en un sustrato comercial. La mezcla de reacción consistió en 1 ml de ácido poligalacturónico (sal sódica Sigma Che. Co.) al 1% (p/v) en tampón acetato sódico 40 mM pH 5,0 y 20 µl de extracto de proteínas (0,5-0,6 mg ml⁻¹) en tampón acetato sódico 40 mM pH 5,0. La mezcla se incubó a 37 °C durante 2 horas, se detuvo la reacción con 0,2 ml de HCl 2M y se midió la liberación de azúcares reductores solubles en el medio gelatinizado, como describe el método de Somogyi - Nelson explicado en el Anexo I. Como controles negativos se usaron extractos enzimáticos inactivados por calor a 100 °C durante 10 minutos.

Actividad pectín metil-esterasa

Se cuantificó la actividad enzimática por la evolución colorimétrica de un indicador de pH a medida que eran liberados los extremos reductores que acidifican el medio (adaptado de Hagerman y Austin, 1986). La mezcla de reacción contenía 1 ml de pectina de frutos cítricos al 0,5% (grado de esterificación 90%, Sigma Che. Co.) en fosfato sódico 0,2 M pH 7,5 (p/v), 0,5 ml de azul de bromotimol al 0,02% (sal sódica, Sigma Che. Co.) (p/v) y 10 μ l de extracto de proteína (0,5-0,6 mg ml⁻¹) en tampón acetato sódico 40 mM pH 6,0. La mezcla se incubó a 25 °C durante 3 minutos, a lo largo de los cuales se estudió la disminución de la absorbancia a 620 nm, tomando valores cada 10 segundos. Como controles negativos se usaron extractos enzimáticos inactivados por calor a 100 °C durante 10 minutos.

Actividad β (1 \rightarrow 4) glucanasa

Se cuantificó el descenso en viscosidad que provoca la enzima en un sustrato comercial o extraído. Se incubaron alícuotas de 0,3 ml de carboximetil celulosa (sal sódica, de alta viscosidad, Sigma Che. Co.) al 1,1% (p/v) en tampón acetato sódico 40 mM pH 6,0 o xiloglucano de tamarindo al 1% (p/v) en el mismo tampón junto con 0,2 ml de extracto de proteínas (0,5-0,6 mg ml⁻¹) en tampón acetato sódico 40 mM pH 6,0. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C y se evaluó su viscosidad relativa al caer por una pipeta de 0,2 ml a intervalos de 10 minutos durante 60 minutos. Como controles negativos se usaron extractos enzimáticos inactivados por calor a 100 °C durante 10 minutos. Además, se ensayó la actividad de los frutos autoclavados e infectados posteriormente.

Actividad xiloglucano endotransglucosilasa soluble

Con los extractos proteicos de los frutos de manzana y tomate control e infectados se ensayó la actividad XET soluble según se explicó en el Capítulo I. Adicionalmente, se procedió de igual modo con las tres extracciones adicionales: 1) proteína de frutos autoclavados e infectados, 2) mezcla de

proteínas de frutos control y proteínas de frutos infectados y 3) mezcla del material de frutos control e infectados y extracción de sus proteínas.

Actividades glicosidasas: α y β -galactosidasa, α -arabinosidasa, β -glucosidasa, α y β -xilosidasa, α -fucosidasa

Se ensayaron las actividades glicosidasas: α y β -galactosidasa, α -arabinosidasa, β -glucosidasa, α y β -xilosidasa, α -fucosidasa cuantificando la liberación de los *p*-nitrofenol liberados por la actividad enzimática sobre los *p*-nitrofenil-glicósidos correspondientes. La mezcla de reacción contenía 0,5 ml del sustrato comercial de *p*-nitrofenil-galactopiranosido, *p*-nitrofenil-arabinopiranosido, *p*-nitrofenil-glucopiranosido, *p*-nitrofenil-xilopiranosido, *p*-nitrofenil-fucopiranosido (Sigma Che. Co) 1 mM en tampón acetato sódico 40 mM pH 6,0 junto con 10 μ l de extracto de proteínas (0,5-0,6 mg ml⁻¹) en 90 μ l tampón acetato sódico 40 mM pH 6,0 para las actividades glicosidasas correspondientes. Se incubaron durante 1 hora a 37 °C y la reacción fue parada con 1 ml de Na₂CO₃ 1M. Se agitó y se midió la absorbancia de la mezcla de reacción a 400 nm. Para la cuantificación se utilizó una recta patrón de *p*-nitrofenol (Sigma Che. Co.). Como controles negativos se usaron extractos enzimáticos inactivados por calor a 100 °C durante 10 minutos.

Análisis de los polisacáridos de la pared celular durante la infección fúngica

Extracción de las paredes celulares

Se recogió un total de 100 g de material vegetal de al menos 10 muestras y se homogeneizó con un IKA Ultraturrax T25 (IKAWerke, Stanfen, Alemania) en metanol. Se hirvió durante 30 minutos, se lavó dos veces con metanol, dos veces con acetona, dos veces con metanol/cloroformo (1:1; v/v) y finalmente con éter dietílico. Se dejó secar al aire hasta peso seco constante.

Fraccionamiento de polisacáridos pécticos y hemicelulósicos

Pectinas

Se resuspendieron 300 mg de paredes celulares en 30 ml de CDTA 0,05 M pH 6,5 y se agitaron durante 24 horas a 25 °C. La mezcla se centrifugó a 30000 g durante 5 minutos y el residuo fue re-extraído del mismo modo con CDTA 0,05 M pH 6,5. Los dos sobrenadantes se mezclaron, se dializaron frente a agua destilada, se concentraron en rotavapor y se congelaron a -25 °C hasta su análisis posterior. A esta fracción de las pectinas se le llamó fracción **CDTA**. El residuo fue re-extraído con Na₂CO₃ 0,05 M pH 10,8 que contenía NaBH₄ 20 mM y se agitó durante 24 horas a 1 °C en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se centrifugó a 30000 g durante 5 minutos y el residuo fue re-extraído del mismo modo con Na₂CO₃ 0,05 M pH 10,8 que contenía NaBH₄ 20 mM en atmósfera de nitrógeno. Los dos sobrenadantes fueron mezclados y neutralizados con ácido acético glacial. Se dializaron frente a agua destilada, se concentraron en rotavapor y se congelaron a -25 °C hasta su análisis posterior. A esta fracción de las pectinas se le llamó fracción **Na₂CO₃**.

Hemicelulosas

El residuo obtenido se mantuvo en agitación durante 24 horas en atmósfera de nitrógeno con KOH al 4% que contenía NaBH₄ 20 mM. Se centrifugó durante 10 minutos a 30000 g y el residuo se re-extrajo con KOH al 4% que contenía NaBH₄ 20 mM. Los dos sobrenadantes fueron mezclados y neutralizados con ácido acético. Se dializaron frente a agua destilada, se concentraron en rotavapor y se congelaron a -25 °C hasta su análisis posterior. A esta fracción de las hemicelulosas se le llamó fracción **KOH 4%**. El residuo resultante se extrajo dos veces durante 24 horas con KOH al 24% que contenía NaBH₄ 20 mM bajo atmósfera de nitrógeno. Se mezclaron las dos extracciones y se neutralizaron con ácido acético glacial en hielo. Se dializaron frente a agua destilada, se concentraron en rotavapor y se congelaron a -25 °C hasta su

análisis posterior. A esta fracción de las hemicelulosas se le llamó fracción **KOH 24%**.

α -Celulosa

Después de la extracción de las paredes celulares con CDTA, Na₂CO₃, KOH 4% y 24%, el residuo resultante constituyó la fracción α -celulosa, la cual se lavó con agua dos veces y acetona otras dos y se dejó secar al aire. Se tomaron 1-2 mg de residuo seco y se resuspendió en 200 μ l de ácido sulfúrico al 72% (v/v) incubándolo durante 1 hora a 20 °C. Se diluyó con agua hasta una concentración de ácido sulfúrico de 0,5 M y se hidrolizó a 121 °C durante 1 hora. Se cuantificaron los azúcares totales del sobrenadante de la mezcla de hidrólisis mediante el método del fenol sulfúrico explicado en el Anexo I de Metodología General.

Análisis de la composición de las fracciones por cromatografía de exclusión molecular durante la infección fúngica

Las fracciones se analizaron por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sepharosa CL-4B (115 cm x 1,4 cm) (Pharmacia Biotech. Uppsala, Sweden). Se usó cloruro de imidazolio 10 mM pH 7,0 como eluyente de las fracciones pectinas y NaOH 1M para eluir las fracciones hemicelulósicas. Se cargaron 3 mg de azúcares totales de cada muestra y se eluyó con un flujo de 17,3 ml h⁻¹, recogiendo un total de 60 fracciones de 2 ml cada una. Las columnas se calibraron y se estimó la masa molecular de pectinas y hemicelulosas, como se explicó en el Capítulo III. Se cuantificaron los azúcares totales por el método de Dubois, los ácidos urónicos por Blumenkratz y el xiloglucano por Kooiman como se exponen en el Anexo I de Metodología General. Además, en la fracción α -celulosa, se analizaron los azúcares totales por el método de Dubois.

Determinación de azúcares neutros por cromatografía de gases (GLC)

Para el análisis de los azúcares neutros se siguió el ensayo de Albersheim *et al.* (1967) que se detalla en el Anexo I.

Estudio de la infección fúngica sobre frutos silvestres y transgénicos de *Solanum lycopersicum* L. variedad Money Maker

Caracterización de los estadios de infección fúngica interna y externamente

Se establecieron los niveles de avance de la infección y se siguió la evolución de la infección de los frutos fotográficamente, con una frecuencia de 6 horas entre valoraciones, para conocer visualmente los cambios experimentados tanto por los frutos como por el hongo, exterior e interiormente. Se valoró la evolución estructural de los tejidos de los frutos, la velocidad de infección fúngica y estructuras típicas, como el cono endurecido de la infección mediante pinchazo.

Actividad xiloglucano endotransglucosilasa durante la infección

Se procedió a realizar dos ensayos distintos, en el primero se inyectaron los tomates con 10 µl de agua estéril en los controles y se infectaron con 10 µl de la solución de esporas **2x10⁶ esporas ml⁻¹**. Los frutos se mantuvieron durante 8, 24, 48, 72 y 120 horas a 25 °C y en oscuridad. Se valoró el nivel de infección externo e interno y se recogió material a los distintos tiempos, almacenándolo a -25 °C y/o -80 °C. En el segundo ensayo se procedió de modo similar pero infectando los frutos con la solución de esporas de **500 esporas ml⁻¹**. En este caso los frutos se mantuvieron durante 96, 144 y 288 horas a 25 °C y en oscuridad. Se valoró el nivel de infección externo e interno, recogiendo material y almacenándolo a -25 °C y/o -80 °C.

Para el estudio de la actividad XET, se extrajo la proteína como se explica en el Capítulo III y se realizó el ensayo enzimático de la XET soluble como se explica en el Capítulo I.

Análisis de la expresión de las *SXTHs* en frutos de tomate transgénicos durante la infección por *Penicillium expansum* Link. A.

Búsqueda y análisis *in silico* de las secuencias *SXTHs* obtenidas de las bases de datos

Se estudiaron las secuencias que codifican para alguno de los genes que componen la familia de las XTHs descritas para *Solanum lycopersicum* L. en la página de “XTH world” (<http://labs.plantbio.cornell.edu/xth/tomato.htm>) como se muestran en la **Tabla IV.1**. Se realizó una búsqueda en numerosas bases de datos (Gen Bank y ESTs de NCBI) definiendo las secuencias incompletas, identificando la secuencia codificante de proteínas y traduciéndola virtualmente. Con esta secuencia se realizó un estudio predictivo del destino final de la proteína, mediante la identificación del péptido señal N-terminal (VFC-GY), su longitud y secuencia, por homología con los identificados en otras proteínas. (<http://psort.nibb.ac.jp> y <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). Evitaremos elegir esta región como parte del oligosacárido, puesto que suele eliminarse durante el procesado y transporte de la proteína. Además, se identificó la secuencia consenso del centro activo, DEIDFEFLG, que corresponde al motivo ExDxE, conservado en toda la familia enzimática de glicosil hidrolasas (GH16, CAZy <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/fam/GH16.html>). Muchas secuencias contienen un potencial sitio de glicosilación en el extremo N-terminal, adyacente al centro activo, característico de la XTH. Aunque este motivo se encuentra en el extremo C-terminal en *SXTH5*, *SXTH8* y *SXTH25* y está ausente en *SXTH6* y

SXTH14, modificaciones que se asocian al Grupo 3 de la familia de XTH (Campbell y Braam, 1999; Saladie *et al.*, 2006).

Tabla IV.1 Relación de genes estudiados pertenecientes a la familia de las XTHs. En la tabla se muestra el nombre asignado en la página “XTH World” (<http://labs.plantbio.cornell.edu/xth/tomato.htm>), el N° del GenBank, el N° registrado en el Instituto de Investigaciones Genómicas (TIGR) y el N° registrado en el genoma de Solanáceas. Además se muestran las referencias donde se describen dichas secuencias.

Nomenclatura en la red	N° Gen Bank	N° TC	N° SGN	Referencias
<i>SXTH1</i>	D16456	162611	U215539	Okazawa <i>et al.</i> (1993) Catala <i>et al.</i> (1997)
<i>SXTH2</i>	AF176776	163540	U215133	Catala <i>et al.</i> (2001)
<i>SXTH3</i>	AF205069 AY497476	153904 153905 154605	U213043 U213044	Saladie, Catala y Rose, <i>no publicado</i>
<i>SXTH4</i>	AF186777	166485		Chen <i>et al.</i> (2002)
<i>SXTH5</i>	AY497475	161980	U213444	Saladie, Catala y Rose, <i>no publicado</i>
<i>SXTH6</i>	AY497477	155091	U215860	Saladie, Catala y Rose, <i>no publicado</i>
<i>SXTH7</i>	AY497478	157241	U220494	Saladie, Catala y Rose, <i>no publicado</i>
<i>SXTH8</i>	AB036338 ETAG-A3	156974	U213679	Hahn y Chung <i>no publicado</i>
<i>SXTH9</i>	AY497479	162660	U216405	Saladie, Catala y Rose, <i>no publicado</i>
<i>SXTH10</i>	X82684 LetXET-B2	154659	U213454	Arrowsmith y de Silva (1995)
<i>SXTH11</i>	X82685 LetXET-B1	164317	U213455	Arrowsmith y de Silva (1995)
<i>SXTH12</i>	AF215069 AF205069 LeBR1	154952	U215382	Koka <i>et al.</i> (2000)
<p>N° GenBank: número de referencia en la base de datos internacional: DNA DataBank of Japan (DDBJ), European Molecular Biology Laboratory (EMBL) y GenBank del NCBI. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html)</p> <p>N° TC: número asignado en “The Institute for Genomic Research Assembly” (http://www.tigr.org/tigrscripts/tgi/T_reports.cgi?species=tomato)</p> <p>N° SGN: número identificativo en “Solanaceae Genomics Network Unigene” (http://www.sgn.cornell.edu/index.pl)</p>				

Extracción de mRNA. Síntesis de cDNA. PCR cuantitativo en tiempo real

La extracción de mRNA, síntesis de cDNA y la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real se explican en el Capítulo I.

RESULTADOS

*Infección de frutos de **Malus domestica** L. variedad Golden y **Solanum lycopersicum** L. variedad Canario con **Penicillium expansum** Link. A.*

Tras la infección de los frutos maduros y la obtención de los extractos enzimáticos correspondientes, se procedió al ensayo de las actividades enzimáticas propias de la pared celular.

Cuantificación de las actividades enzimáticas de la pared celular en manzana y tomate durante la infección fúngica

Para cuantificar la **actividad endopoligalacturonasa** se estudió la viscosidad relativa que provocó sobre el ácido poligalacturónico. Como se muestra en la **Fig. IV.2**, en los frutos control se registró un moderado descenso en la viscosidad del sustrato, que fue del 35% en manzana y del 15% en tomate al finalizar el experimento. Sin embargo, en los frutos infectados la disminución de la viscosidad relativa fue muy notable en ambas especies. En las manzanas infectadas, la elevada actividad enzimática provocó una caída de la viscosidad en un 92% a los 15 minutos. En los tomates infectados, la caída de la viscosidad fue más gradual, alcanzando a los 40 minutos un descenso del 88%.

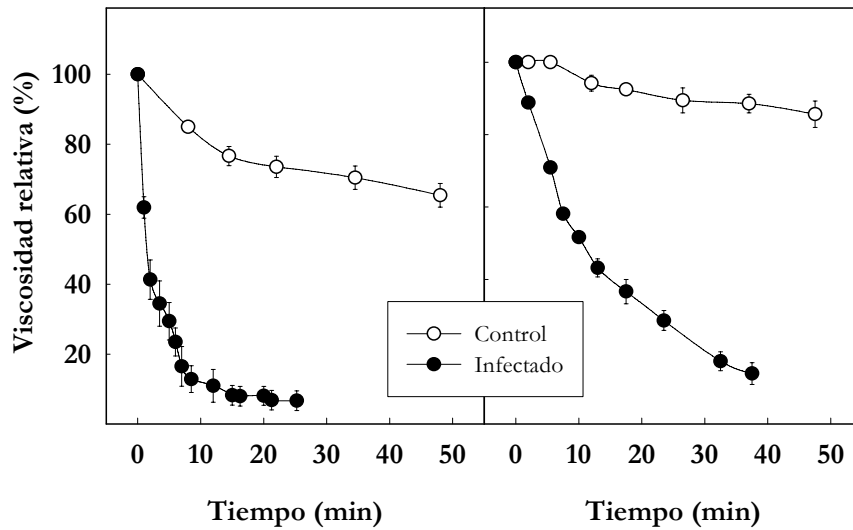


Fig. IV.2 Actividad endopoligalacturonasa de frutos de manzana y tomate control e infectados. Se muestra la viscosidad relativa del ácido poligalacturónico (Sigma Che. Co.) provocado por la actividad enzimática de los frutos control e infectados. Los valores reflejan la media \pm SE de la viscosidad relativa de tres experimentos independientes.

Para evaluar la **actividad exopoligalacturonasa**, se cuantificó la liberación hidrolítica de azúcares reductores, que provocó la enzima sobre el ácido poligalacturónico (Sigma Che. Co.). Los resultados se muestran en la **Fig. IV.3**, donde en los frutos de manzana la actividad enzimática de los frutos control fue alrededor de diez veces menor que en los frutos infectados. En los frutos de tomate, la actividad enzimática fue ligeramente inferior en los controles que en los infectados.

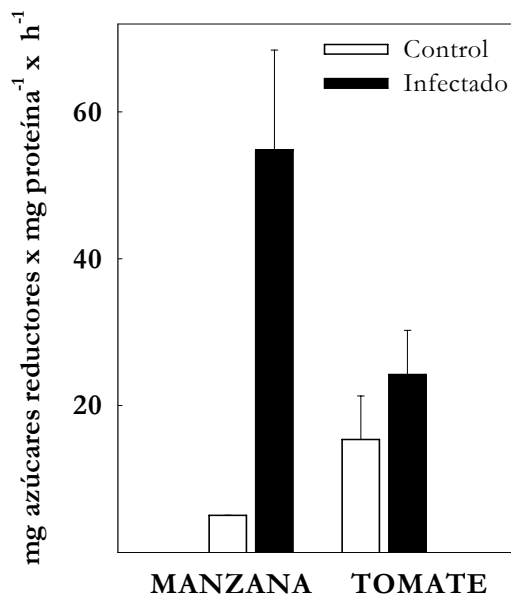


Fig. IV.3 Actividad exopoligalacturonasa de frutos de manzana y tomate control e infectados. Se muestra la actividad enzimática mediante los mg de azúcares reducidos de los frutos. Los valores reflejan la media \pm SE de los mg de azúcares reductores por mg de proteína y por hora, de tres experimentos independientes.

Para estudiar la **actividad pectín metil-esterasa**, se evaluó el porcentaje de grupos ácidos equivalentes que fueron liberados por la enzima. Los resultados se muestran en la **Fig. IV.4**, donde el comportamiento de los dos frutos es muy diferente. En manzana, el extracto enzimático control mostró una escasa liberación de grupos ácidos, mientras que en los frutos infectados la actividad fue creciendo con el tiempo de incubación, alcanzando un valor máximo de 15% de ácidos equivalentes liberados por mg de proteína al final de los dos minutos que duró el experimento. En los frutos de tomate, se cuantificó una elevada tasa de liberación, alcanzando el 12% de ácidos equivalentes por mg de proteína al final del experimento, tanto en los frutos control como en los infectados.

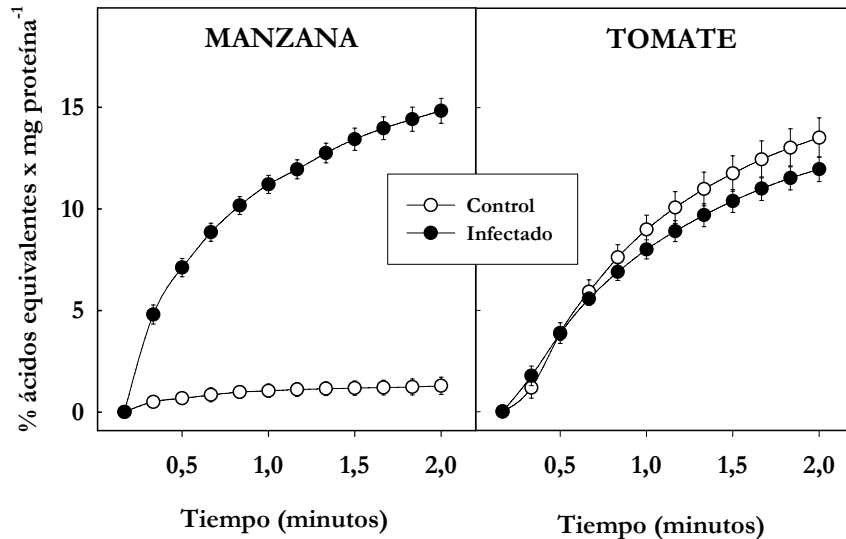


Fig. IV.4 Actividad pectin metil-esterasa de frutos de manzana y tomate control e infectados. Se muestra el porcentaje de liberación de grupos ácidos provocado por la actividad enzimática en los frutos. Los valores muestran la media \pm SE del porcentaje de los grupos ácidos equivalentes liberados de tres experimentos independientes.

La actividad β (1 \rightarrow 4) glucanasa se ensayó midiendo la viscosidad relativa en ambos frutos con dos sustratos diferentes, uno comercial (carboxi-metil celulosa) y otro extraído en nuestro laboratorio (xiloglucano de tamarindo). Los resultados se muestran en la **Fig. IV.5**. En la figura se observa que en los frutos de manzana, el comportamiento frente a los dos sustratos de los controles e infectados fue similar. En los frutos control apenas se produjo descenso en la viscosidad relativa a lo largo del experimento, por el contrario, en los frutos infectados se cuantificó un notable descenso de la viscosidad relativa, alcanzando valores de disminución del 90% a los 60 minutos cuando se utilizó CMC como sustrato, y de 30 minutos cuando se empleó xiloglucano de tamarindo.

Si analizamos el comportamiento de los frutos de tomate, se puede apreciar que en el extracto enzimático de los controles se produce un ligero descenso con ambos sustratos que disminuye un 10% en viscosidad al ensayarlo con CMC y

un 20% al hacerlo con xiloglucano de tamarindo. En los frutos de tomate infectados, se produjo un descenso del 55% cuando se ensayó con CMC y del 20% cuando se empleó xiloglucano de tamarindo.

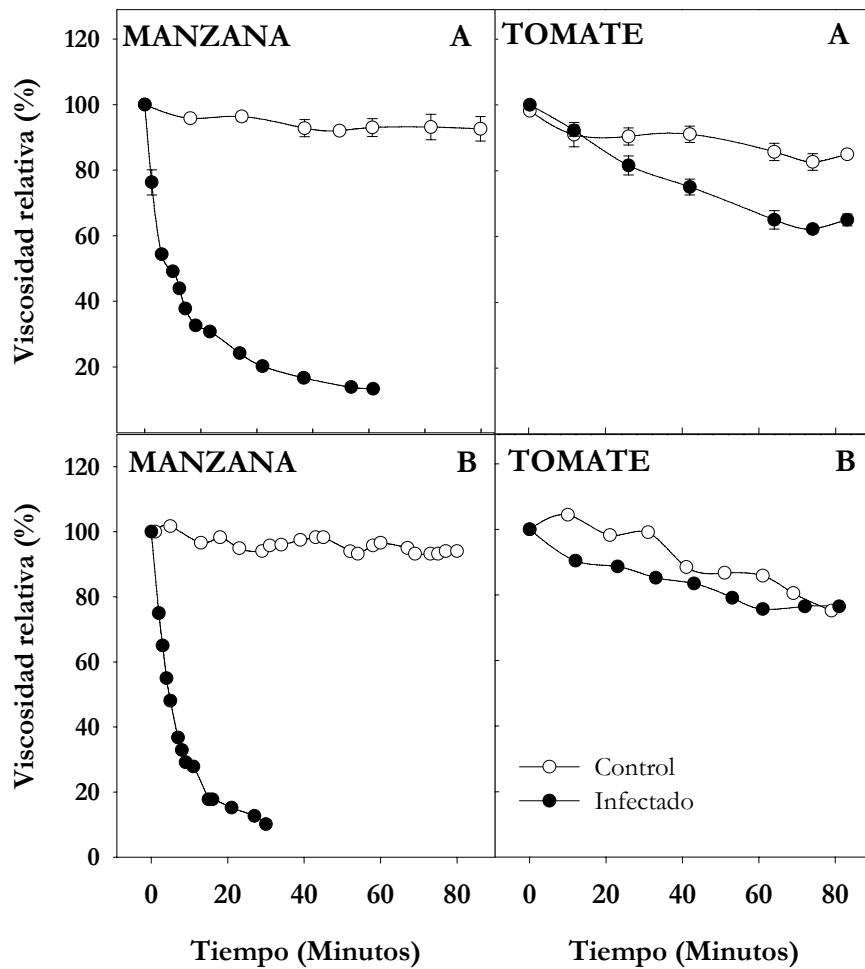


Fig. IV.5 Actividad $\beta(1\rightarrow4)$ glucanasa de frutos de manzana y tomate control e infectados. En la parte superior (**A**) se ensayó con carboxi-metil celulosa (CMC) y en la inferior (**B**) con xiloglucano de tamarindo. Se muestra la viscosidad relativa provocada por la actividad enzimática de los frutos. Los valores muestran la media \pm SE de la viscosidad relativa de tres experimentos independientes, usando 20 frutos para cada experimento.

De modo que si comparamos los resultados obtenidos en manzana y tomate, observamos que durante la infección de manzana, la actividad glucanasa está muy incrementada, mientras que en tomate, apenas sufre diferencias en comparación con los frutos control, que de por sí, parecen tener más actividad que los frutos de manzana control.

Adicionalmente, se realizó un experimento donde se autoclavaron los frutos previamente a la infección fúngica, con el objetivo de inactivar todas las actividades enzimáticas del fruto e intentar determinar la actividad enzimática $\beta(1\rightarrow4)$ glucanasa del hongo. Los resultados se presentan en la **Fig. IV.6.**, donde se muestra que el hongo también produce esta actividad, ya que la disminución de la viscosidad relativa observada en CMC fue aproximadamente del 22% en manzana y del 62% en tomate a los 40 minutos.

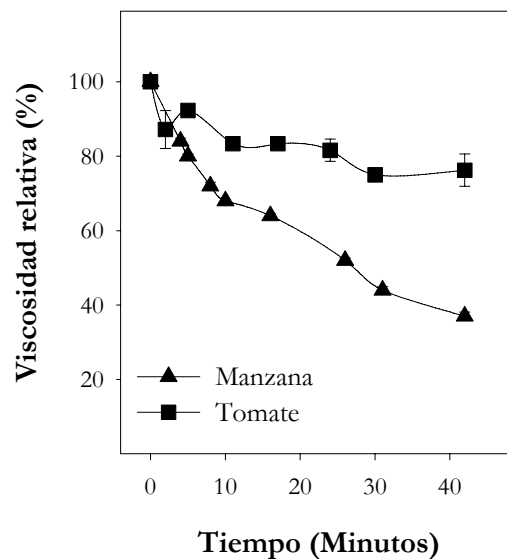


Fig. IV.6 Actividad $\beta(1\rightarrow4)$ glucanasa de frutos de manzana y tomate autoclavados e infectados. Se utilizó carboxi-metil celulosa (CMC) como sustrato. Se muestra la viscosidad relativa provocada por la actividad enzimática de los frutos. Los valores muestran la media \pm SE de la viscosidad relativa de tres experimentos independientes, usando 20 frutos para cada experimento.

De modo que si comparamos los niveles de actividad glucanasa procedentes de ambos organismos expuestos en la **Fig. IV.5**, con estos resultados, observamos que en manzana la contribución enzimática del hongo es aproximadamente de un 60% y de un 25% del fruto. Mientras que en tomate, el pequeño aumento de la actividad durante la infección es debido en un 15% al fruto y en un 25% al hongo.

Para ensayar la **actividad XET soluble** en los frutos de manzana y tomate, control e infectados, se cuantificaron los oligosacáridos- $[^3\text{H}]$ que se incorporaron a las cadenas de xiloglucano por la acción de la enzima. En la **Fig. IV.7** se presentan los resultados obtenidos. Los resultados muestran que la actividad enzimática fue mayor en frutos de manzana que en frutos de tomate. Asimismo, la actividad en los controles de ambos frutos fue mayor a los infectados, representando una disminución en la actividad de 4 veces en manzana y de 7 veces en tomate.

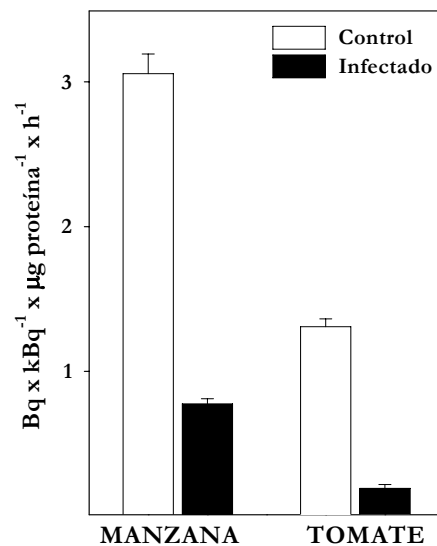


Fig. IV.7 Actividad XET soluble de frutos de manzana y tomate control e infectados. Los valores muestran la media \pm SE de los Bq por kBq por μg de proteína y por hora de tres experimentos independientes, usando 20 frutos para cada experimento.

Adicionalmente, se realizaron varios experimentos con el objetivo de intentar conocer el origen (planta u hongo) de la actividad XET soluble y la posibilidad de que existieran inhibidores de la misma. Para ello se realizaron tres ensayos diferentes, cuyos resultados se presentan en la **Tabla IV.2**. En el primero, se autoclavarón los frutos y se infectaron posteriormente. Los resultados mostraron que no se detectó actividad enzimática, por lo tanto el hongo no tiene actividad XET soluble. En el segundo de los ensayos, se extrajeron las proteínas de frutos control e infectados y se mezclaron para realizar el ensayo de actividad enzimática. En este caso, los resultados mostraron una actividad XET proporcional en ambos frutos, lo que descartaba la existencia de un inhibidor en el extracto enzimático de los frutos infectados. Este hecho se corroboró con el tercer ensayo, donde se mezclaron frutos control e infectados y se extrajeron las proteínas de la mezcla, obteniéndose una actividad XET proporcional.

Tabla IV.2 Actividad XET soluble de frutos de manzana y tomate, autoclavados previamente e infectados después. Los valores muestran la media \pm SE de los Bq por kBq por μ g de proteína y por hora, de tres experimentos independientes, usando 20 frutos para cada experimento. nd= no detectado.

Actividad XET soluble (Bq kBq ⁻¹ μ g de proteína ⁻¹ h ⁻¹)		
TRATAMIENTO	MANZANA	TOMATE
Frutos control (Fig. IV.7)	3,06 \pm 0,13	1,31 \pm 0,05
Frutos infectados (Fig. IV.7)	0,77 \pm 0,03	0,19 \pm 0,02
Frutos autoclavados e infectados	nd	nd
Mezcla de proteínas extraídas de frutos control e infectado	1,76 \pm 0,10	0,86 \pm 0,06
Mezcla de fruto control e infectado y extracción de las proteínas	1,21 \pm 0,10	nd

Las **actividades glicosidasas** se ensayaron mediante la cuantificación colorimétrica de la liberación del *p*-nitrofenol del sustrato de la enzima correspondiente. La **Fig. IV.8** muestra las actividades de α y β -galactosidasa, α -fucosidasa (sólo en manzana), α y β -xilosidasa, β -glucosidasa y α -arabinosidasa.

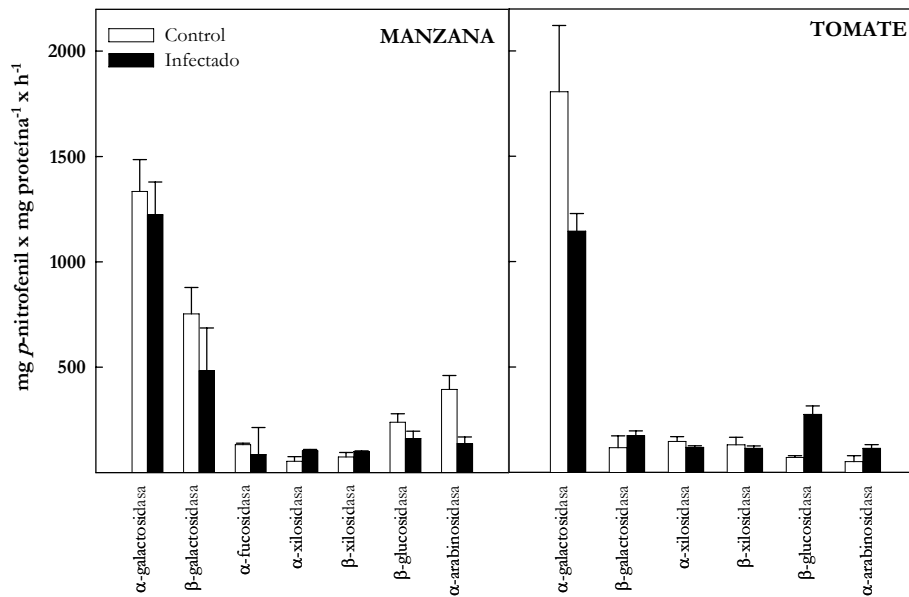


Fig. IV.8 Actividades glicosidasas de manzana y tomate de frutos control e infectados. Los valores muestran la media \pm SE de los mg de *p*-nitrofenol liberados por mg de proteína y por hora, de tres experimentos independientes, usando 20 frutos para cada experimento. Se ensayaron las siguientes actividades glicosidasas: α y β -galactosidasa, α -fucosidasa (sólo en manzana), α y β -xilosidasa, β -glucosidasa y α -arabinosidasa.

Las actividades glicosidasas más destacadas en **manzana** fueron la α y β -galactosidasa. En ambos casos la actividad en los frutos control fue mayor que en los frutos infectados. La actividad β -glucosidasa y α -arabinosidasa, siguen este mismo comportamiento, pese a que su actividad es menor. Las actividades que se registraron de forma minoritaria, α -fucosidasa y α y β -xilosidasa, no mostraron diferencias entre los frutos de manzana control y los infectados. En

los frutos de **tomate**, la actividad enzimática mayoritaria fue la α -galactosidasa, donde los frutos control registraron una mayor actividad respecto a los frutos infectados. El resto de actividades enzimáticas registraron un nivel muy bajo de actividad y no se encontraron diferencias entre los frutos de tomate control e infectados, a excepción de la β -glucosidasa donde la actividad en los frutos infectados fue superior a los controles.

Análisis de la pared celular de los frutos de manzana y tomate durante la infección

En primer lugar estudiamos el contenido total de azúcares en las fracciones de hemicelulosas y pectinas solubles, así como en el residuo de α -celulosa, como se muestra en la **Tabla IV.3**.

Las pectinas contenidas en frutos de manzana fueron alrededor del 47%, mientras que las de tomate estuvieron en torno al 55%. La mayoría de las pectinas fueron extraídas en la fracción CDTA, la cual aumentó en los frutos infectados en ambos frutos. En contraste, las pectinas extraídas con carbonato sódico, fueron inferiores y disminuyeron con la infección en ambos frutos. A pesar de los cambios en ambas fracciones con la infección, la cantidad total de pectinas permaneció constante. Los ácidos urónicos representaron un 32 y 39% de las pectinas en frutos de manzana control e infectados y un 34 y 22% en tomates control e infectados de la fracción CDTA. Mientras que en la fracción de carbonato sódico fueron de 26 y 39% en manzana control e infectadas, respectivamente.

Las hemicelulosas de las fracciones KOH 4 y 24%, representaron un 27% y 19% de los polisacáridos de la pared celular en manzana y tomate, respectivamente. El xiloglucano estuvo presente en ambas fracciones, pero principalmente en la del KOH 24%. En esta fracción se observó una disminución de los azúcares totales y del xiloglucano en los frutos infectados, sobre todo en manzana. Mientras que en la fracción KOH 4%, se registró un ligero aumento en los frutos infectados.

Tabla IV.3 Contenido total de azúcares de las fracciones obtenidas de los frutos de manzana y tomate control e infectados (% peso seco). Los valores muestran la media \pm SE de tres experimentos independientes, usando 20 frutos para cada experimento. AT: azúcares totales, AU: ácidos urónicos y XG: xiloglucano, de la fracción.

		PECTINAS				HEMICELULOSAS				α -CELULOSA
		CDTA		Na ₂ CO ₃		KOH 4%		KOH 24%		
		AT	AU	AT	AU	AT	XG	AT	XG	
MANZANA	Control	40,5 $\pm 1,6$	12,9 $\pm 2,8$	7,7 $\pm 4,3$	2,0 $\pm 0,8$	5,1 $\pm 0,8$	1,6 $\pm 0,1$	21,7 $\pm 3,2$	10,6 $\pm 0,2$	26,5 $\pm 1,0$
	Infectado	45,1 $\pm 2,1$	17,7 $\pm 0,5$	2,3 $\pm 0,6$	0,9 $\pm 0,0$	9,1 $\pm 1,1$	3,1 $\pm 0,7$	13,0 $\pm 2,3$	5,7 $\pm 0,8$	34,5 $\pm 0,9$
TOMATE	Control	51,1 $\pm 3,7$	17,5 $\pm 5,3$	4,2 $\pm 0,2$	0,4 $\pm 0,4$	7,1 $\pm 2,6$	1,0 $\pm 0,0$	10,4 $\pm 0,2$	5,9 $\pm 0,3$	20,6 $\pm 4,4$
	Infectado	56,9 $\pm 8,0$	12,4 $\pm 0,9$	3,7 $\pm 1,3$	0,2 $\pm 0,1$	9,0 $\pm 2,6$	1,1 $\pm 0,2$	9,8 $\pm 1,3$	5,3 $\pm 0,4$	18,4 $\pm 1,9$

La fracción de α -celulosa representó el 26 y 34% en manzana control e infectada y un 20 y 18% en tomate control e infectado, respectivamente. En manzanas se obtuvo mayor contenido en α -celulosa en los frutos infectados, mientras que en tomates, la α -celulosa disminuyó en los frutos infectados.

El análisis de los azúcares neutros se presenta en la **Fig. IV.9**, donde se observan los azúcares neutros calculados respecto a los azúcares totales de cada una de las fracciones.

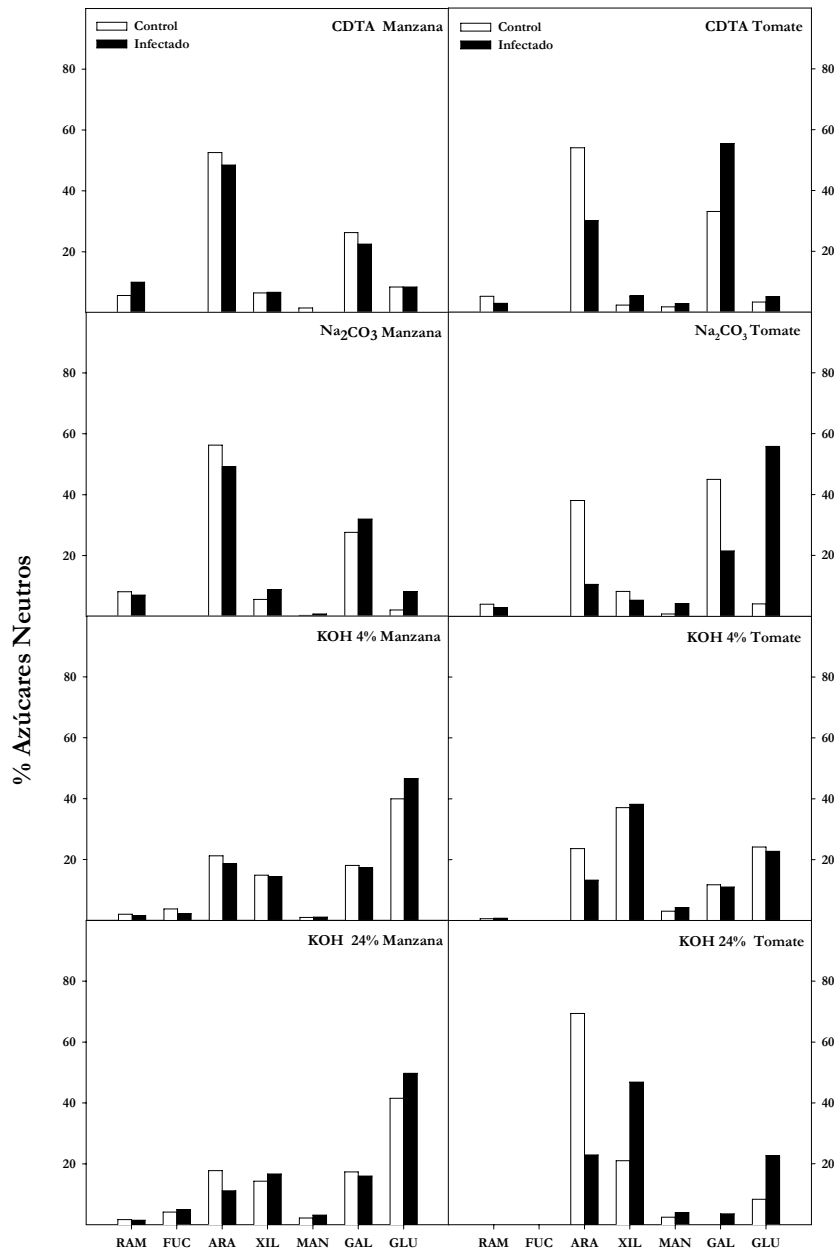


Fig. IV.9 Azúcares neutros presentes en las fracciones pécticas CDTA y Na₂CO₃, y hemicelulósicas: KOH 4 y 24%. El porcentaje de azúcares neutros se determinó por cromatografía de gases con detector FID, tras lo cual se calculó en función del total de azúcares de la fracción. RAM: Ramnosa; FUC: Fucosa; ARA: Arabinosa; XIL: Xilosa; MAN: Manosa; GAL: Galactosa; GLU: Glucosa.

La mayor cantidad de los azúcares neutros se concentra en la fracción péctica de CDTA de ambos frutos. La arabinosa de los frutos controles siempre se mantiene con valores superiores a los frutos infectados en todas las fracciones y en ambos frutos.

A continuación se muestra la distribución de la masa molecular media de las pectinas fraccionadas en manzanas y tomates, control e infectados en la **Fig. IV.10**.

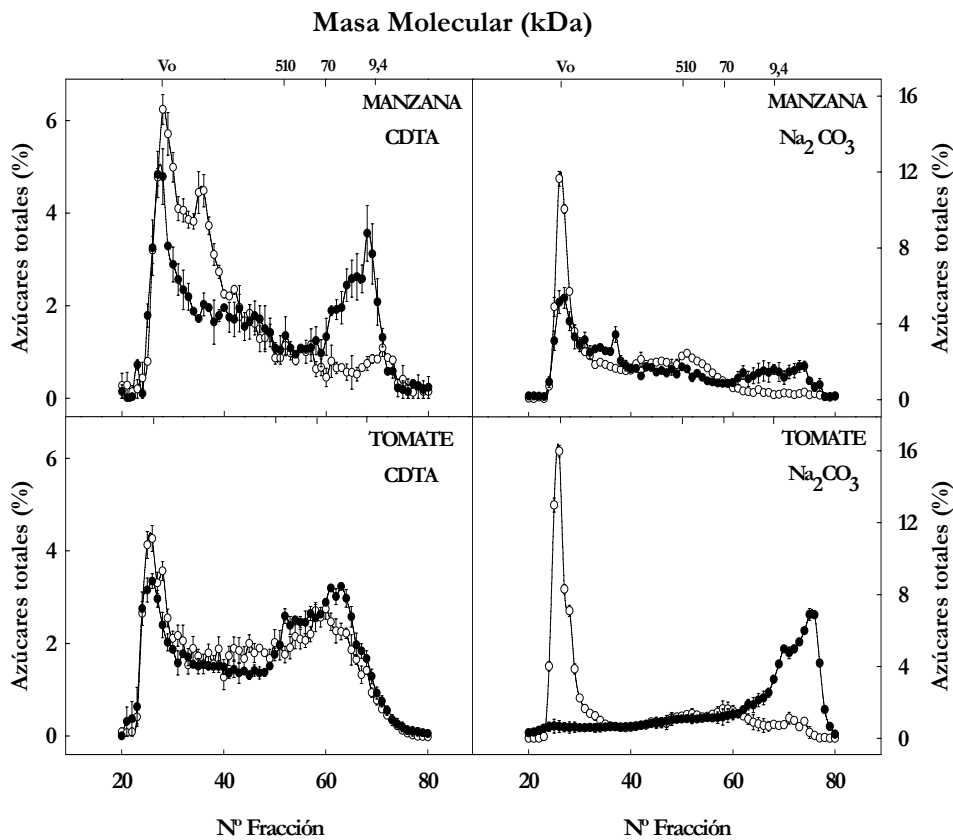


Fig. IV.10 Distribución de la masa molecular media de azúcares totales de frutos control (-o-) e infectados (-●-) en las fracciones pécticas CDTA y Na₂CO₃, fraccionadas mediante cromatografía de exclusión molecular. Los valores muestran la media \pm SE del porcentaje de azúcares totales de tres experimentos independientes, usando 20 frutos para cada experimento. La escala de calibración se obtuvo con dextransos de masa molecular conocido (9,4 kDa, 70 kDa y 510 kDa; Sigma Che. Co.) y el volumen vacío se indica como Vo.

En la fracción **CDTA** se extrajeron la mayoría de las pectinas en ambos frutos. Así, en esta fracción, los frutos de manzana control, mostraron un pico cromatográfico en el volumen vacío. En la manzana infectada, se observó que este primer pico disminuía considerablemente y aparecía un nuevo pico en la región de menor masa molecular. En los frutos de tomate control se registró un menor grado de polimerización, distinguiendo dos picos cromatográficos, el primero, situado en el volumen vacío y, el segundo, que eluye entre los marcadores 510 y 9,4 kDa. En los frutos infectados de tomate, el primer pico disminuyó a medida que aumentó el segundo, aunque las diferencias con el control son menores que en los frutos de manzana.

Las pectinas extraídas en la fracción **Na₂CO₃** de los controles de ambos frutos, fueron predominantemente de alta masa molecular, ya que eluyen en el volumen vacío, mientras que en el proceso de infección, disminuyen estos polímeros en ambos frutos, aumentando la cantidad de los de menor masa molecular. Este hecho fue más pronunciado en los frutos de tomate, donde desaparecen por completo las pectinas de alta masa molecular. Los resultados de la distribución de la masa molecular media de las pectinas, muestran una disminución de la masa molecular media de las mismas como resultado de la infección en ambos frutos.

Las hemicelulosas se analizaron mediante la distribución de la masa molecular media de azúcares totales y xiloglucano de las fracciones KOH 4% y 24% de los frutos de manzana y tomate, control e infectado.

Los resultados de la masa molecular media de azúcares totales y xiloglucano de la fracción del **KOH 4%** se muestran en la **Fig. IV.11**. El cromatograma que describen los frutos de manzana control muestra dos picos. El primero se situó en el volumen vacío y el segundo aproximadamente en torno al marcador de 510 kDa. En los frutos de manzana infectados se observó un solo pico en el cromatograma, el cual estuvo desplazado hacia regiones de menor masa molecular. La distribución del xiloglucano fue similar a la de azúcares totales en los frutos de manzana control, mientras que en los infectados el pico mostró un notable desplazamiento hacia regiones de menor masa molecular. En el

tomate, los azúcares de los frutos control fueron eluidos en un solo pico que se dispone en torno al marcador de 70 kDa. Mientras que el cromatograma de los frutos infectados, estuvo ligeramente desplazado hacia la zona de menor masa molecular. El xiloglucano de esta fracción no fue suficiente para poder analizarse mediante perfil de elución.

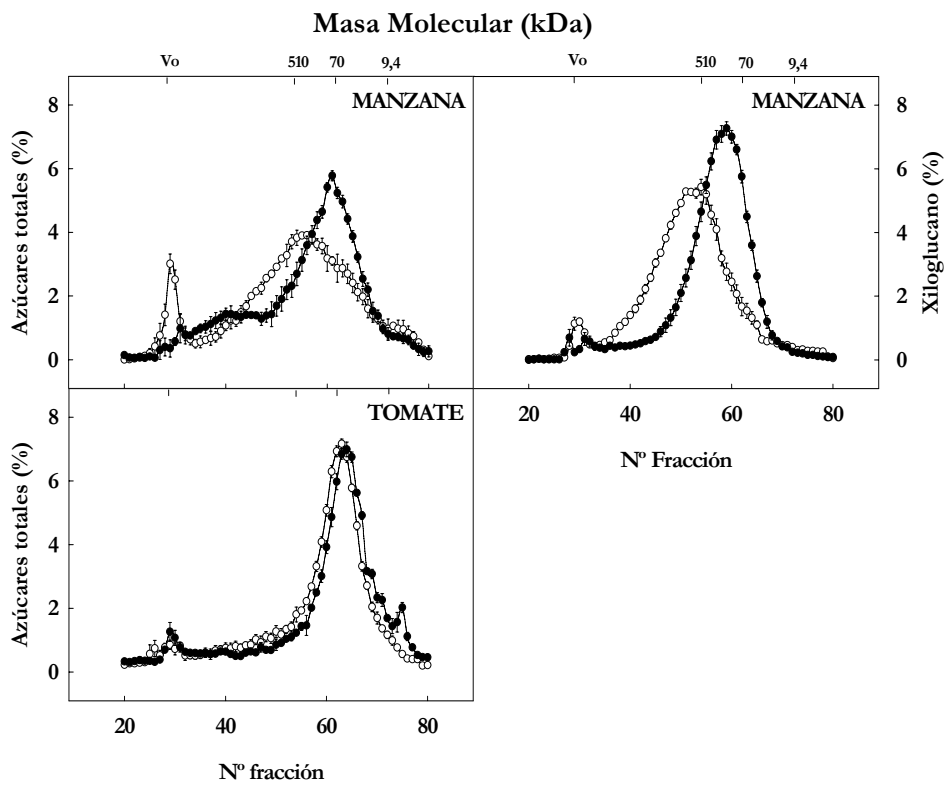


Fig. IV.11 Distribución de la masa molecular media de azúcares totales y xiloglucano de frutos control (-o-) e infectados (-●-) en la fracción hemicelulósica del KOH 4%, fraccionada mediante cromatografía de exclusión molecular. Los valores muestran la media \pm SE del porcentaje de azúcares totales y xiloglucano de tres experimentos independientes, usando 20 frutos para cada experimento. La escala de calibración se obtuvo con dextranos de masa molecular conocido (9,4 kDa, 70 kDa y 510 kDa; Sigma Che. Co.) y el volumen vacío se indica como Vo.

En la **Fig. IV.12**, se presentaron los perfiles de distribución de la masa molecular media de la fracción del **KOH 24%** de azúcares totales y xiloglucano de frutos de manzana y tomate, control e infectados.

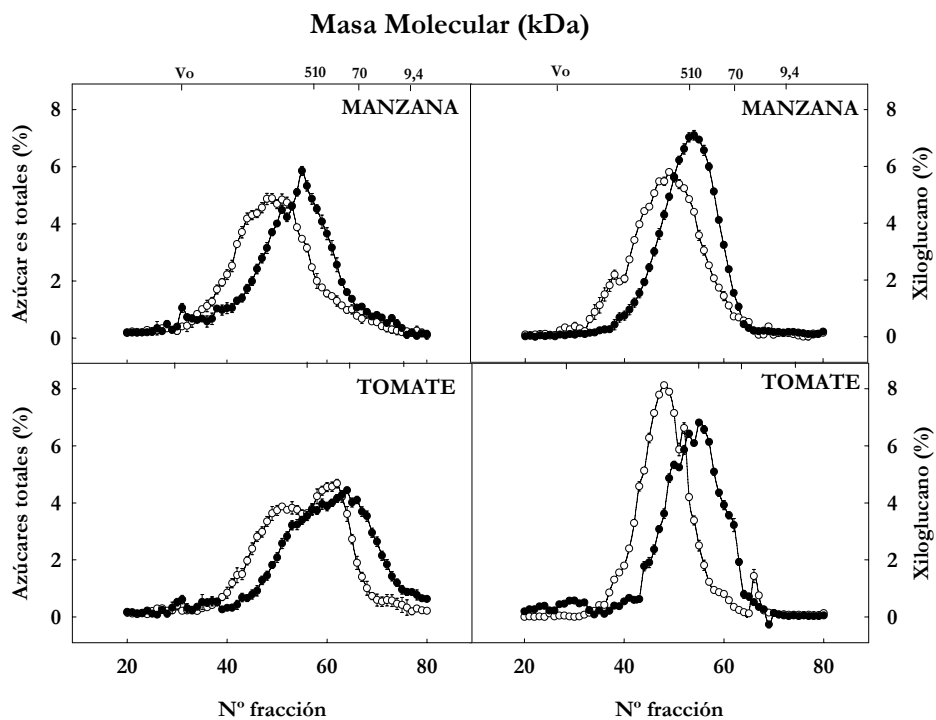


Fig. IV.12 Distribución de la masa molecular media de azúcares totales y xiloglucano de frutos control (-o-) e infectados (-●-) en la fracción hemicelulósica del KOH 24%, fraccionada mediante cromatografía de exclusión molecular. Los valores muestran la media \pm SE del porcentaje de azúcares totales y xiloglucano de tres experimentos independientes, usando 20 frutos para cada experimento. La escala de calibración se obtuvo con dextransos de masa molecular conocido (9,4 kDa, 70 kDa y 510 kDa; Sigma Che. Co.) y el volumen vacío se indica como Vo.

En la **Fig. IV.12**, los cromatogramas de los azúcares de manzana mostraron un solo pico de elución, el cual se desplazó hacia zonas de menor masa molecular en los frutos infectados. El xiloglucano eluyó en el mismo rango que los azúcares, mostrando una elevada depolimerización de este polisacárido en los frutos infectados. En los frutos de tomate control, se observaron dos picos en

el cromatograma. El primero se localizó en valores superiores al marcador 510 kDa y disminuyó en los frutos infectados, lo cual provocó que aumentara el segundo pico que se eluyó en valores menores a dicho marcador. El xiloglucano presente en esta fracción no siguió la misma distribución que los azúcares y eluyó en un solo pico cromatográfico. Los resultados de la distribución de la masa molecular media de las hemicelulosas, apuntan a una disminución de la masa molecular media de las mismas como resultado de la infección en ambos frutos.

Una vez que se realizó el fraccionamiento de las paredes celulares y se analizaron los componentes pécticos de las fracciones de CDTA y Na_2CO_3 y los hemicelulósicos de las fracciones KOH 4% y 24% por exclusión molecular, los valores obtenidos de la masa molecular media de azúcares y xiloglucano de dichos componentes, se muestran en la **Tabla IV.4**.

Los resultados del fraccionamiento de pectinas muestran que tanto en manzanas como en tomates se produjo una considerable reducción de la masa molecular media de los azúcares totales en los frutos infectados frente a los controles. En manzana, esta reducción fue más notable en la fracción CDTA que en la fracción Na_2CO_3 . Sin embargo, en los frutos de tomate, esta disminución fue más acusada en la fracción Na_2CO_3 que en la CDTA. Aunque cabe destacar que este modo de calcular la masa molecular media numéricamente provoca algunos errores, ya que no distingue entre polisacáridos fraccionados y no fraccionados, de modo que asigna una masa molecular de 5000 kDa a todo lo que sale antes del V_0 .

Los resultados del fraccionamiento de hemicelulosas muestran que en manzana se observó una notable reducción de la masa molecular media de los azúcares totales en los frutos infectados frente a los controles. Esta reducción se observó en ambas fracciones de hemicelulosas (15% en KOH 4% y 31% en KOH 24%). Mientras que si observamos el xiloglucano, su descenso en la masa molecular media fue todavía mayor (49% en KOH 4% y 68% en KOH 24%). Sin embargo, en las hemicelulosas extraídas con KOH 4% de tomate, tan sólo se observó un ligero descenso en los frutos infectados, que fue mucho mayor

en las hemicelulosas del KOH 24%. En esta última fracción, se produjo una importante reducción de la masa molecular media tanto de los azúcares, como del xiloglucano (28% y 39%, respectivamente) en los frutos infectados frente a los controles.

Tabla IV.4 Masa molecular media (kDa) de azúcares totales (AT) y xiloglucano (XG) de las fracciones obtenidas de los frutos de manzana y tomate control e infectados. **A)** Fracciones pécticas: CDTA y Na₂CO₃. **B)** Fracciones hemicelulósicas: KOH 4% y KOH 24%. Los valores muestran la media \pm SE de tres experimentos independientes, usando 20 frutos para cada experimento. nd: no detectado.

A) PECTINAS		Masa molecular (kDa)			
		CDTA		Na₂CO₃	
		CONTROL	INFECTADO	CONTROL	INFECTADO
MANZANA	AT	3429 \pm 303	2479 \pm 274	3110 \pm 147	2669 \pm 564
TOMATE	AT	2213 \pm 790	1913 \pm 411	3277 \pm 45	696 \pm 10
B) HEMICELULOSAS		Masa molecular (kDa)			
		KOH 4%		KOH 24%	
	kDa	CONTROL	INFECTADO	CONTROL	INFECTADO
MANZANA	AT	1029 \pm 68	870 \pm 42	1331 \pm 31	919 \pm 27
	XG	954 \pm 47	503 \pm 105	1300 \pm 26	412 \pm 19
TOMATE	AT	741 \pm 23	716 \pm 11	661 \pm 26	473 \pm 10
	XG	nd	nd	1133 \pm 35	685 \pm 14

Estudio de la infección fúngica sobre frutos silvestres y transgénicos de *Solanum lycopersicum* L. variedad Money Maker

Cuantificación de la evolución de la infección

Tras la infección de los frutos maduros por *Penicillium expansum* Link. A. se realizó una valoración de la infección externa e internamente. En ambos casos se catalogó el nivel de infección en una escala numérica discreta del 0 al 3.

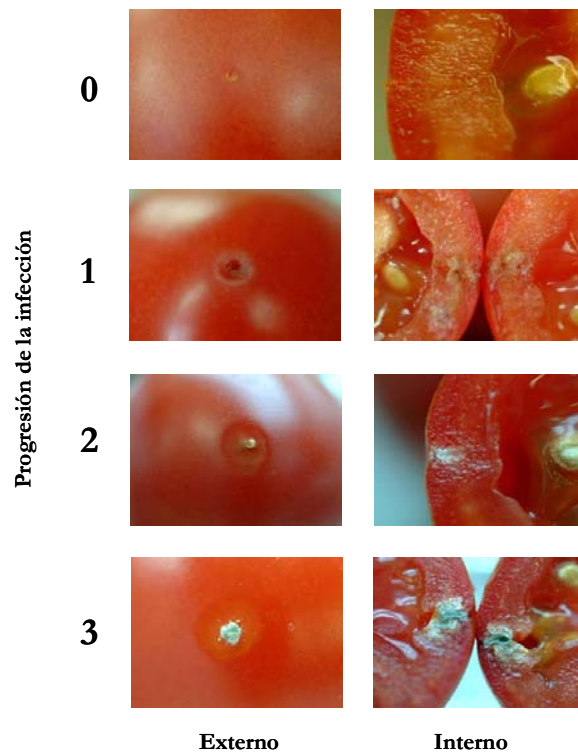


Fig. IV.13 Evolución del proceso de infección de frutos maduros por *Penicillium expansum*. Link. A. Catalogación del nivel de infección mediante escala numérica discreta entre 0 con ausencia de infección y 3 con micelio esporulado.

Como podemos ver en la **Fig. IV.13**, el **Nivel 0** no registra ningún daño, en el **Nivel 1** se aprecia una degradación del material acompañado de un pardeamiento de la zona de infección, en el **Nivel 2** ya se observa un crecimiento fúngico con micelio blanquecino del *Penicillium* pero sin esporular y el tejido vegetal comienza a descomponerse y en el **Nivel 3** se registra un crecimiento fúngico incipiente con micelio esporulado verde azulado y degradación notable del tejido vegetal. Además, se comprobó como en los frutos control, que fueron pinchados del mismo modo pero con agua, la herida se secó y cerró, y no se produjeron infecciones fúngicas ni bacteriológicas. De modo, que el valor que define el grado de infección de un grupo de *i* tomates de un experimento, viene dado por la fórmula siguiente:

$$\text{Medida de la infección} = ((\sum_i (\sum_{1 \rightarrow 4} NI/4)) / i \text{ tomates})$$

Donde: NI = Nivel de infección de cada uno de los 4 pinchazos realizados al tomate.

Evaluación de la infección fúngica

Después de la infección de los frutos maduros con 2×10^6 esporas ml^{-1} , se evaluó la evolución y el avance de la infección fúngica externa e internamente, a los 6 días de la infección de la línea silvestre (XET S) y de la transgénica que sobre-expresa *S/XTH1* (XET +).

Como se aprecia en la **Fig. IV.14**, el nivel de infección externa fue menor al registrado internamente en las dos líneas estudiadas. De manera que externamente, los frutos silvestres se infectaron de modo similar a los XET +. Sin embargo, cuando se analizó la infección interna se apreció que en los frutos silvestres la infección estaba mucho más avanzada significativamente que en los frutos XET +.

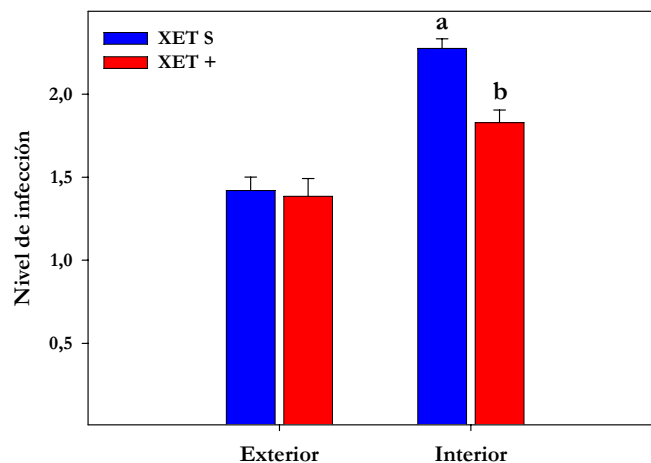


Fig. IV.14 Evaluación del nivel de infección medio de frutos maduros en la parte externa e interna de tomates de la variedad Money Maker silvestres (XET S) y transgénicos (XET +). Los frutos se infectaron con una solución de esporas de 2×10^6 esp ml^{-1} y se mantuvieron a 25°C en oscuridad durante 6 días. Los valores muestran la media \pm SE del nivel de infección medio de al menos tres experimentos independientes, usando 12 frutos para cada tratamiento. Distintas letras indican diferencias significativas entre las líneas (T-test, p valor $< 0,05$).

Cuantificación de la actividad xiloglucano endotransglucosilasa durante la infección en tomates silvestres y transgénicos

Para el estudio de la influencia de la infección por *Penicillium expansum* Link. A. sobre la actividad XET, se realizaron dos ensayos de infección en frutos maduros silvestres y transgénicos de tomates de la variedad Money Maker con dos concentraciones distintas de esporas (2×10^6 esporas ml^{-1} o 500 esporas ml^{-1}). En la **Fig. IV.15** se presenta el resultado de la actividad XET soluble en los frutos tratados con una solución mayor de esporas (2×10^6 esporas ml^{-1} de *Penicillium expansum* Link. A.). Los resultados de este primer ensayo, muestran que los valores de los frutos XET S fueron inferiores significativamente en todos los tratamientos a la línea XET +. Además también se puede observar una disminución en la actividad XET a medida que avanza la infección de los frutos. Si analizamos los resultados por líneas, se puede apreciar como en los frutos silvestres la actividad XET en los frutos control fue inferior en los tratamientos de 6h y 24h, siendo superior en el tratamiento de 48, 72 y 120h en

comparación con los frutos infectados. En la línea XET +, se cuantificaron niveles de actividad XET inferiores en los frutos infectados frente a los controles en todos los tratamientos.

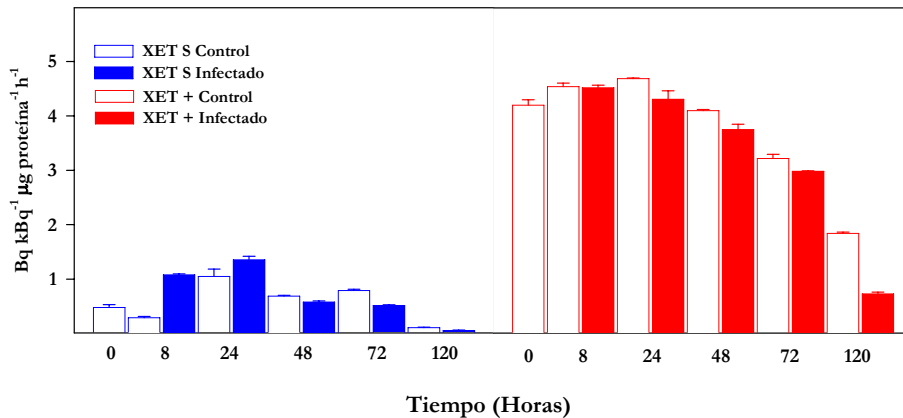


Fig. IV.15 Evolución de la actividad XET soluble de tomates de la variedad Money Maker silvestres (XET S) y transgénicos (XET +), infectados con 2×10^6 esporas ml^{-1} de *Penicillium expansum* Link. A. Se presentan los datos de los frutos control e infectados a diferentes tiempos, donde 0 es el tiempo inicial. Los frutos se mantuvieron a 25 °C en oscuridad durante 8, 24, 48, 72 y 120 horas. Los valores muestran la media \pm SE de la actividad XET soluble de tres experimentos independientes, usando 12 frutos para cada tratamiento.

En el segundo de los ensayos, se infectaron frutos maduros silvestres y transgénicos de tomates de la variedad Money Maker con una concentración de esporas de *Penicillium expansum* Link. A., 4000 veces menor a la anterior (**500 esporas ml^{-1}**), para el estudio de la influencia de la infección sobre la actividad XET con una concentración fúngica inferior y más lentamente. Como se muestra en la **Fig. IV.16**, los valores de actividad XET soluble en los frutos XET S fueron inferiores significativamente en todos los tratamientos a los frutos XET +. La evolución de la infección provocó una disminución de la actividad XET en todos los tratamientos, ya sean control o infectados. Así, en la línea XET S, los niveles de actividad XET en los frutos infectados fueron mayores en el tratamiento de 96 horas y menores a los controles en los tratamientos de 144 y 288 horas. En la línea XET +, los valores de actividad permanecieron similares entre frutos control e infectados en 96 y 144 horas,

mientras que descendió la actividad XET en los frutos infectados a las 288 horas de infección.

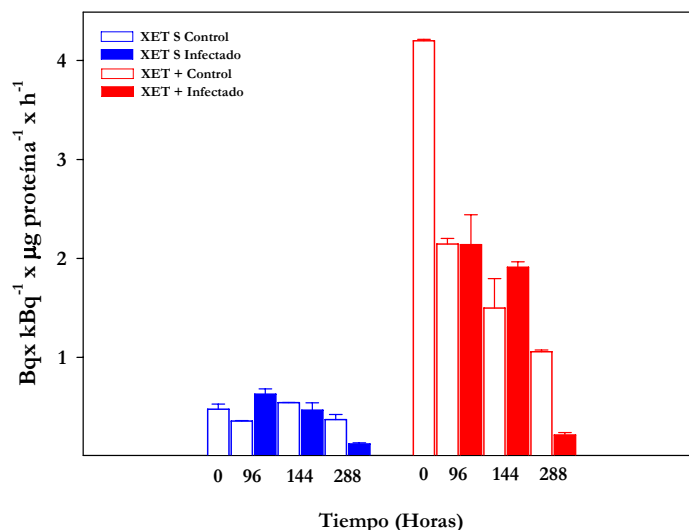


Fig. IV.16 Evolución de la actividad XET soluble de tomates de la variedad Money Maker silvestres (XET S) y transgénicos (XET +) infectados con 500 esporas ml^{-1} de *Penicillium expansum* Link. A. Se presentan los datos de los frutos control e infectados a diferentes tiempos, donde 0 es el tiempo inicial. Los frutos se mantuvieron a 25 °C en oscuridad durante 96, 144 o 288 horas. Los valores muestran la media \pm SE de la actividad XET de tres experimentos independientes, usando 12 frutos para cada tratamiento.

Análisis de la expresión de las *SXTHs* en frutos de tomate transgénicos durante la infección por *Penicillium expansum* Link. A.

Diseño de cebadores discriminantes para el estudio de los genes pertenecientes a la familia de *SXTHs* durante la infección de tomate

Para poder diseñar los cebadores, y una vez que se tuvieron todas las secuencias, se alinearon haciendo uso de la multi-comparación: <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>, como se presenta en la Fig. IV.17.

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

SXTH1 ATGG---GTATCATAAAGGA-GTT--TATTTAGTATTGTTTGTATTATTTGTCACATGTTGATT---TGTGGGTATC-CTAGAGG---CCAGTAGATGTGCCCTTTGGAAAACACTATG
SXTH4 ATGAAAGGA-GTT--TAGTTGCTTTTGTTTGATTAAATTTGTCATATGGCAAG---TGTGGGGTC-CAGGAG---GTARTTGTGTGCCCTTTGGACAACTATG
SXTH7 ATGG---CCACATTGACTTGTCTTCTTAAAAAATTCAGCTTTTGTCTAATATTTGGTATATGCTTGGACCTTTTCATTTCTACTAGTAACT---GCACGACCCGCCACTTTTACAGGATTTTA
SXTH2 ATGATCAAAACATCAAGTTGTATAT-TTACTTTCTTTCTTCAATATGTTTC-TTCGTA-GTGGTG---GCTTTGGTGTACTTTCCACCAAGATTTTG
SXTH3 ATGGCTTCTTCTTCTA-ARATTA-GTACTGTARTGTGT-TTATGATTAGTGCTTTTGGCATT---GCARTTGGGCCAAGTTTGTACAGAAATTCG
SXTH12 ATGGGGTCTTTTACC-CAT-TATGG-GTTCCTGATGTAGCACTTTATTTAGTCTTGCATGGTT---ACTTATGGTGGAAATTTTATCAAGAAATTTG
SXTH9 ATGCTTCTAARATTTTCATCAACATTCCTTCTTATTTCAATACTAATGAGTATCCAACTTACTA---GCCTCAGCTGGTAAATTTCTATAGAGATGTAG
SXTH10 ATGTTGCTGCA---GCTTCTCTTCTTACA---CTAGT---CTTACTATCCCT---GTTTCCGCTGATATTTCTACCAAGACGCGG
SXTH11 ATGGAAATCCCTCTTATTTACTTTTATTTTCTTACTCAATTCAGATTAATCAATCTCAGGTCCTCCCTTCACTGGCTACTATCTAGTTCTAGGGCACAACTCTATAGGATTTACCAAGGTTTAA
SXTH6 ATGAAATATGTCTTCTGTCTTATTTTCCATGTTTGG-TTTGTAGAGCTTTTAAATGAT---GTCTCAACAACTCTTTTACCAAGGATTTCA
SXTH5
SXTH8
Consensust.....t.....t.....t.....at.gtt..t..tt.t.....t..tt.....tc...a..a.....gc...gctg..a.tTTta.caaga.tttg

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260

SXTH1 AGCCARGTGGGCTAGTCACCATATTAAGTTCCTCAATGGTGGTACCCTACTGATCTTATTTCTCGACAGATCTTCAGGA---GCTGGATTTTCAGTCAAGAAATCATATCTGTTTGGCATTTCAGTAT
SXTH4 AACCAAGTTGGTCTAGTCACCATATTAAGTACTTATGGTGGTACTAGCCGCTGAACTTCTTCTGACAACTCTCTGGA---ACTGGATTTCAATCAAGAGATCGTATCTATTTGGTCATTTTCAGCAT
SXTH7 AATTCGCTTGGTCCGACTCTCACATCAACACTCGATGGCGGCAAGGGAAATCAACTTATTTCTGATCAAACTCAGGA---TGTGGATTTGCTTCGAGAGCAAAATACCTGTTGGACGTTGTAGCAT
SXTH2 ATGTTACATGGGGTATGGGAGGGTGAARAATCTCGAARACGGGCAACTTCTACTCTTCCCTCGATAGAGTCTTGGC---TCTGGATTTAAGTCAAAACAAATATATGTTTGGAAAGATTGACAT
SXTH3 ACATTAACATGGGGTATGGCAGAGCAARAATACTTAACAAATGGCGACCTCCTTACTCTCCTACTTGACAAATCTCAGGC---TCTGGTTTTCAATCCAAAGATGAATATCTGTTGGTAAATTGACAT
SXTH12 ACTTCACTTGGGGTGCATAGAGCCAAAGATTTTCAATGGAGGTCACCTTTATCTTTATCTTTAGACAAAGTTCTTGGC---TCTGGTTTTCAATCAAAAAGAACATCTCTTTGGAAAGATTGATAT
SXTH9 ACATAACTTGGGGCGAAGGACCGGTAARAATCAAGAGGGCGGTAGAGGCCCTGCCCATCGCTTGATAAACTTCTGGC---TCTGGTTTTCAATCAAAAAGAACATCTCTTTGGAAAGATTCGATAT
SXTH10 CGGTACGCTTTGGTGCAGCAGCGCTCAGATACAGATGGAGGGCCCTTCTCAGATGTCACTTGATAAAATTTAGGT---TCCGGATTTTCAGTCAAGAAATGATATTTATTCGAAGGTTTCGATAT
SXTH11 CGGTACCTTTGGTGCAGCAGCGCTCAGATACAGATGGTGGGCGCCTTCTCAGATGTCACTTGATAAAATTTAGGT---TCCGGATTTTCAGTCAAGAAATGATATTTATTCGAAGGTTTCGATAT
SXTH6 GAAACCTTTGGGGTCTCAACA---TCATCTTTGGACCAAGTACC---TAACTATATGGCTTGATAAAATTCAGGAGGAGTGGTTTTAAATCTTAAGAAATTAATCGTCCGGTTATTTGGGAG
SXTH5 GCCATCTCTTTGGTGCAGGAAATATCTTCAATGCTACAGATGATACAGCCTCAACTTCACTCAACCAAAACAGGT---TCCGGATTCAGTCTTCTGACCTTTACCAACATGGTTTCTTCAGTGC
SXTH8 ATGGTCATTCAGATGGAARAATCAG---TTCATATTTCTCTAGATGAAGAACAGGA---GCTGGATTTGTGCACAGACTTGTACTTCAATGGCTTATTCAGTGC
Consensus a..t.actTggggtgat...c.....taa..tact.aA.gg.ggta.c....tt.ctcTtctCT.GATaaAa.ttCaGG...tctGGATTTca.TC.aaaa..a.TAet.tttGG...tTeggtat

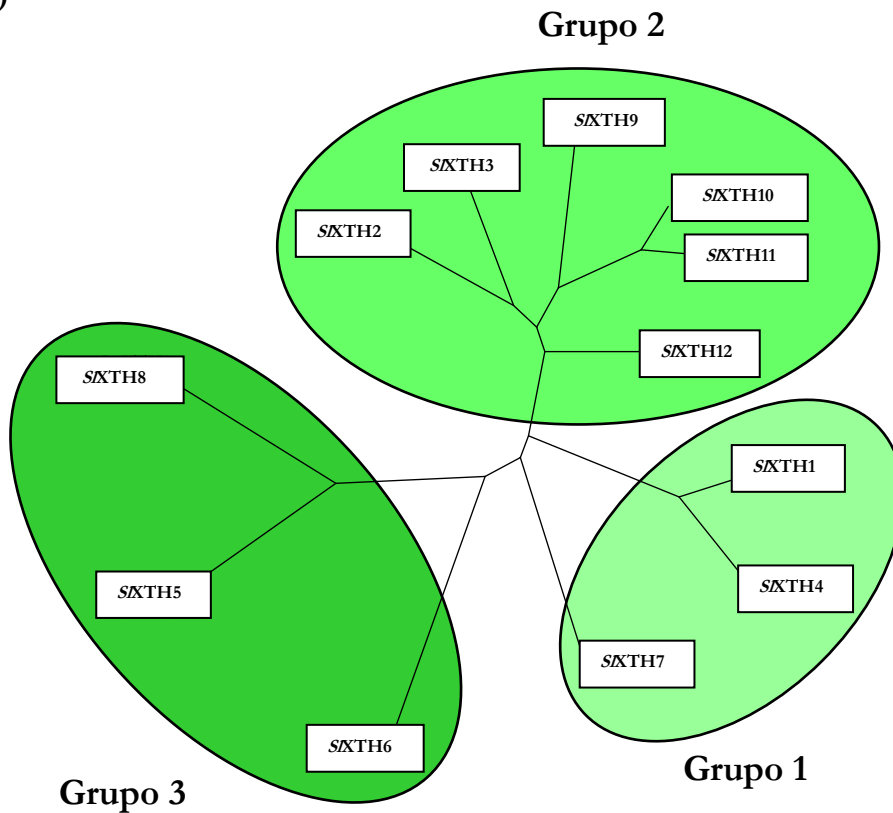
261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390

SXTH1 GAAATGAGGCTGTGTGGTGGAGACTCAGCTGGTGTGTCACTGCAATTTACCTGTCATCG---AATAA-TGCAGAG---CACGATGAGATGATTTTGAATTTTGGGACAGAACTGGGACGCCA
SXTH4 GAAATGAGGCTGTGTGGAGGAGATTCGCTGGTGTGTCACTGCTTTTATTTATCATCG---ACTAA-TGCTGAA---CACGATGAGATGATTTTCGAATTCCTCGGAAATAGAACCGGTACGCCA
SXTH7 GAAATGAGGCTGTGTGGAGGAGATTCGCTGGTGTGTCACTGCTTTTATTTATCATCG---ACTAA-TGCTGAA---CACGATGAGATGATTTTCGAATTCCTCGGAAATAGAACCGGTACGCCA
SXTH2 GAAATGAGGCTGTGTGGAGGAGATTCGCTGGTGTGTCACTGCTTTTATTTATCATCG---ACTAA-TGCTGAA---CACGATGAGATGATTTTCGAATTCCTCGGAAATAGAACCGGTACGCCA
SXTH3 GAAATGAGGCTGTGTGGAGGAGATTCGCTGGTGTGTCACTGCTTTTATTTATCATCG---ACTAA-TGCTGAA---CACGATGAGATGATTTTCGAATTCCTCGGAAATAGAACCGGTACGCCA
SXTH12 GAAATGAGGCTGTGTGGAGGAGATTCGCTGGTGTGTCACTGCTTTTATTTATCATCG---ACTAA-TGCTGAA---CACGATGAGATGATTTTCGAATTCCTCGGAAATAGAACCGGTACGCCA
SXTH9 GAAATGAGGCTGTGTGGAGGAGATTCGCTGGTGTGTCACTGCTTTTATTTATCATCG---ACTAA-TGCTGAA---CACGATGAGATGATTTTCGAATTCCTCGGAAATAGAACCGGTACGCCA
SXTH10 GAAATGAGGCTGTGTGGAGGAGATTCGCTGGTGTGTCACTGCTTTTATTTATCATCG---ACTAA-TGCTGAA---CACGATGAGATGATTTTCGAATTCCTCGGAAATAGAACCGGTACGCCA
SXTH11 GAAATGAGGCTGTGTGGAGGAGATTCGCTGGTGTGTCACTGCTTTTATTTATCATCG---ACTAA-TGCTGAA---CACGATGAGATGATTTTCGAATTCCTCGGAAATAGAACCGGTACGCCA
SXTH6 GAAATGAGGCTGTGTGGAGGAGATTCGCTGGTGTGTCACTGCTTTTATTTATCATCG---ACTAA-TGCTGAA---CACGATGAGATGATTTTCGAATTCCTCGGAAATAGAACCGGTACGCCA
SXTH5 GAAATGAGGCTGTGTGGAGGAGATTCGCTGGTGTGTCACTGCTTTTATTTATCATCG---ACTAA-TGCTGAA---CACGATGAGATGATTTTCGAATTCCTCGGAAATAGAACCGGTACGCCA
SXTH8 GAAATGAGGCTGTGTGGAGGAGATTCGCTGGTGTGTCACTGCTTTTATTTATCATCG---ACTAA-TGCTGAA---CACGATGAGATGATTTTCGAATTCCTCGGAAATAGAACCGGTACGCCA
Consensus gaa.at.AAact.gt.cctGga.attCTGctGG.actgt.actgC.tttTactTgtC.tct....aag.....cag.a....CACGACGaaatGAtTtGaaTttTgGaaAt.taacagg..A.cC.

	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	
SXTH1	ACATATTGCAGACA	AAATGATTCACAGG	AGGAAAGGAAAC				AGAGACAGAGAA	TATATCTTTGGTTT	GTATCCAACAGGGG	TACCATTCTATT	CTGTCTTTGGAA	TACAT			
SXTH4	ACATATTGCAGACT	AAATGATTCACAGG	AGGAAAGGAAAC				AGAGACAGAGAA	TATATCTTTGGTTT	GTATCCAACAGGGG	TACCATTCTATT	CTGTCTTTGGAA	TACAT			
SXTH7	ACATATTGCAGACT	AAATGATTCACAGG	AGGAAAGGAAAC				AGAGACAGAGAA	TATATCTTTGGTTT	GTATCCAACAGGGG	TACCATTCTATT	CTGTCTTTGGAA	TACAT			
SXTH2	ACACTGTTCAACGA	AAATGATTCACAGG	AGGAAAGGAAAC				AGAGACAGAGAA	TATATCTTTGGTTT	GTATCCAACAGGGG	TACCATTCTATT	CTGTCTTTGGAA	TACAT			
SXTH3	ATACTCTTCATACA	AAATGATTCACAGG	AGGAAAGGAAAC				AGAGACAGAGAA	TATATCTTTGGTTT	GTATCCAACAGGGG	TACCATTCTATT	CTGTCTTTGGAA	TACAT			
SXTH12	ATACTCTTCATACA	AAATGATTCACAGG	AGGAAAGGAAAC				AGAGACAGAGAA	TATATCTTTGGTTT	GTATCCAACAGGGG	TACCATTCTATT	CTGTCTTTGGAA	TACAT			
SXTH9	ACACTATCCATACA	AAATGATTCACAGG	AGGAAAGGAAAC				AGAGACAGAGAA	TATATCTTTGGTTT	GTATCCAACAGGGG	TACCATTCTATT	CTGTCTTTGGAA	TACAT			
SXTH10	ACACGGTTCATACA	AAATGATTCACAGG	AGGAAAGGAAAC				AGAGACAGAGAA	TATATCTTTGGTTT	GTATCCAACAGGGG	TACCATTCTATT	CTGTCTTTGGAA	TACAT			
SXTH11	ACACGGTTCATACA	AAATGATTCACAGG	AGGAAAGGAAAC				AGAGACAGAGAA	TATATCTTTGGTTT	GTATCCAACAGGGG	TACCATTCTATT	CTGTCTTTGGAA	TACAT			
SXTH6	ATACTTTACAAACA	AAATGATTCACAGG	AGGAAAGGAAAC				AGAGACAGAGAA	TATATCTTTGGTTT	GTATCCAACAGGGG	TACCATTCTATT	CTGTCTTTGGAA	TACAT			
SXTH5	GGAGATTCAAACA	AAATGATTCACAGG	AGGAAAGGAAAC				AGAGACAGAGAA	TATATCTTTGGTTT	GTATCCAACAGGGG	TACCATTCTATT	CTGTCTTTGGAA	TACAT			
SXTH8	GGAGGATTCAAACA	AAATGATTCACAGG	AGGAAAGGAAAC				AGAGACAGAGAA	TATATCTTTGGTTT	GTATCCAACAGGGG	TACCATTCTATT	CTGTCTTTGGAA	TACAT			
Consensus	A..Act..T..CA..AC..AATgT..Tat..caciaaGGaAaaggaaAc.....						AgAGAcacaaaat.tt..atCT.tGGTTTgAtCCaaCtaa..ga..TtCAcag..TAt.tC..aTt..TtTG6aa..cc.c								
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	
SXTH1	ACCTCATTGTGATCT	TTGTGGACGACGTT	CCAAATAGAGC	ATTCAAATATCGAA			GATCTTGGTGTGAA	ATTCATTCAGCC	CATGAGATATAC	CTGAGCTATGGG	ACGCGAGTGAT	TG			
SXTH4	ACCAAAATGCGAT	TTTGTGGATGATG	TCCAAATAGAGT	TATCAAGATTCAAA			GACATAGGAGTGA	ATTCAGCC	CATGAGATATAC	CTGAGCTATGGG	ACGCGAGTGAT	TG			
SXTH7	ACCAAAATGCGAT	TTTGTGGATGATG	TCCAAATAGAGT	TATCAAGATTCAAA			GACATAGGAGTGA	ATTCAGCC	CATGAGATATAC	CTGAGCTATGGG	ACGCGAGTGAT	TG			
SXTH2	ACCAAAATGCGAT	TTTGTGGATGATG	TCCAAATAGAGT	TATCAAGATTCAAA			GACATAGGAGTGA	ATTCAGCC	CATGAGATATAC	CTGAGCTATGGG	ACGCGAGTGAT	TG			
SXTH3	AAAAATATCATAT	TTTGTAGATGGGAC	CCAAATAGAGC	ATCAAGATTCGAA			GAAGATGGAATCC	ATTCAGCC	CAATGAGATATAC	CTGAGCTATGGG	ACGCGAGTGAT	TG			
SXTH12	ACCATCATATTTT	GTGGACGGAACG	CCAAATAGAGT	ATCAAGATTCGAA			TCGATGGAGTTCA	TCCAAAGAAC	CAACCCATGAGG	ATATTCGAGT	CTTTGGAA	TGCTGATGAT	TG		
SXTH9	ACCATCATATTTT	GTGGACGGAACG	CCAAATAGAGT	ATCAAGATTCGAA			TCGATGGAGTTCA	TCCAAAGAAC	CAACCCATGAGG	ATATTCGAGT	CTTTGGAA	TGCTGATGAT	TG		
SXTH10	ACCATCATATTTT	GTGGACGGAACG	CCAAATAGAGT	ATCAAGATTCGAA			TCGATGGAGTTCA	TCCAAAGAAC	CAACCCATGAGG	ATATTCGAGT	CTTTGGAA	TGCTGATGAT	TG		
SXTH11	ACCATCATATTTT	GTGGACGGAACG	CCAAATAGAGT	ATCAAGATTCGAA			TCGATGGAGTTCA	TCCAAAGAAC	CAACCCATGAGG	ATATTCGAGT	CTTTGGAA	TGCTGATGAT	TG		
SXTH6	ATGAGATCATAT	TTTGTGATGATG	TCCAAATAGAGT	ATCAAGATTCGAA			AAATGATGCAAC	ATTCACAGAGC		CTATGATGCT	ATGGTTC	AAATTTGGGATG	CATCATCTTG		
SXTH5	AAACATCATAT	TTTATATAGATG	TCCAAATAGAGT	ATCAAGATTCGAA			GCAATGGGAGG	ATTCACAGAGC		CTATGATGCT	ATGGTTC	AAATTTGGGATG	CATCATCTTG		
SXTH8	CCCATCATCTTT	TATGATGATG	TCCAAATAGAGT	ATCAAGATTCGAA			GCAATGGGAGG	ATTCACAGAGC		CTATGATGCT	ATGGTTC	AAATTTGGGATG	CATCATCTTG		
Consensus	A..cacATcaTatTtTtGtGatgat.at.CCAAtTAGg..attCaa..Aa..a.gaa						..caatGgtgt..caTtCcaaa..Aa..Ca..CaATGag..TaTActc.ag..TaTG6aAtGtGatgatTG								
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	
SXTH1	AGCACAGAGG	TGGCTTGGAA	AACCAATGGGCC	ACGCCCATTAC	CCGCGTACAC	ATCATCGTTC	ACGTTGGATGG	ATGAGG	CTGCCACGCC	CAAA--G	AGTCCAA	GTGTAA--	CACT		
SXTH4	AGCTACAGAG	GAGGTTAGAGAA	AACTAATGGTCT	GGGCCGCCATT	CATCGCTT	CTATACCT	CATTCACAT	TGATGGAT	GTGAGGCT	GTACAC	CAAA--G	AGGTACAA	GTGTAA--	CACT	
SXTH7	AGCTACAGAG	GAGGTTAGAGAA	AACTAATGGTCT	GGGCCGCCATT	CATCGCTT	CTATACCT	CATTCACAT	TGATGGAT	GTGAGGCT	GTACAC	CAAA--G	AGGTACAA	GTGTAA--	CACT	
SXTH2	AGCACAGAG	GAGGCTTGTAGG	AACTAATGGTCT	GGGCCGCCATT	CATCGCTT	CTATACCT	CATTCACAT	TGATGGAT	GTGAGGCT	GTACAC	CAAA--G	AGGTACAA	GTGTAA--	CACT	
SXTH3	AGCACAGAG	GAGGCTTGTAGG	AACTAATGGTCT	GGGCCGCCATT	CATCGCTT	CTATACCT	CATTCACAT	TGATGGAT	GTGAGGCT	GTACAC	CAAA--G	AGGTACAA	GTGTAA--	CACT	
SXTH12	AGCACAGAG	GAGGCTTGTAGG	AACTAATGGTCT	GGGCCGCCATT	CATCGCTT	CTATACCT	CATTCACAT	TGATGGAT	GTGAGGCT	GTACAC	CAAA--G	AGGTACAA	GTGTAA--	CACT	
SXTH9	AGCACAGAG	GAGGCTTGTAGG	AACTAATGGTCT	GGGCCGCCATT	CATCGCTT	CTATACCT	CATTCACAT	TGATGGAT	GTGAGGCT	GTACAC	CAAA--G	AGGTACAA	GTGTAA--	CACT	
SXTH10	AGCACAGAG	GAGGCTTGTAGG	AACTAATGGTCT	GGGCCGCCATT	CATCGCTT	CTATACCT	CATTCACAT	TGATGGAT	GTGAGGCT	GTACAC	CAAA--G	AGGTACAA	GTGTAA--	CACT	
SXTH11	AGCACAGAG	GAGGCTTGTAGG	AACTAATGGTCT	GGGCCGCCATT	CATCGCTT	CTATACCT	CATTCACAT	TGATGGAT	GTGAGGCT	GTACAC	CAAA--G	AGGTACAA	GTGTAA--	CACT	
SXTH6	AGCACAGAG	GAGGCTTGTAGG	AACTAATGGTCT	GGGCCGCCATT	CATCGCTT	CTATACCT	CATTCACAT	TGATGGAT	GTGAGGCT	GTACAC	CAAA--G	AGGTACAA	GTGTAA--	CACT	
SXTH5	AGCTACT	CCAGGTTGAA	AACTAATGGTCT	GGGCCGCCATT	CATCGCTT	CTATACCT	CATTCACAT	TGATGGAT	GTGAGGCT	GTACAC	CAAA--G	AGGTACAA	GTGTAA--	CACT	
SXTH8	AGCTACT	CCAGGTTGAA	AACTAATGGTCT	GGGCCGCCATT	CATCGCTT	CTATACCT	CATTCACAT	TGATGGAT	GTGAGGCT	GTACAC	CAAA--G	AGGTACAA	GTGTAA--	CACT	
Consensus	gCtACaa..aGgaGG..c.agt..AAaac.gATTgg....a.gc.CC..TtLat..Gctta..TaaAg..aat.ttc..ac.t...atggatgtg.....c...ca.aa														

A continuación, se realizó un estudio filogenético definiéndose los filogramas que se muestran en la **Fig. IV.18**, obtenidos mediante Clustal W de la página de EMBL-EBI: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. En la **Fig. IV.18.A** se muestran los tres grupos consistentes en los que se agrupan la familia de la SXTHs. Haciendo uso del genoma de *Arabidopsis thaliana* L. se identificaron los cuatro grupos que se han descrito en la familia de las XTHs.

A)



B)

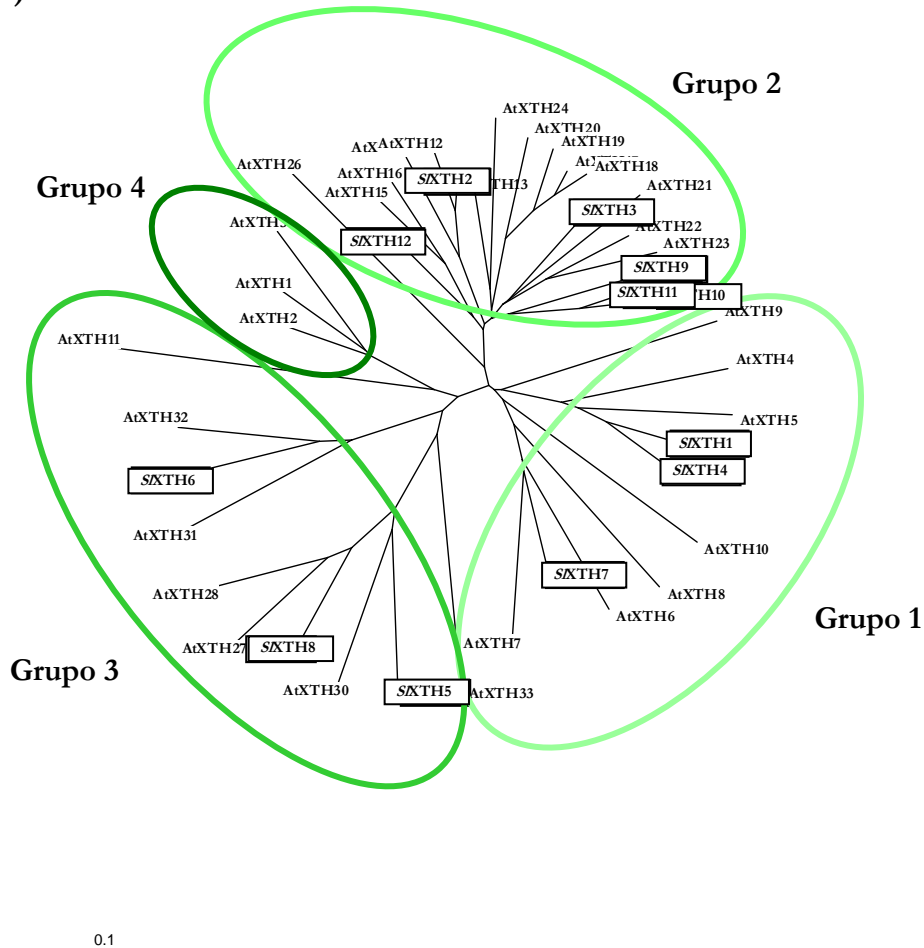


Fig. IV.18 Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de la familia de las XTHs. **A)** Filograma de las secuencias nucleotídicas pertenecientes a los genes de la familia de *SXTHs* de tomate estudiados. **B)** Filograma de las secuencias nucleotídicas pertenecientes a los genes de la familia de XTH de tomate (dentro de cajas) y *Arabidopsis* estudiados. Se determinan los grupos filogenéticos en los que se divide la familia XTH, identificados en las distintas especies vegetales.

Los resultados de los dos análisis filogenéticos comparativos (Clustal W: clustalw.genome.jp y www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi), el primero comparando la secuencia nucleotídica del gen *SXTH1* frente a las

XTHs descritas en *Arabidopsis*, judía y tomate, y el segundo comparando análogamente las secuencias aminoacídicas inferidas, permitieron posicionar a nuestro gen dentro del Grupo 1. Este gen se localizó muy próximo a los genes *NtXTH1* de tabaco, *SXTH4* de tomate, *AtXTH5* y *AtXTH4* de *Arabidopsis*, *VaXTH1* y *VaXTH2* de *Vigna angularis* y *VrXTH1* de *Vigna radiata*, respectivamente, lo cual confirmó los resultados filogenéticos obtenidos por otros autores (Nakamura *et al.*, 2003; Saladie *et al.*, 2006; Van Sandt *et al.*, 2006).

Si analizamos la información de los genes que comparten una mayor homología con *SXTH1*, podemos destacar que con *NtXTH1* comparte una homología de un 88% en la secuencia nucleotídica y un 91% con la aminoacídica. La influencia de este gen fue estudiada en plantas de tabaco transgénicas que tuvieron disminuida la actividad XET, poniendo de manifiesto la importancia de esta isoenzima en la incorporación de nuevas cadenas de xiloglucano a la pared en crecimiento (Herbers *et al.*, 2001). Además, se ha estudiado el gen *AtXTH5* con el que comparte un 73% de homología con la secuencia nucleotídica y un 71% con la aminoacídica. Este gen se expresa principalmente en raíces de *Arabidopsis* (Akamatsu *et al.*, 1999), hecho que corroboran nuestros resultados de expresión génica de *SXTH1* por Real Time PCR cuantitativo en plántulas. El estudio de *AtXTH4*, con el que comparte un 91% de homología nucleotídica y un 69% de aminoacídica, mostró la expresión del gen en tejidos jóvenes y en desarrollo, además de aumentar su expresión por auxinas, contacto físico y oscuridad (Xu *et al.*, 1996; Akamatsu *et al.*, 1999). Por otro lado en judía, el estudio de *VaXTH1* y *VaXTH2* (Nakamura *et al.*, 2003), con las que comparte un 83% y 85% de homología nucleotídica y un 70% y 68% con la aminoacídica, localizó su expresión en las fibras floemáticas de los internodos en crecimiento, pero con una secuencia temporal que define el desarrollo de las mismas, complementado con la inducción diferencial que ejerce el ácido indolacético (IAA). Por último, compartió un 85% de homología nucleotídica y un 69% aminoacídica con *VrXTH1* de *Vigna radiata*, la cual se ha relacionado con las regiones de crecimiento en hipocótilos y con los tallos. El gen se expresa principalmente en la epidermis y en algunas capas celulares del

cortex, tejido que actúa limitando el crecimiento. Los brasinosteroides y las auxinas indujeron la expresión, mientras que el ácido abscísico la inhibió.

A continuación, se diseñaron cebadores que fueran capaces de amplificar exclusivamente cada secuencia y por lo tanto, se buscaron los cebadores exclusivos trabajando con las parejas de secuencias con mayor similitud, puesto que si se podía discriminar entre ellas mucho mejor lo harían con el resto que estaban más alejados filogenéticamente. Los cebadores se diseñaron intentando cumplir todas las recomendaciones establecidas para los estudios de expresión mediante PCR en tiempo real. Por lo tanto, se buscaron cebadores que amplificaran fragmentos de entre 150 - 200 pb para que la reacción de PCR en tiempo real fuera lineal y se pudieran establecer las correlaciones oportunas. Además, los cebadores se diseñaron con una longitud que oscila entre 20 y 30 pb, con una T_m similar de entre 59 °C - 60 °C y una proporción de CG \pm 50%. Se estudiaron las posibles amplificaciones con otras regiones del genoma de *Solanum lycopersicum* L. y con genomas de otros organismos, las dimerizaciones parciales con otros cebadores y la posibilidad de crear horquillas que los inactivaran. Los cebadores fueron suministrados por Proligo (Sigma Aldrich, Francia) como Easy® Oligos 100 μ M.

Para el estudio de todas las características mencionadas se usaron diversas herramientas que ofrecen las siguientes páginas de internet: Traducción a proteínas, alineamiento (blaster): <http://www.expasy.org/>; Formación de horquillas: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>; Genebank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>; Cálculo de las características de los oligonucleótidos: <http://proligo2.proligo.com/Calculation/calculation.html>; Comprobación de los oligos: <http://www.realtimeprimers.org/>; Cálculo del reverso complementario: <http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html> y <http://bioinformatics.org/sms/>. Información diversa sobre *Solanum lycopersicum* L. http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=tomato. Información sobre la XTH: <http://dna-9.int-med.uiowa.edu/realtime.htm#rt%20quant>.

Como resultado, en la **Tabla IV.5** se presentan todos los oligonucleótidos diseñados para cada una de las secuencias génicas estudiadas:

Tabla IV.5 Oligonucleótidos diseñados para las secuencias de los genes identificados de la familia *SXTHs*. En la tabla se muestra el nombre del cebador, donde la I corresponde al izquierdo y la D al derecho. La secuencia en dirección 5' > 3', el N° de pares de bases, el % de GC y la T_m de cada uno de ellos.

Cebador	Secuencia (5' > 3')	pb	%GC	T _m
RPL2_I	ATTACGATCCAGGGAGAGGTGC	23	57	60
RPL2_D	AGGCAACACGTTACCAACCATAAGAGTAG	29	45	60
XTH1_I	CTTGAGAAAACCAATTGGGCCAAC	24	46	60
XTH1_D	GAACCCAACGAAGTCTCCTATACTGTAATG	30	47	59
XTH2_I	CCTACTCTATTCITTTGGAATCCTCGAAAT	29	38	58
XTH2_D	GGGATTCTTGGAAGTTTGGGCAT	30	40	60
XTH3_I	CCATCACTTGGAATCCACAACGC	23	52	60
XTH3_D	GAAGTGGAATGCAAGCATTAGCAC	25	48	60
XTH4_I	GAGGGTTAGAGAAAATAATTGGTCTGGG	29	45	60
XTH4_D	AACCCATGAAGTTTCTATATTCAGGGCC	30	40	60
XTH5_I	CCCTAGTCITTTGTGATGAAAAAGATGTTGA	30	37	60
XTH5_D	CCAGTCTCITTTAAAATGTTGTTGCTCAACT	30	37	60
XTH6_I	GGTGC GCGGCCTACGAGAGT	21	67	62
XTH6_D	CTAACACTCAGGTGTGTGAGTATGGTCC	28	50	59
XTH7_I	GACCAGCAAATGTGTCCTCCAAC	23	52	60
XTH7_D	CCGGCCCTACATTCITGGTGGG	21	67	62
XTH8_I	TCCCAAGTGTGATATAGTCTGGATTCTG	29	45	60
XTH8_D	CCTCGGAGGCGATTAGCTTCCTTA	24	54	60
XTH9_I	CATGGGAATTCATTTCCCAAGAG	24	46	60
XTH9_D	CGCGTTGTTTGTGAACCGATAGACTTA	28	43	62
XTH10_I	ACCGCTGTGTCATATAGACGCCG	23	67	60
XTH10_D	ATCAGCGGAAACAGGGGATAGTAAGAC	27	48	60
XTH11_I	AAGTAGACGATGCAGCTGGAATTTCAA	27	41	60
XTH11_D	GCCCAAACAGGACATAGCAAGAGAAG	26	50	60
XTH12_I	CTTATCTTCTCAAGGACCCACTCATGATG	29	45	60
XTH12_D	CCAAATGATGGAGTAGGTGTGGAAGTTC	28	46	60

Aunque se diseñaron cebadores diferentes para *SXTH10* y *SXTH11* en la zona 3'UTR, no fue posible amplificar independientemente estas dos

secuencias parálogas que comparten más del 90% de similitud. Por lo tanto, se estudió la expresión de *SXTH10* a sabiendas que podría producirse una hibridación cruzada entre ambas e incluso efectos de competencia en la reacción de la PCR.

Expresión de las *SXTHs* mediante PCR cuantitativo en tiempo real en tomates maduros Money Maker y Canario

Del estudio molecular previo de la familia de las *SXTHs* se obtuvieron los cebadores que amplificaban específicamente cada uno de los genes descritos hasta el momento para tomate. Tras extraer el RNA y sintetizar el cDNA como se explicó en el Capítulo I, se procedió a realizar la PCR en tiempo real cuantitativa, con las 11 parejas de cebadores. Recordemos que la secuencia de *SXTH10* y *SXTH11* es tan similar que no se logró diseñar un cebador que garantizara una amplificación específica en ambos casos, puesto que con uno de ellos se amplifica cierto porcentaje del otro y viceversa. Por lo tanto se buscó con los cebadores descritos para *SXTH10* ambas expresiones de los genes.

En la **Fig. IV.19** se muestra la expresión de las *SXTHs* en los tomates maduros de la variedad Money Maker y Canario. Como podemos ver en la figura, se pueden cuantificar niveles de expresión de casi todas las *SXTHs* estudiadas, a excepción de *SXTH10*, en los frutos maduros de ambas líneas de tomate. Además, se observa un mismo patrón de expresión de las *SXTHs* en las dos variedades de tomate, aunque los niveles totales de las mismas son diferentes, puesto que son superiores las *XTHs* del Grupo 2, en la variedad Money Maker en comparación con la variedad Canario. Los genes que más se expresan son *SXTH3* y *SXTH9* pertenecientes al Grupo 2. En el Grupo 1, el gen *SXTH4* es el que muestra mayor expresión y en el Grupo 3, los genes *SXTH5* y *SXTH8*. Es destacable señalar que la expresión de *SXTH10* (*SXTH10* y *SXTH11*) es baja o nula, puesto que se producen fenómenos de hibridación cruzada, ya que no existen diferencias suficientes en la secuencia de

ambos genes que permitan diseñar cebadores que posibiliten analizar por separado la expresión de ambos.

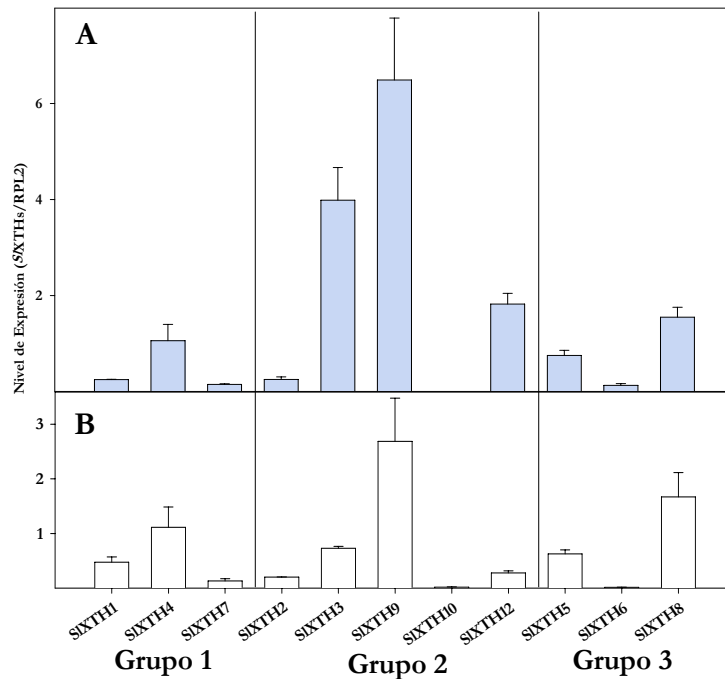


Fig. IV.19 Análisis de la expresión molecular de los genes de la familia de las *SXTHs* asociados por grupos filogenéticos. **A)** En tomate maduro Money Maker. **B)** En tomate maduro Canario. Los datos son la media \pm SE de dos experimento donde se usaron 12 tomates.

Evolución de la expresión de las *SXTHs* mediante PCR cuantitativo en tiempo real durante la infección en tomate Money Maker y Canario.
Análisis de la actividad xiloglucono endotransglucosilasa

Los resultados de la expresión de los genes de la familia *SXTHs* estudiados durante la infección de los frutos de tomate maduro silvestre de la variedad **Money Maker** se muestran en la **Fig. IV.20**.

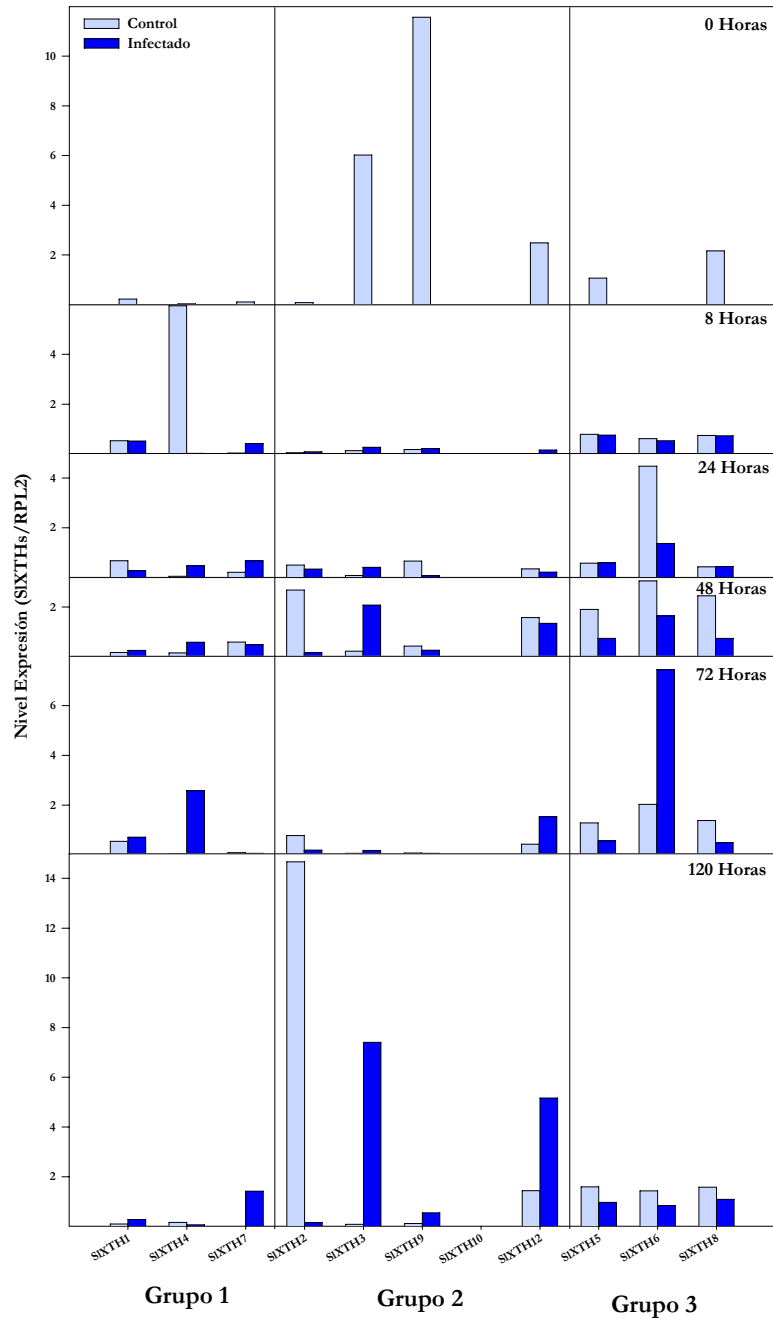


Fig. IV.20 Análisis de la expresión molecular de los genes de la familia de las *SIXTHs* de tomate Money Maker, agrupados por grupos filogenéticos, durante la infección fúngica de los frutos. Los datos son la media de tres réplicas de un experimento donde se usaron 12 tomates para cada uno de los tratamientos aplicados.

En esta gráfica se observa cómo la mayor expresión se produce en los genes del Grupo 3, donde se observó que la expresión en los frutos control fue superior a los infectados y se mantiene a medida que avanza la infección. En el Grupo 1 apenas se registraron variaciones con la infección y en el Grupo 2 se produce un aumento de la expresión de algunas isoenzimas en los frutos con una infección muy avanzada.

A continuación se estudió la actividad XET soluble total en estos frutos de tomate maduro silvestre de la variedad Money Maker, control e infectado (**Fig. IV.21**).

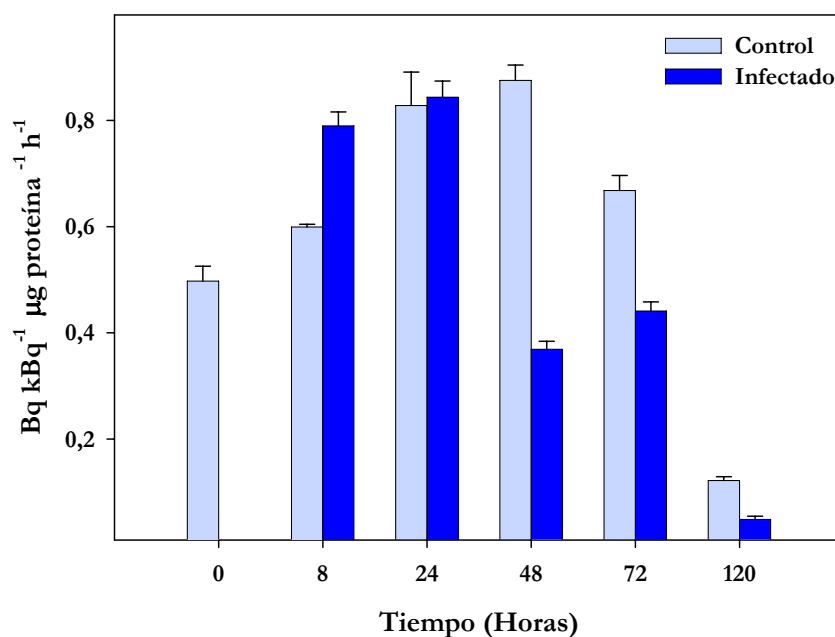


Fig. IV.21 Actividad XET soluble de frutos de tomate Money Maker, control e infectados. Los valores muestran la media \pm SE de los Bq por kBq por μg de proteína y por hora de dos experimentos independientes, usando 12 frutos para cada tratamiento.

Los resultados se muestran en la figura, donde se observa un pico de expresión a los dos días en los frutos control, que disminuye posteriormente hasta el final

del experimento a las 120 horas. Mientras que en los frutos infectados, la actividad XET disminuye desde el pico que se registró después de las 8 horas de infección, mostrando una reducción del 95% de la actividad a las 120 horas de infección. De modo que la XET de frutos infectados fue mayor o igual a los controles a las 8 y 24 horas, disminuyendo por debajo de estos en los sucesivos tratamientos de 48, 72 y 120 horas.

Los resultados de la expresión de los genes de la familia XTHs estudiados durante la infección de los frutos maduros de tomate de la variedad **Canario** se muestra en la **Fig. IV.22**. En esta gráfica se observa cómo, de modo general, a medida que avanza la infección, la expresión en los frutos control se mantiene, mientras que en los frutos infectados va disminuyendo, e incluso desaparece, la expresión de algunos genes de la familia de la XTH. Adicionalmente, se observa cómo la expresión de los frutos control fue superior a los frutos infectados en la mayoría de los genes y a medida que avanza la infección. Si analizamos los resultados por grupos filogenéticos, no obtenemos una respuesta claramente asociada a alguno de los tres grupos, ni temporal ni por el efecto del tratamiento.

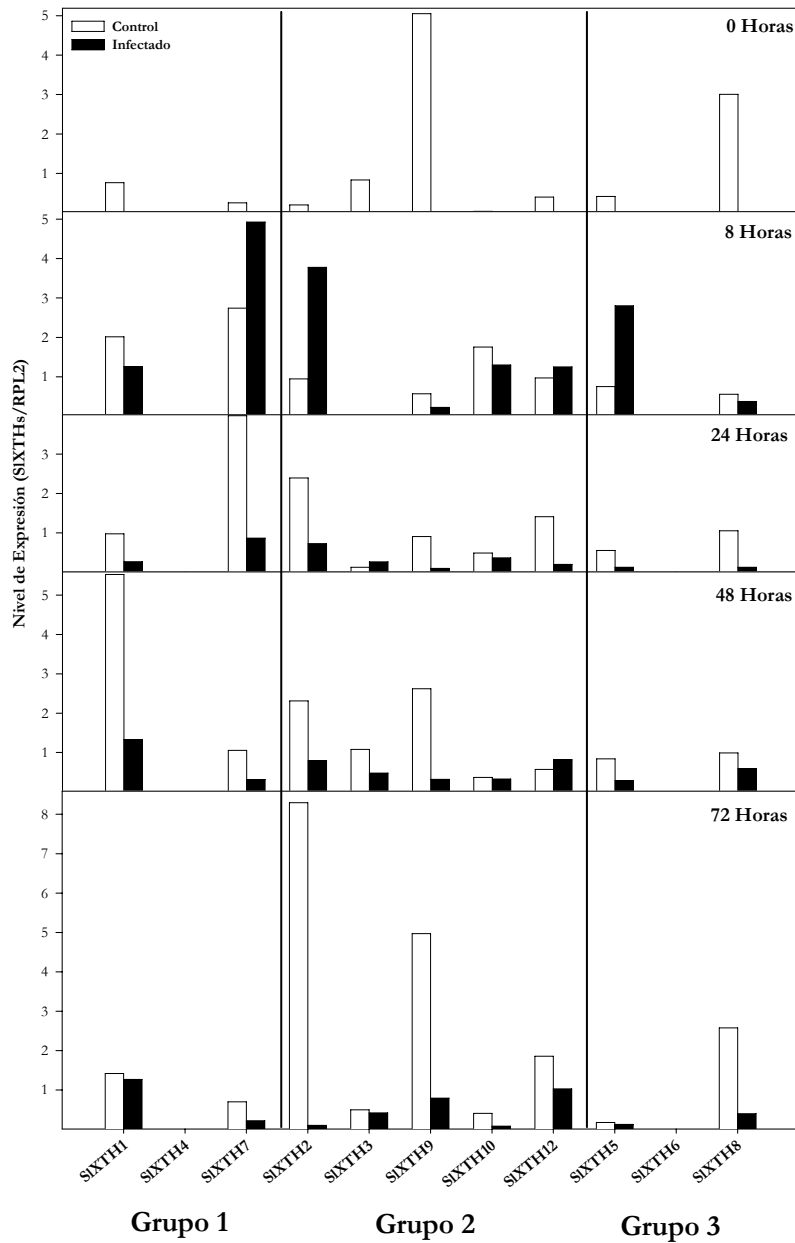


Fig. IV.22 Análisis de la expresión molecular de los genes de la familia de las *SIXTHs* de tomate Canario durante la infección fúngica de los frutos, asociados por grupos filogenéticos. Los datos son la media de tres réplicas de un experimento donde se usaron 12 tomates para cada uno de los tratamientos aplicados.

A continuación se estudió la actividad XET soluble total en estos frutos de tomate maduro de la variedad Canario, control e infectado. Los resultados se muestran en la **Fig. IV.23**, donde se corrobora el hecho de que a medida que avanza la infección se mantiene e incluso aumenta la actividad en los frutos control, mientras que disminuye la actividad XET en los frutos infectados, mostrando una reducción del 94% de la actividad a las 72 horas de infección.

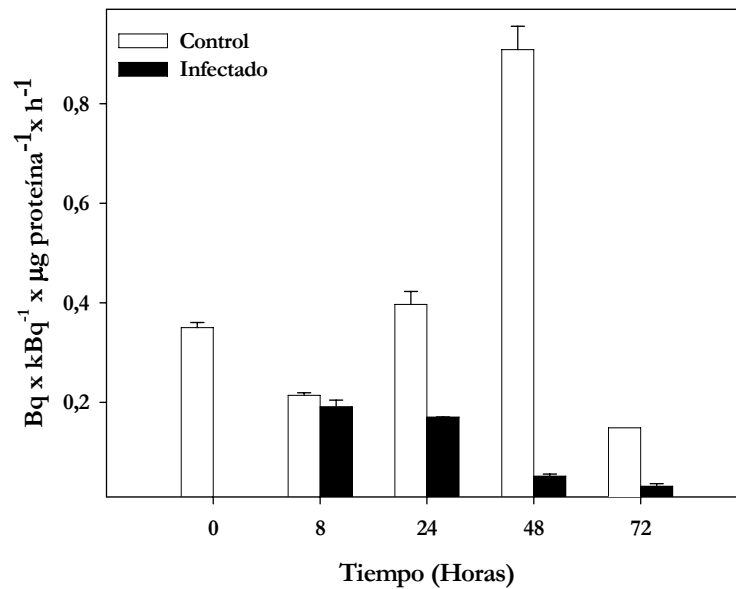


Fig. IV.23 Actividad XET soluble de frutos de tomate Canario control e infectados. Los valores muestran la media \pm SE de los Bq por kBq por μg de proteína y por hora de dos experimentos independientes, usando 12 frutos para cada tratamiento.

DISCUSIÓN

Como material vegetal se utilizaron **dos sistemas modelos** de frutos, la manzana, *Malus domestica* L. variedad Golden, y el tomate, *Solanum lycopersicum* L. variedad Canario y variedad Money Maker. La elección fue debida a su **especificidad de patógeno** fúngico, puesto que la manzana es el hospedador habitual de *Penicillium expansum* Link. A. Adicionalmente, se eligieron por su estructura y composición diferencial de la pared celular, puesto que la **estructura del xiloglucano** de manzana esta formada por oligosacáridos XXXG, mientras que la del tomate la forman XXGG (Vincken *et al.*, 1997).

La pared celular es una barrera natural contra las infecciones por patógenos, sin embargo cualquier pequeña herida puede permitir el comienzo de la infección donde se pone en marcha la maquinaria enzimática tanto de la planta como del hongo. Este avance produce una degradación de los elementos de la pared celular de modo concéntrico al punto de infección, y que ocasiona una desmembración casi total del tejido, como se mostró en las imágenes del progreso de infección (**Fig. IV.1** y **IV.13**).

Para el estudio de estas modificaciones de los componentes de la pared celular y de las enzimas que los metabolizan durante la infección por *Penicillium expansum* Link. A., se utilizaron frutos de manzana y de tomate de la variedad Canario, los cuales mostraron una disminución de la masa molecular media de las **pectinas** en ambos frutos infectados, indicando la depolimerización de las mismas. En frutos de manzana, los mayores cambios suceden en la fracción CDTA (28% disminución), mientras que las pectinas extraídas con Na₂CO₃, mostraron una disminución de la masa molecular menor (15%) (**Tabla IV.4**). Estos cambios pueden ser atribuidos a la acción de las **poligalacturonasas** o **pectin metil-esterasas**, ya que la actividad de estas enzimas aumenta durante la infección. En los frutos de tomate infectados, la disminución de la masa molecular media (**Tabla IV.4**) de las pectinas de la fracción CDTA fue

moderada (14%), mientras que la depolimerización de la fracción Na_2CO_3 fue mucho más acusada, pese a estar sobre-valorada debido a que el método matemático empleado para calcular la masa molecular media de azúcares no distingue entre fraccionados y no fraccionados en muestras con mucha depolimerización. En este fruto, tan solo la poligalacturonasa aumentó su actividad durante la infección, por lo tanto se le atribuyen los cambios ocasionados en la estructura de las pectinas (**Fig. IV.2 y IV.3**). La poligalacturonasa fúngica es la primera enzima secretada por los hongos (Jones *et al.*, 1972) y ha sido relacionada con la patogenicidad fúngica (Collmer y Keen, 1986). La inducción de esta enzima en los frutos infectados ha sido estudiada en varios trabajos, confirmando nuestros resultados (Yao *et al.*, 1999; Huang y Allen, 2000).

En resumen, durante la infección fúngica en ambos frutos, se produce la depolimerización de las pectinas de la pared celular, principalmente debido a la activación de las pectinasas que incrementan la porosidad de la pared celular, permitiendo la colonización fúngica. Los grados desiguales de depolimerización de las pectinas y la respuesta desigual de las actividades enzimáticas de los tomates y manzanas, pueden explicarse por un lado, por la composición diferencial de la pared celular, y por otro lado, como ya hemos mencionado, por la distinta especificidad de patógeno, puesto que el *Penicillium expansum* Link. A. tienen como hospedador habitual a la manzana.

Algunos autores habían sugerido la implicación directa de las **hemicelulosas** en varios procesos fisiológicos, entre los que se encuentra la respuesta frente a las infecciones de los frutos por patógenos fúngicos (Carpita y Gibeaut, 1993). Cuando estudiamos las modificaciones producidas en la estructura de las hemicelulosas de la pared celular de tomates y manzanas durante la infección fúngica por *Penicillium expansum* Link. A., encontramos que los polisacáridos hemicelulósicos y el xiloglucano sufren una solubilización en este proceso de infección, además de la reducción de la masa molecular de las hemicelulosas en los frutos infectados en comparación con los controles, reducción que fue particularmente importante en el xiloglucano (**Tabla IV.4**). Esta reducción fue

mucho más evidente en los frutos de manzana, lo que pone de manifiesto la importancia de la especificidad de hospedador. La depolimerización del xiloglucano durante la infección se ve acompañada por un aumento en la actividad metabólica de las enzimas que degradan este polisacárido, como por ejemplo, la **β -glucanasa (Fig. IV.5)**. En los frutos control, el origen de esta enzima es obviamente de la planta, mientras que en los frutos infectados el origen de la enzima pudo ser de ambos sistemas, pero la actividad registrada en los frutos autoclavados e infectados es únicamente de origen fúngico. Por lo tanto, los resultados (**Fig. IV.6**) indican que la actividad β -glucanasa es mayoritariamente del hongo. La actividad β -glucanasa registrada en frutos de manzana infectados fue mucho mayor a la encontrada en tomate, lo que puede explicarse por la estructura diferencial del xiloglucano de ambas especies, oligosacáridos XXXG en manzana y XXGG en tomate (Vincken *et al.*, 1997). Y por otro lado, como ya hemos comentado, la mayor especificidad del hospedador fúngico (*Penicillium expansum* Link. A.) por la manzana.

Los resultados obtenidos en el Capítulo III confirmaron la implicación de la XET en el mantenimiento de la integridad de la pared durante la maduración. Mientras que el análisis de la **XET** durante el proceso de infección, mostró una disminución a lo largo del mismo en los frutos de manzana (74,8%) y tomate (85,5%) (**Fig. IV.7**). Una posible explicación de esta disminución de la actividad XET, fue que hubiera una degradación proteolítica por enzimas endógenos o la existencia de inhibidores de la actividad enzimática, de modo similar a lo que ocurre con la poligalacturonasa (Collmer y Keen, 1986; Hahn *et al.*, 1989) o las xilanasas (McLauchlan *et al.*, 1999). Para analizar esta hipótesis, analizamos la actividad enzimática de una mezcla de dos extractos proteicos extraídos de manzana y tomate infectados y a un extracto proteico de una mezcla de manzana y tomate infectado (**Tabla IV.2**). Los resultados de estos dos ensayos sugieren que el descenso de la actividad XET en los frutos infectados no fue consecuencia de un inhibidor. De modo que la reducción de la actividad, podría provocarla específicamente el hongo.

Aparentemente, durante la infección y, en el contexto de la interacción planta-patógeno, se produce una menor endotransglucosilación del xiloglucano, que junto con el incremento de las endoglucanasas, facilitaría la colonización del patógeno fúngico de la pared celular. Es posible que el incremento de las actividades β -glucanasas fúngicas durante la infección, aumenten la hidrólisis del xiloglucano de la pared, lo que ocasionaría un incremento de la concentración de moléculas de xiloglucano soluble, que serían aprovechadas como moléculas donadoras por la actividad XET, y en consecuencia podría integrar xiloglucano en la pared celular y reforzarla. Sin embargo, si es inhibida la actividad XET durante la infección, este posible papel re-estructurador no sería posible y la degradación hemicelulósica continuaría, permitiendo el avance de la infección fúngica. En cualquier caso, estos resultados subrayan la idea de que la composición de la pared celular (pectinas y hemicelulosas), junto con su estructura, juega un papel esencial en la resistencia frente a la infección.

Respecto al mecanismo de cómo el hongo es capaz de disminuir la actividad XET, podemos apuntar a un posible mecanismo de infección donde el hongo ejercería una regulación transcripcional de los mRNAs de la enzima por algunos de los metabolitos presentes en el proceso.

Los únicos datos encontrados en la bibliografía que relacionan la *SXTH1* con la infección son los encontrados en la infección del tomate por un parásito fanerógamo (*Cuscuta reflexa* L.). Pese a que no es comparable el sistema de parásito-hospedador ni el proceso fisiológico sobre el que actúa, en este caso, se indujo el mRNA de *SXTH1* durante la infección en el lugar donde se produjo la misma de forma rápida (6 - 24 horas) y la actividad XET de toda la planta de tomate (Albert *et al.*, 2004). Estos resultados, con sus limitaciones, subrayan la importancia de la posible modulación génica y/o enzimática de la familia de las XTHs por los patógenos.

Para estudiar la evolución de la actividad XET soluble durante la infección de estos frutos de tomate Money Maker silvestres y transgénicos (**Fig. IV.15** y **IV.16**), se analizaron las diferencias que se producen en una infección rápida, ocasionada por una concentración muy elevada de esporas fúngicas y en una

infección más lenta, usando una concentración 4000 veces menor. En todas ellas los frutos infectados mostraron una disminución de la XET, que además menguó con el avance del tiempo, tanto en frutos controles como infectados. Sin embargo, en los frutos que tienen aumentada la expresión de la *SXTH1*, la disminución de la actividad XET durante el progreso de la infección fue más acusada que la registrada en los frutos silvestres, indicando probablemente que el gen *SXTH1* esté inhibido por la infección fúngica.

En Capítulos anteriores, determinamos que el aumento de la actividad XET modificaba la pared celular, haciendo el fruto más duro. Para estudiar la implicación directa de la XET durante la infección de frutos, analizamos la **infección diferencial** de los frutos de tomate Money Maker silvestres y transgénicos, encontrando que en los frutos con mayor expresión del gen *SXTH1*, parece ralentizarse el progreso de la infección en los tejidos internos (**Fig. IV.14**). De modo que, la disminución rápida de la XET durante la infección, por un posible mecanismo del hongo, ocasiona cambios en la pared celular que propician el avance de la infección.

Con todo ello, quisimos determinar qué isoenzima o isoenzimas tenían mermada su codificación a proteínas, puesto que, a parte del gen *SXTH1*, otros genes de la familia podrían verse afectados por la infección.

El estudio filogenético de las secuencias de las *SXTHs* (**Fig. IV.18**), identificó tres de los cuatro Grupos que se han descrito en la familia de XTHs. Estos Grupos se han asociado a procesos concretos del desarrollo vegetativo, como el crecimiento o la maduración. En nuestro caso, del gen *SXTH1* pertenece al Grupo 1, que nosotros hemos relacionado tanto con el crecimiento primario y secundario, como con la maduración de frutos. El estudio nos ha servido para poder analizar las modificaciones grupales de las isoenzimas durante la evolución de la infección fúngica. Además, **la expresión de las SXTHs** de las dos líneas de tomate maduro fue similar (**Fig. IV.19**), mostrando que este tejido cuenta con la expresión de casi todos los genes de la XTHs, donde el Grupo 2 parece ser el que mayor expresión tiene (*SXTH3* y *SXTH9*).

El estudio de la expresión de los genes *SXTHs* durante la infección de los frutos de tomate de la variedad Money Maker y Canario (**Fig. IV.20 y IV.22**), mostró, en ambas líneas, una disminución de la expresión generalizada en los frutos infectados durante el avance de la misma, hecho que es coherente con los resultados obtenidos en la cuantificación de la actividad XET total (**Fig. IV.21 y IV.23**). La actividad en los frutos infectados fue siempre menor a los controles a partir de las 24 horas, hecho que también sucede en la expresión génica, lo que indica una temporalidad de la regulación de la expresión génica y /o enzimática por el hongo. Por lo tanto, cabe pensar que no existe una especificidad de Grupo en el control de la expresión de las isoenzimas de la XTH durante la infección fúngica, lo que indica que no existe un único gen de la *SXTH* que se exprese ni una única actividad XET inhibida predominante en el proceso de infección. Así, la posible inhibición del hongo sobre los mRNA podría ser específica de la zona que codifica para el centro activo de la enzima, puesto que es la parte de la secuencia más conservada.

Es importante anotar, que el tomate no es el hospedador habitual del *Penicillium expansum* Link. A. y que por lo tanto, las dos variedades de tomate podrían mostrar una especificidad diferencial frente a la infección, provocando respuestas justificadamente desiguales frente a la infección fúngica.



CAPÍTULO V

Implicación del etileno en la
regulación de la actividad xiloglucano
endotransglucosilasa en frutos

INTRODUCCIÓN

El tomate es un fruto climatérico que durante su maduración, se caracteriza por un aumento elevado de la respiración y la síntesis de **etileno**, hormona que regula la **maduración de los frutos** (Lelievre *et al.*, 1997). Se ha descrito una posible relación del etileno con el control de los cambios en textura (ablandamiento) del fruto durante la maduración (Alexander y Grierson, 2002), mediante la regulación de la expresión génica de diversos enzimas que intervienen en la misma, como pectin metil-esterasas, poligalacturonasas, glucanasas (Giovannoni, 2004). Respecto a la posible regulación de las XTHs por etileno durante la maduración de los frutos, existen escasas evidencias. Por un lado, se ha descrito la relación de la expresión de los genes de XTHs con la maduración, por el etileno endógeno, ya que se encontró un aumento de 6 mRNA correspondientes a 6 *AdXTHs* en frutos de kiwi (Schroder *et al.*, 1998). Por otro lado, otros autores describieron que tras la aplicación de etileno exógeno para inducir la maduración en frutos de kiwi se indujo un marcado aumento de la actividad XET (Redgwell y Fry, 1993). Sin embargo, en ninguno de los casos anteriores se estudió la relación directa entre la expresión génica y la actividad XET regulada por etileno en frutos. Por ello se desconoce cómo el etileno podría regular la expresión de los genes XTH implicados en el metabolismo de la pared durante la maduración de los frutos climatéricos.

A parte de la relación del etileno con la maduración, existen otros procesos fisiológicos donde se ha estudiado la posible implicación del etileno en la regulación de la XTHs. Así, se ha sugerido su implicación en respuesta a los **procesos de estreses** en general, como por ejemplo, el estrés térmico, estrés mecánico o estrés biótico (Xu *et al.*, 1995). De hecho, el incremento de la producción de etileno es uno de los primeros síntomas detectables tras la infección fúngica (Lund *et al.*, 1998).

Se ha sugerido que el etileno, en respuesta a los distintos estreses bióticos y abióticos, puede influir de modo diferente en diversos procesos fisiológicos, mediante la implicación de la actividad XET. En relación con el etileno y los estreses abióticos, se observó que en condiciones de encharcamiento, el etileno aumentaba la expresión de una XTH (*mus1005*), enzima que actuaba sobre el xiloglucano, permitiendo la formación del aerénquima necesario para la supervivencia de las mismas (Saab y Sachs, 1996). Sin embargo, el estudio del gen *SXTH2*, perteneciente al Grupo 2 de la familia multigénica de la XTH en hipocótilos de tomate, puso de manifiesto la independencia de la aplicación del etileno (Catalá *et al.*, 2001). Estos trabajos apuntaron a la existencia de dos mecanismos diferentes para inducir a los genes XTHs, uno dependiente y el otro independiente de etileno. Otros estudios más recientes, muestran la inducción de la expresión del gen *CaXTH3* de guindilla, en plantas de *Arabidopsis*, en respuesta a los estreses abióticos y por la aplicación de etileno exógeno (Cho *et al.*, 2006). Sin embargo, no existen referencias sobre el efecto que podría tener el etileno sobre la expresión de los genes de las *SXTHs* en estreses bióticos.

Por todo ello, el objetivo de este capítulo fue el estudiar el papel del etileno en la regulación de la expresión génica de las *SXTHs* y en la actividad XET en frutos de tomate maduros, mediante el tratamiento de dos variedades de tomate con etileno exógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El trabajo experimental se llevó a cabo con frutos de tomate *Solanum lycopersicum* L. de la variedad Money Maker y de la variedad Canario, adquirido en el mercado local.

Medida de etileno durante la maduración y la post-cosecha de los frutos de tomate de la variedad Money Maker por cromatografía de gases

Se recogieron frutos de tomate silvestre de la variedad Money Maker de los distintos estadios de maduración según la clasificación establecida en el Capítulo III. Además, se recogieron frutos de tomate maduros que se mantuvieron en bancada a temperatura ambiente durante un día y a continuación se les midió la evolución del etileno post-cosecha. A todos ellos se les cuantificó el peso y su volumen. Se depositaron dentro de recipientes de cristal herméticos con un septum de goma y se mantuvieron cerrados durante 1 hora. Pasado este periodo se extrajo 1 ml del gas existente en el espacio de cabeza y se inyectó en el cromatógrafo de gases (Shimadzu GC-14A con integrador C-R5A Chromatopac) con detector de ionización de llama (FID) y columna de Alumina F1, 80/100 de 1,8 m x 6 x 2 mm. Se usó helio como gas transportador inerte (35 ml min^{-1}) y oxígeno e hidrógeno para el FID. Las condiciones térmicas de la determinación fueron de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura en la columna, $150 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura en el inyector y $160 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura en el detector. Se utilizó un patrón de etileno de concentración conocida para cuantificar el etileno producido en el espacio de cabeza.

Medida del etileno durante la infección de frutos de tomate de la variedad Money Maker y de la variedad Canario

Los frutos de tomate maduros de la variedad Money Maker se mantuvieron 4 días en bancada, y transcurrido este tiempo se les midió el etileno basal, lo cual permitió clasificarlos adecuadamente, eliminando los que no se ajustaban a una producción normalizada. Se dividieron en dos grupos, uno control que se pinchó con $10 \text{ } \mu\text{l}$ de agua estéril y otro grupo que se infectó con $10 \text{ } \mu\text{l}$ de una solución de 2×10^6 esporas ml^{-1} . En ambos casos, los $10 \text{ } \mu\text{l}$ se pincharon en cada uno de los 4 puntos equidistantes en el diámetro ecuatorial del fruto, a una profundidad de $0,5 \text{ cm}$. Se cuantificó la producción de etileno a lo largo de cuatro días usando la cromatografía de gases, del mismo modo que se ha

explicado en el apartado anterior. Transcurrido este periodo se evaluó la infección externa e interna de los frutos control e infectados.

Los frutos maduros de la variedad Canario se compraron en el mercado local y se mantuvieron durante 24 horas en bancada a temperatura ambiente. Posteriormente se evaluó el etileno basal, lo que permitió separarlos en dos grupos similares, y se procedió del mismo modo que con los frutos de la variedad Money Maker. Se cuantificó la producción de etileno a lo largo de cuatro días usando la cromatografía de gases.

Tratamiento de los frutos con etileno

Se pesaron y se midió el volumen de 8 frutos de tomates maduros para cada uno de los tratamientos de los tomates de la variedad Money Maker y de la variedad Canario. Cada grupo de 8 tomates fue colocado dentro de cada uno de los desecadores, que disponían de un septum en el espacio de cabeza, el cual permitió la introducción del etileno y la toma de muestras. Se cerraron herméticamente y se les inyectó 1 ml de una solución gaseosa que contenía etileno en helio, que al introducirlo en el desecador, proporcionaba una concentración final de 2 ppm, aproximadamente. Cada uno de los desecadores se mantuvo a temperatura ambiente durante 8, 24, 48, 72 y 120 horas según el tratamiento. A lo largo de estos periodos, se cuantificó la producción de etileno de los frutos mediante la extracción de un 1 ml del gas contenido en el espacio de cabeza del desecador mediante cromatografía de gases. Transcurrido este periodo se abrió el desecador y se determinó la firmeza de los frutos mediante el uso de un texturómetro, como se explicó en el Capítulo III. Posteriormente, se procedió a recoger el material del pericarpo de los tomates, el cual se congeló inmediatamente a -25 y/o -80°C para posteriores ensayos.

Actividad xiloglucano endotransglucosilasa soluble

Se ensayó la actividad XET soluble de las muestras anteriores con el extracto proteico del material perteneciente a los frutos control y tratados, obtenido

como se explicó en el Capítulo III. Con todos los extractos proteicos se ensayó la actividad XET soluble según se explicó en el Capítulo I.

Extracción de mRNA. Síntesis de cDNA. PCR cuantitativo en tiempo real

Las muestras de las dos variedades de tomate obtenidas de cada uno de los tratamientos de etileno fueron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se les aplicaron los protocolos moleculares como se indica en el Capítulo I, teniendo en cuenta las limitaciones en la extracción de mRNA de frutos indicadas en el Capítulo III.

RESULTADOS

Valoración del etileno durante el desarrollo de los frutos

La medida del etileno producido por los frutos, en cada uno de los estadios descritos, fue valorada mediante cromatografía de gases y los resultados se presentan en la **Fig. V.1**. La producción de etileno va aumentando progresivamente con el crecimiento y maduración de los frutos hasta el estadio naranja, donde se registró el pico de producción de etileno (alrededor de $12\text{ nl h}^{-1}\text{ g}^{-1}$), disminuyendo ligeramente la misma en el estadio maduro.

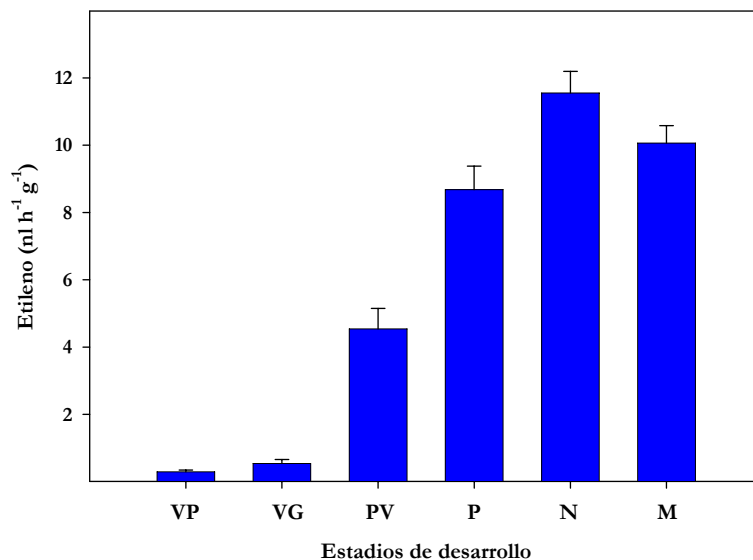


Fig. V.1 Producción de etileno de frutos de tomate Money Maker en los sucesivos estadios de crecimiento y maduración. El etileno se cuantificó usando un cromatógrafo de gases con columna de alumina F1 80/100 y detector de ionización de llama (FID). Los valores representados son la media \pm SE de, al menos, 25 frutos pertenecientes a 3 cosechas independientes, recolectados entre los años 2003-2005. **VP:** Verde Pequeño, **VG:** Verde Grande, **PV:** Pintón Verde, **P:** Pintón, **N:** Naranja, **M:** Maduro.

Evolución del etileno post-cosecha

La evolución del etileno post-cosecha producido por los frutos maduros una vez recolectados y mantenidos a temperatura ambiente, se muestra en la **Fig. V.2**. Las medidas se realizaron después de un día en la bancada para evitar la interferencia del daño ocasionado en la recolección. En la gráfica se observó una disminución muy acusada en los cuatro primeros días, disminuyendo alrededor de un 65%. Posteriormente, los valores caen paulatinamente hasta el octavo día (un 90%) y se mantuvieron hasta la duodécima jornada, donde se finalizó el experimento.

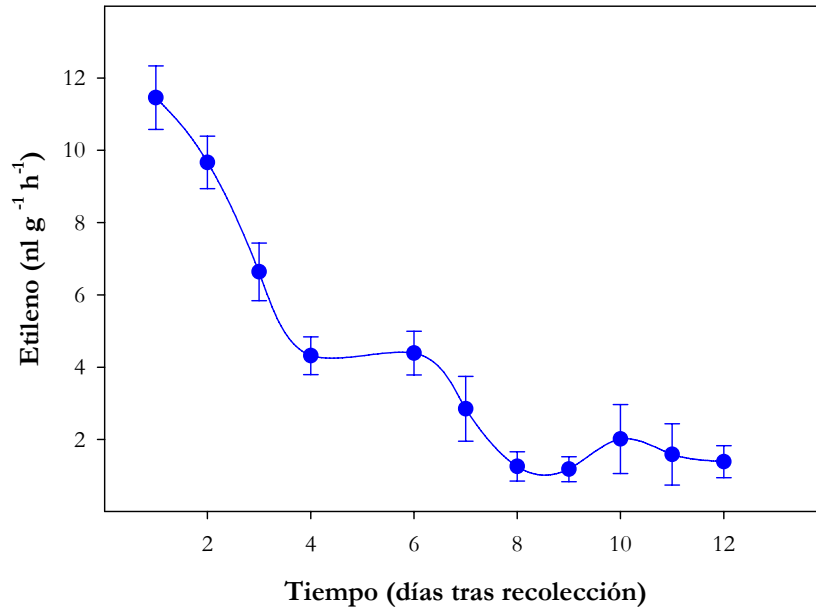


Fig. V.2 Evolución de la producción de etileno post-cosecha de los frutos de tomate Money Maker tras la recolección. El etileno se cuantificó usando un cromatógrafo de gases con columna de alumina F1 80/100 y detector de ionización de llama (FID). Los valores mostrados son la media \pm SE de al menos 50 frutos recolectados en 4 cosechas independientes entre los años 2003-2005.

Valoración del etileno en frutos de tomate de la variedad Money Maker y de la variedad Canario durante la infección fúngica

Se cuantificó la producción de etileno de los frutos de tomate maduros de la variedad Money Maker, control e infectados, a lo largo de los cuatro días siguientes a la infección (**Fig. V.4**). Al finalizar del experimento se evaluó el nivel de infección externo e interno de los frutos control e infectados.

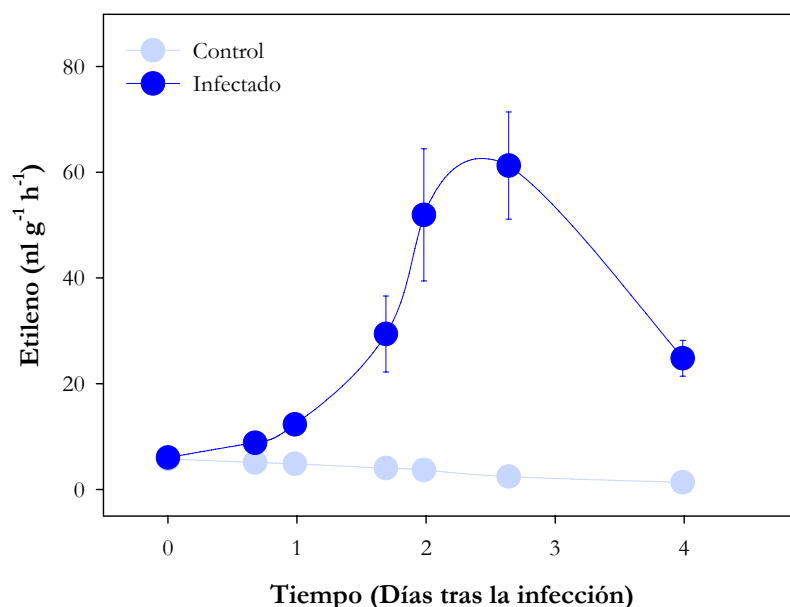


Fig. V.3 Evolución de la producción de etileno en los frutos infectados por *Penicillium expansum* Link. A. de tomates de la variedad Money Maker. Los frutos se mantuvieron a 25 °C y en oscuridad durante 4 días. Los valores muestran la media \pm SE de la producción de etileno durante la infección de tres experimentos independientes, usando 12 frutos para cada tratamiento.

Los resultados que se muestran en la **Fig. V.3**, presentan la evolución de la producción de etileno en los frutos control e infectados. La producción de etileno de los frutos control no se vio alterada por el pinchazo y disminuye ligeramente con el tiempo. Sin embargo, la cantidad de etileno de los frutos infectados, aumenta progresivamente hasta los 2,5 días de infección, donde se alcanzan niveles de 60 nl de etileno por gramo y hora. Pasado este momento, la producción desciende hasta que se terminó el experimento a los 4 días después de haberlos infectado, momento en el cual se cuantificó el nivel de infección externo e interno, obteniéndose resultados similares a los representados en la **Fig. IV.14**, del Capítulo anterior.

La evolución de los frutos de tomate de la variedad Canario control e infectados se muestra en la **Fig. V.4**.

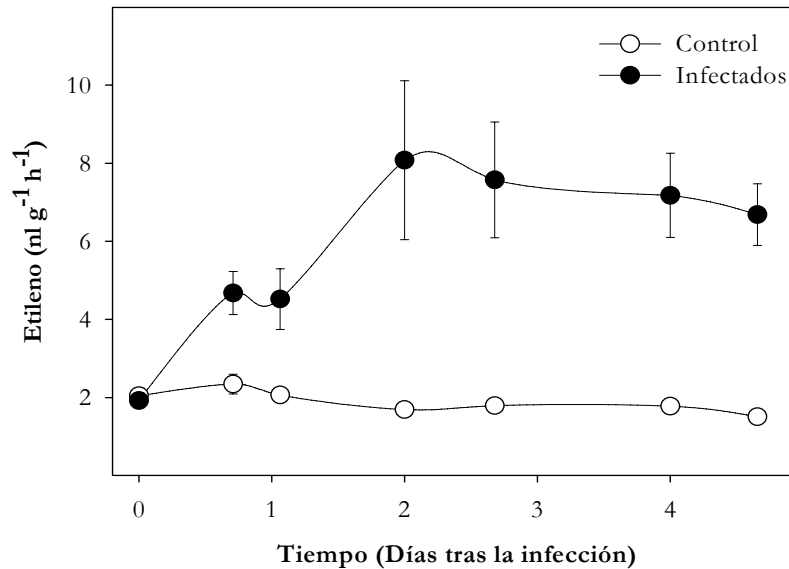


Fig. V.4 Evolución de la producción de etileno en los frutos de tomates de la variedad Canario infectados por *Penicillium expansum* Link. A. Los frutos se mantuvieron a 25 °C y en oscuridad durante 4 días. Los valores muestran la media \pm SE de la producción de etileno durante la infección de tres experimentos independientes, usando 12 frutos para cada tratamiento.

Como puede observarse, los frutos control no mostraron aumento de etileno tras la infección y la producción de etileno descendió ligeramente en el análisis. Sin embargo, los frutos infectados registraron un aumento del etileno que alcanzó el máximo de 8 $\text{nl g}^{-1} \text{h}^{-1}$ a los 2 días tras la infección fúngica, y disminuyó ligeramente hasta el final del experimento.

Tratamiento con etileno de frutos de tomate de la variedad Money Maker y Canario

Para analizar la influencia del etileno sobre la expresión de los genes *SXTHs*, la actividad XET y la firmeza de los frutos, se trataron los tomates maduros

durante tres periodos temporales de 6, 24, 48, 72 y 120 horas con etileno. Durante estos periodos se registró una evolución del gas dentro del recipiente que fue idéntica en ambas variedades y que se muestra en la **Fig. V.5**.

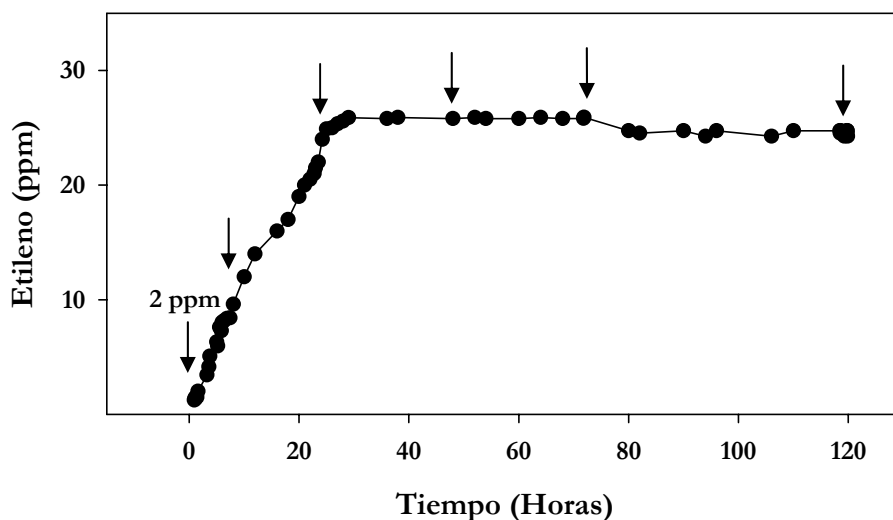


Fig. V.5 Evolución del etileno en los tratamientos aplicados a los frutos de tomate de la variedad Money Maker y Canario. Los tratamientos se realizaron en un recipiente hermético con un dispositivo de extracción de gases y la cuantificación del etileno del espacio de cabeza se llevó a cabo mediante cromatografía de gases. Las flechas indican los periodos de tiempo que se mantuvieron los frutos en etileno.

Como puede observarse, al inicio del ensayo se le añadió el etileno correspondiente para obtener unos niveles que rondaron las 2 ppm. La producción autocatalítica de los frutos de ambas variedades aumentó linealmente hasta valores de 26 ppm alcanzados alrededor de las 28 horas, a partir de ese momento la producción se detuvo, manteniéndose constantes los niveles de etileno dentro del recipiente hermético o desecador.

Firmeza de los frutos de tomate de la variedad Money Maker tratados con etileno

La evolución de la firmeza de los frutos de tomate maduros tratados con etileno, se analizó una vez finalizado el tratamiento con el gas y los resultados se muestran en la Fig. V.6.

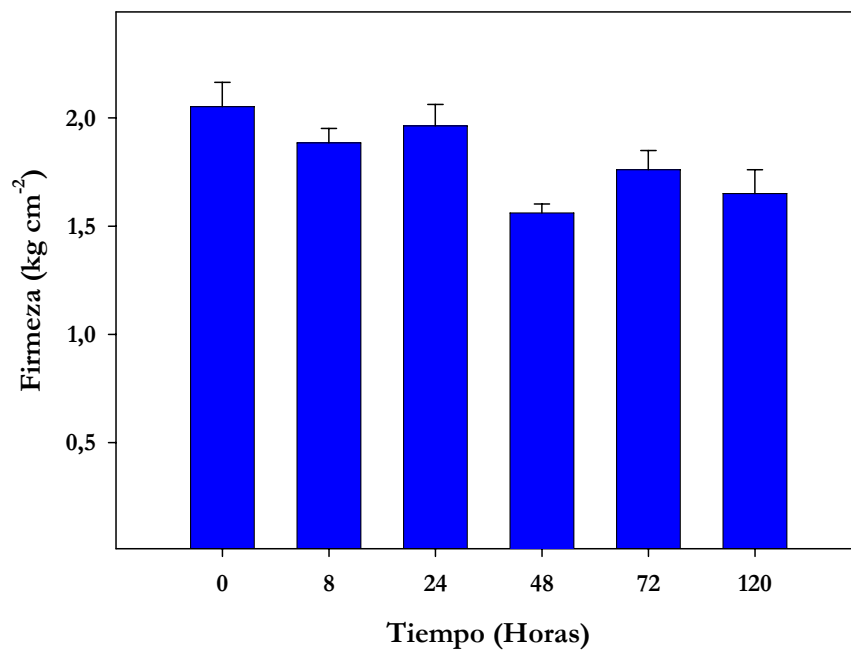


Fig. V.6 Firmeza de los frutos de tomate Money Maker tratados con etileno durante 8, 24, 48, 72 y 120 horas. Se analizó la firmeza en cuatro puntos equidistantes del diámetro ecuatorial de los frutos mediante un texturómetro. El resultado es la media \pm SE de dos experimentos independientes, utilizando 8 frutos en cada uno de los tratamientos.

Los resultados del análisis de firmeza de los frutos maduros tratados con etileno mostraron valores en torno a 1,9 kg cm⁻² y se mantuvieron constantes hasta las 24 horas de tratamiento. Pasado este periodo, a partir de las 48 horas de tratamiento, se produjo una disminución de la firmeza que se situó alrededor de valores de 1,6 kg cm⁻² y se mantuvo constante hasta las 120 horas de tratamiento con etileno.

Análisis de la expresión de las *SXTHs* mediante PCR cuantitativo en tiempo real y de la actividad xiloglucano endotransglucosilasa en frutos de tomate de la variedad Money Maker tratados con etileno

Los resultados de la expresión diferencial de las *SXTHs* estudiadas en respuesta al tratamiento por etileno en frutos de tomate maduros de la variedad Money Maker, se presentan en la **Fig. V.7**. En ella se observa, en primer lugar, como a tiempo inicial se expresan casi todas las isoenzimas estudiadas a excepción del *SXTH10* por sus hibridaciones conjuntas con *SXTH11*. Las isoenzimas que más se expresan son el *SXTH4* en el Grupo 1, los *SXTH3*, *SXTH9* y *SXTH12* en el Grupo 2 y el *SXTH5* y *SXTH8* en el Grupo 3. La respuesta más notable tras el tratamiento con el etileno se produjo en el Grupo 1, puesto que parece que la expresión de las *SXTHs* está activada por la hormona sobre todo a partir de las 48 horas. En el Grupo 2, la expresión de las *SXTHs* en los frutos tratados con etileno parece provocar un ligero aumento en todos los miembros, hasta las 48 horas. Seguidamente, en los tratamientos a largo plazo, se registraron respuestas desiguales en las isoenzimas en este grupo, a excepción de *SXTH9* cuya expresión fue mayor bajo el aporte de etileno en todos los periodos. En el Grupo 3, se observa cómo a 8 horas el etileno aumenta la expresión de las *XTHs* en todos sus miembros, pero a partir de este momento, sólo *SXTH8* mantendrá el aumento de su expresión con el etileno. Las otras dos isoenzimas del grupo (*SXTH5* y *SXTH6*) disminuyeron su expresión con el tratamiento de etileno en los tratamientos a 24, 48 y 72 horas, para volver a inducirse a 120 horas.

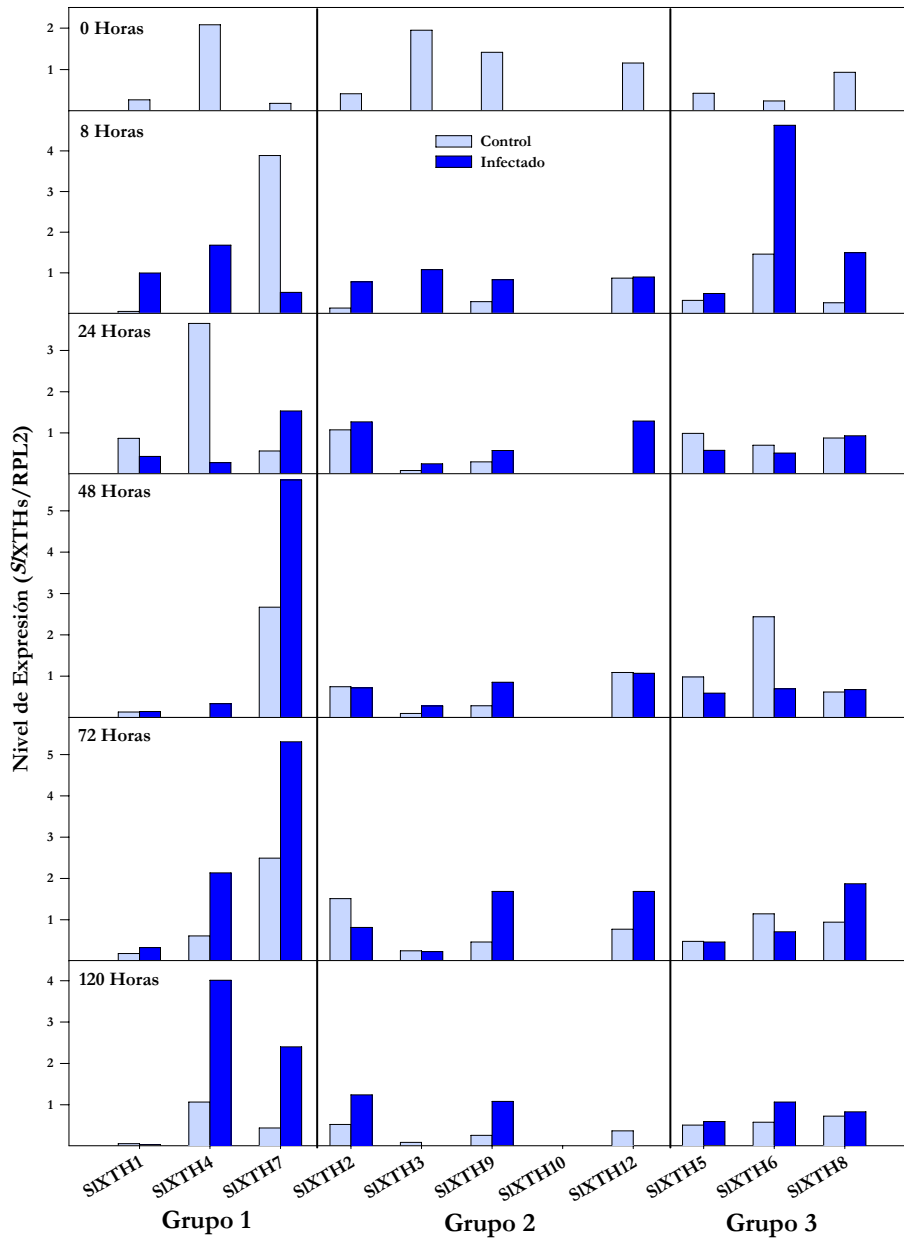


Fig. V.7 Expresión de los genes *SIXTH1-SIXTH12* frente al control interno (RPL2) en frutos de tomate Money Maker, sin tratamiento (0 horas) y tratados con etileno durante 8, 24, 48, 72 y 120 horas. El resultado es la media de dos experimentos independientes, utilizando 12 frutos en cada uno de los tratamientos.

Los resultados del estudio de la influencia del etileno sobre la actividad XET en los frutos maduros de Money Maker se muestran en la **Fig. V.8**. Los valores de XET soluble registrados en los frutos tratados con etileno, fueron inferiores a los controles en todos los tratamientos con etileno a excepción de a las 120 horas, donde aumentó ligeramente. Por lo tanto, se observa cómo las diferencias de actividad XET total encontrada en los frutos control y tratados con etileno, son muy notables a tiempos cortos y tienden a igualarse a tiempos largos de tratamiento.

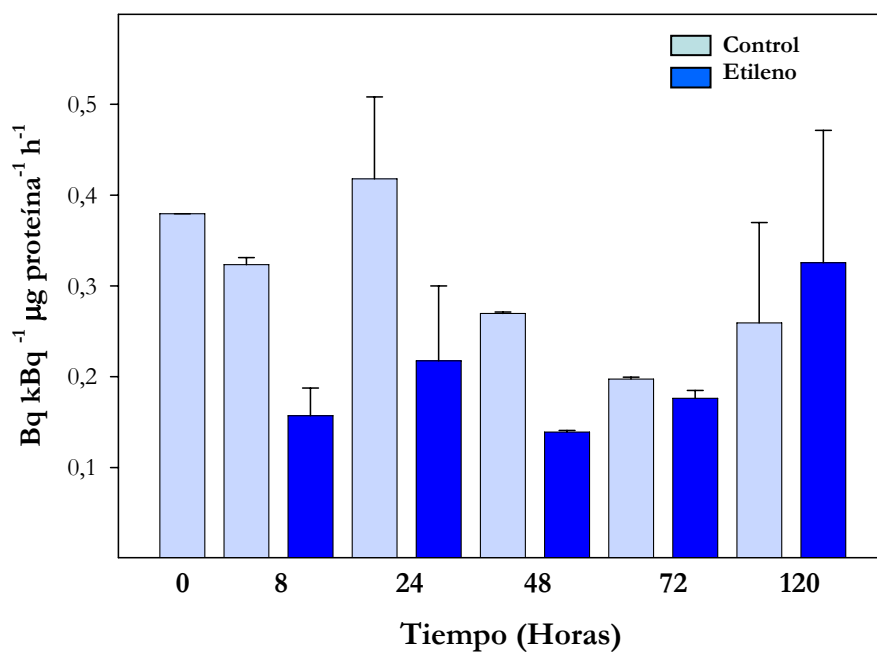


Fig. V.8 Actividad XET soluble en frutos de tomate Money Maker, sin tratamiento (0 horas) y tratados con etileno durante 8, 24, 48, 72 y 120 horas. El resultado es la media \pm SE de dos experimentos independientes, utilizando 12 frutos en cada uno de los tratamientos.

Análisis de la expresión de las *SXTHs* mediante PCR cuantitativo en tiempo real y de la actividad xiloglucano endotransglucosilasa en frutos de tomate de la variedad Canario tratados con etileno

Los resultados de la expresión diferencial de las *SXTHs* estudiadas en respuesta al tratamiento por etileno en frutos maduros silvestres de la variedad Canario, se presentan en la **Fig. V.9**. En ella se observa cómo a tiempo inicial las isoenzimas que más se expresan son el *SXTH4* en el Grupo 1, el *SXTH3* y *SXTH9* notablemente y *SXTH2* y *SXTH12* ligeramente en el Grupo 2 y el *SXTH5* y *SXTH8* en el Grupo 3. La respuesta más notable se produjo en el Grupo 1, puesto que *SXTH1* y *SXTH7* parecen estar inhibidos al principio del tratamiento (8 y 24 horas) para ser activados por la hormona, sobre todo a partir de las 48 horas de tratamiento. *SXTH4* está activado por el etileno en todos los periodos de tratamiento, aunque su nivel de expresión sea muy bajo. La expresión de las *SXTHs* del Grupo 2 aumentan con todos los tratamientos (a excepción de *SXTH9* a las 120 horas), siendo máxima a las 72 horas en todas las isoenzimas. La expresión de *SXTH2* se vio muy activada por el tratamiento con etileno a medida que avanza el periodo de incubación con el gas. En el Grupo 3, se observa la misma tendencia del aumento general de la expresión de la expresión de la *SXTH8* con el tratamiento de etileno hasta las 72 horas, disminuyendo a las 120 horas. Por su parte, *SXTH5* y *SXTH6*, mostraron un comportamiento desigual a lo largo de las incubaciones.

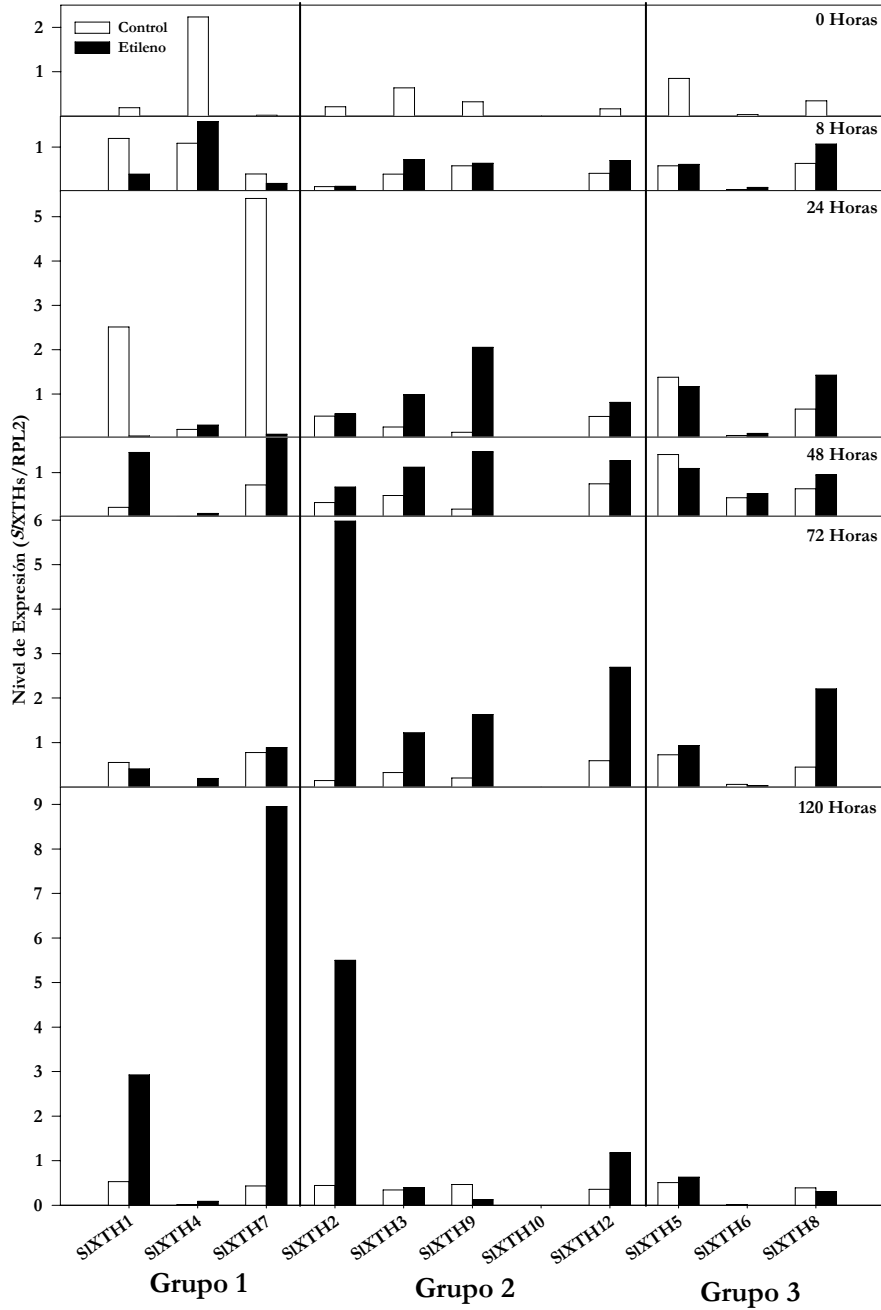


Fig. V.9 Expresión de los genes *SIXTH1-SIXTH12* frente al control interno (RPL2) en frutos de tomate de la variedad Canario, sin tratamiento (0 horas) y tratados con etileno durante 8, 24, 48, 72 y 120 horas. El resultado es la media de dos experimentos independientes, utilizando 12 frutos en cada uno de los tratamientos.

Los resultados del estudio de la influencia del etileno sobre la actividad XET en frutos maduros de la variedad Canario se muestran en la **Fig. V.10**. Se observa cómo, la actividad XET soluble de frutos tratados con etileno, fue inferior a la encontrada en los frutos no tratados, en todos los tratamientos, aunque las diferencias no fueron significativas, a excepción de la incubación a 120 horas.

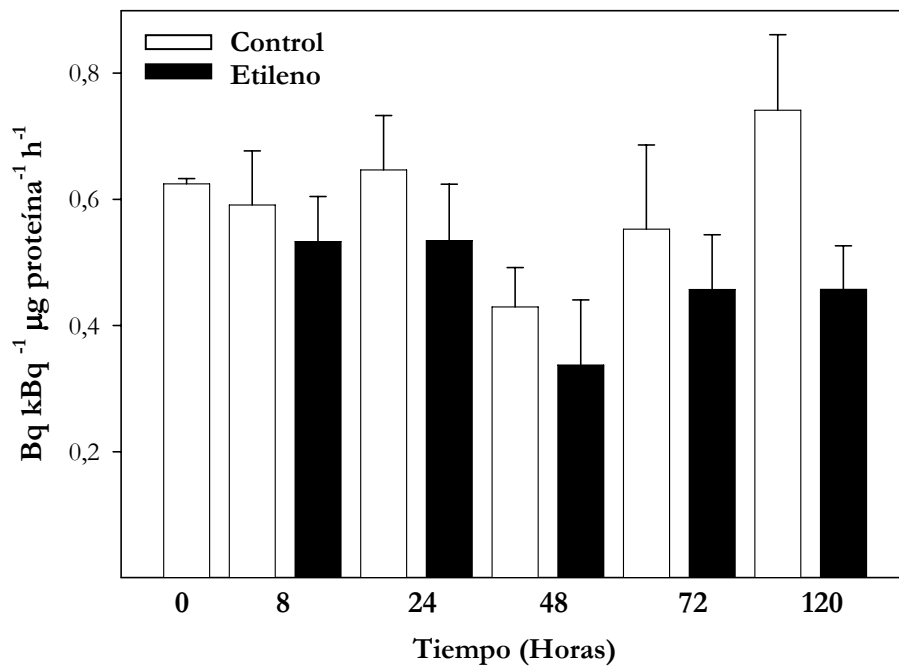


Fig. V.10 Actividad XET soluble en frutos de la variedad Canario, sin tratamiento (0 horas) y tratados con etileno durante 8, 24, 48, 72 y 120 horas. El resultado es la media \pm SE de dos experimentos independientes, utilizando 12 frutos en cada uno de los tratamientos.

DISCUSIÓN

En este Capítulo, comprobamos como el **etileno** aumenta a lo largo del **desarrollo de los frutos**, coincidiendo con la maduración de los mismos, hasta el estadio naranja, disminuyendo ligeramente en el estadio maduro (**Fig. V.1**), como había sido descrito por otros autores (Brummel, 2006). Este aumento en la concentración de etileno durante la maduración está acompañado por una disminución de la expresión de *SXTH1* y de la actividad XET (Capítulo III, Figs. III.3 y III.4). Por otro lado, se comprobó que se producía un aumento de **etileno** durante el estrés biótico, provocado por la **infección fúngica**, en las dos variedades de tomate estudiadas (**Figs. V.3 y V.4**), al igual que se ha descrito en otros frutos (Lund *et al.*, 1998). Este aumento en la concentración de etileno se corresponde con una disminución de la expresión de las *SXTHs* y de la actividad XET en todos los periodos del tratamiento fúngico (Capítulo IV, Figs. IV.20 - IV.23). Es decir, en ambos casos parece existir una relación inversa entre el etileno y la actividad XET. Por ello, y para determinar la posible regulación de la XTH por el etileno, se realizaron tratamientos con etileno exógeno en dos cultivares de tomate, con la intención de extrapolar los resultados obtenidos. Se observó que, en general, se produjo una inducción de la **expresión de los genes de la *SXTHs*** en ambas variedades de tomate, y que la expresión de ciertas *SXTHs*, respondía de modo paralelo en ambas variedades de tomate tras la aplicación del etileno, mientras que otros genes mostraban un comportamiento desigual entre variedades (**Figs. V.7 y V.9**).

Sin embargo, el estudio de la **actividad XET**, mostró una disminución de la misma en los tomates tratados con etileno, de ambas variedades (**Figs. V.8 y V.10**). Estos resultados no coinciden con los encontrados por otros autores (Redgwell y Fry, 1993), aunque ellos sólo evaluaron el efecto del etileno sobre la actividad XET. De aquí, la importancia de un estudio completo, tanto de la expresión génica de los *SXTHs*, como de la actividad XET, que permita

discernir el papel del etileno en la regulación de las XTHs y de la XET y los posibles controles transcripcionales, traducionales y/o post- traducionales.

En cualquier caso, esta falta de correlación entre la expresión de las *SXTHs* y la actividad XET en nuestros resultados, podría tener distintas explicaciones. En primer lugar, el hecho de que sólo estudiamos la actividad XET y la expresión refleja todos los genes, ya tengan función XET o XEH. En segundo lugar, no podemos olvidar, que nosotros hemos estudiado las 12 secuencias génicas descritas actualmente para tomate, *SXTHs*, pero sabemos que al menos existen otras 12 parcialmente secuenciadas (ESTs; <http://labs.plantbio.cornell.edu/XTH/genes.htm>), las cuales podrían mostrar una regulación diferente frente al etileno que quizá justificara la disminución de actividad XET que observamos. Y la tercera posibilidad, es que el etileno pudiera estar implicado en el control de la traducción o/y post-traducción de las proteínas XTH, regulando de este modo las concentraciones finales de actividad XET.

En la extrapolación de los resultados (obtenidos con la aplicación de etileno exógeno) a los procesos fisiológicos de maduración e infección fúngica, encontramos que, aunque el etileno parece controlar positivamente la expresión de los genes *SXTHs*, no puede ser el etileno producido endógenamente durante los procesos de la maduración e infección fúngica, el que controle la expresión génica de las *SXTHs*, puesto que lo que nos encontramos en ambos procesos, es una disminución de la expresión, y no un aumento. No obstante, hay que considerar la diferencia de concentraciones entre el etileno endógeno, producido en los procesos fisiológicos, y el aplicado exógenamente, que fue notablemente mayor. Este hecho podría ocasionar problemas a la hora de extrapolar los resultados, y afectar a la interpretación de los mismos.

En el caso concreto de la infección, si el etileno no parece estar regulando la expresión de las *SXTHs* durante la infección, cabría la posibilidad de fuera el propio hongo, quien controlara la expresión de los genes de la *SXTHs*, como habíamos apuntado anteriormente, de modo que este proceso formara parte del mecanismo de infección por parte del patógeno.

A close-up photograph of a green, hairy plant stem with serrated leaves. The stem is covered in fine, white, hair-like structures. The leaves are bright green and have a serrated edge. The background is a soft, out-of-focus grey.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Las XTHs constituyen una familia multigénica que endotransglucosila y/o hidroliza el xiloglucano de la pared celular, por lo que ha sido relacionada con procesos fisiológicos tan diversos y específicos como pueden ser el crecimiento y desarrollo de las plantas, la maduración de los frutos y los estreses bióticos y abióticos (Rose *et al.*, 2002). El hecho de la existencia de un elevado número de isoenzimas subraya la vital importancia de la función que desempeña en la fisiología vegetal esta familia enzimática, puesto que su diversificación apunta una presión evolutiva creada por la necesidad funcional de las plantas. Por todo ello, en las plantas, es imprescindible la existencia de unos exhaustivos controles en la regulación espacial y temporal de la transcripción y de la traducción de todos los componentes de la familia. Una dificultad para el estudio de esta familia multigénica, radica en el desconocimiento de la proporcionalidad entre lo molecular y lo bioquímico. Por una parte, aunque se puede cuantificar la expresión de cada uno de los genes de la familia, en la valoración de la actividad enzimática, se cuantifican todas las actividades endotransglucosilasas (XET), codificadas por todos los genes que se expresen en el tejido estudiado en ese momento. Además, si alguna isoenzima mostrara ambas actividades (XET/XEH) tan sólo podría cuantificarse la actividad XET. Por otro lado, la cuantificación de la XET se realiza *in vitro*, añadiendo xiloglucano y oligosacáridos del xiloglucano como sustratos de la reacción, mientras que, *in vivo*, la actividad de la enzima dependerá del sustrato existente, en ese momento, en el tejido, lo que implica que puede haber diferencias cuantitativas entre ambas situaciones que no se pueden evaluar.

Debido a ello, es muy complicado abordar un estudio completo de esta familia, lo que provoca que, hasta el momento, sólo se hayan encontrado evidencias indirectas de la relación entre la expresión de los genes de las isoenzimas con los procesos fisiológicos o, en otros casos, una relación de la actividad XET total con estos mismos procesos. Estas dos aproximaciones al estudio de la

XTH (molecular y bioquímica), han sido adoptadas por los investigadores a lo largo de los años, pero de forma independiente, de modo que la mayoría de estos estudios presentan el inconveniente de la falta de conexión entre la expresión de los genes de esta familia y su actividad XET total, la cual se ve modulada, además, por los controles traduccionales y post-traduccionales que se producen a lo largo del proceso de la síntesis de proteínas, aumentando aún más la complicación del estudio de las XTHs, como antes habíamos mencionado.

Nuestro objetivo fue el de profundizar en el conocimiento de la implicación de la XET en los procesos fisiológicos, y lo realmente destacable del planteamiento de este trabajo fue, en primer lugar, el haber realizado el estudio abordándolo desde puntos de vista moleculares (expresión génica), bioquímicos (actividad XET) y fisiológicos (distintos procesos del desarrollo). Y en segundo lugar, la utilización de un único sistema de estudio para poder analizar la participación de la XTH en el crecimiento primario y secundario de las plantas de tomate, la maduración de los frutos y su comportamiento frente a estreses abióticos en plantas y bióticos en frutos. Además, otro de los aspectos relevantes del planteamiento, fue la utilización de plantas transgénicas de la XTH, reguladas bajo el control de un promotor constitutivo. Concretamente, analizamos el comportamiento de uno de los genes, *SXTH1*, en todos los procesos descritos, con la ayuda de dos líneas de plantas transgénicas de tomate, ambas diseñadas bajo el control de un promotor constitutivo, una que sobre-expresaba el gen *SXTH1* y otra que tenía reprimida su expresión.

Los resultados indicaron que, de modo general, el aumento de la expresión de *SXTH1* provocaba un aumento de la actividad XET total en los tejidos estudiados, mientras que la disminución de la expresión de *SXTH1* se correspondía con la disminución de la actividad XET. Es decir, siempre se observaron cambios en la actividad XET provocados por la alteración del transgén *SXTH1*. Sin embargo, hay que señalar que, la magnitud del aumento o disminución de la expresión del gen *SXTH1* no siguió el mismo patrón en todos los tejidos estudiados, y que el promotor no siempre se comportó del

modo esperado. Así, podríamos esperar que su expresión fuera constante, espacial y temporalmente, y eso no sucedió, posiblemente porque la planta cuenta con mecanismos de control, aún desconocidos, que regulan los excesos o las mermas de las alteraciones en la expresión de los genes, máxime cuando se trata de elementos genéticos básicos para el perfecto desarrollo y supervivencia de la planta, como parece ser el caso de la XTH. Un aspecto importante que hay que tener en cuenta es que, si la modificación del gen *SXTH1*, provoca una modificación de la actividad XET total en algún proceso fisiológico, indica que su implicación puede ser muy significativa. Sin embargo, no se descarta que, aunque no se encuentren diferencias cuantitativas en la actividad total XET, el gen no esté relacionado con el proceso, ya que también hay que tener en cuenta la cantidad relativa de cada isoenzima respecto a la actividad XET total.

En cualquier caso, nuestros resultados sobre la expresión de *SXTH1* y la actividad XET, a lo largo del crecimiento y desarrollo de la planta, confirman lo que habían apuntado algunos autores, que implicaban a la XET en estos procesos (Catala *et al.*, 2001) y mas especialmente al gen *SXTH1*, el cual se enmarca dentro del Grupo 1, que ha sido relacionado con procesos de crecimiento y elongación. También es especialmente destacable el éxito de las plantas que sobre-expresan *SXTH1*, puesto que esta es la primera vez que plantas con estas características, muestran un aumento de la actividad XET. Anteriormente, sólo se habían obtenido plantas que contaban con la expresión reprimida del gen y mostraban una reducción de la actividad XET (Herbers *et al.*, 2001).

Los resultados de expresión de *SXTH1* y de la actividad XET total durante el crecimiento de las plántulas sugirieron que este gen codifica, principalmente, para una actividad XET soluble. La sobre-expresión del gen *SXTH1*, provocó cambios irreversibles y permanentes en los enlaces del xiloglucano con el resto de los componentes, cambios que posiblemente fueron los responsables del aumento de la extensibilidad en las zonas de mayor elongación de los hypocótilos y de la alteración del fenotipo de las plántulas, siendo estas más

delgadas, aunque no se modificó su crecimiento en altura. De modo que, la XTH está implicada en el crecimiento, y más concretamente la isoenzima que codifica el gen *SXTH1*, puesto que su aumento provoca cambios fenotípicos evidentes. Por otro lado, en plantas, la expresión de *SXTH1* y la actividad XET total fue particularmente importante en los tejidos vasculares. En las plantas de la línea que tiene disminuida la expresión del gen *SXTH1*, se encontraron cambios en el fenotipo, de modo que estas plantas fueron más delgadas y pesaron menos, aunque no presentaron cambios en el crecimiento en altura. Este hecho, nos ha permitido sugerir que el gen *SXTH1* puede realizar una función específica en la diferenciación de los haces vasculares. Esta propuesta coincide con lo sugerido por Herbers *et al.* (2001), en trabajos realizados con plantas transgénicas de tabaco con niveles inferiores de *NXTH1*. De modo que, efectivamente, la XTH en general, y la *SXTH1* en particular, está relacionada con el crecimiento y la diferenciación de los tejidos vasculares.

Una cuestión que queda abierta sería, si la modificación de otro de los genes del Grupo 1, habría provocado una respuesta similar y que se hubiera reflejado en procesos de crecimiento y diferenciación, que es en los que se ha propuesto que el Grupo 1 está implicado. Además, nos podríamos preguntar si es necesaria una alteración combinada y múltiple de varios genes del Grupo 1 para observar un efecto drástico en el fenotipo. En cualquier caso, no podemos olvidar que todos los genes de la familia pueden ser potencialmente importantes en distintos procesos fisiológicos, aunque estos se asocien principalmente a un Grupo específico, ya que la asociación a un grupo está únicamente basada en una proximidad de la secuencia génica.

Durante el desarrollo y la maduración de frutos, encontramos una disminución de la expresión en el gen *SXTH1*, lo que sugiere que su implicación en el proceso de la maduración debe ser notable. La mayor eficacia del transgén se produjo a nivel de frutos, en comparación con plantas, puesto que la línea que tenía aumentada la expresión de *SXTH1* mostró una actividad XET alrededor de 5 veces superior a la línea silvestre. En las plantas XTH + encontramos que

los frutos contaron con una mayor masa molecular del xiloglucano y eran mas duros, de modo que, esta es la primera vez que se sugiere que sea la XET la que relacione el aumento de la masa molecular del xiloglucano con la dureza de frutos. Esta relación entre masa molecular del xiloglucano y dureza se produce, presumiblemente, por los cambios en el metabolismo del xiloglucano provocados por la actividad XET, lo que implica que esta enzima es clave para el mantenimiento de la estructura del xiloglucano y por tanto de la pared celular, lo que favorecería al mantenimiento de la firmeza del fruto. Es decir, en condiciones normales, lo que ocurre es que la XET va disminuyendo en la maduración y post-maduración y esa merma influye directamente en el ablandamiento de los frutos. De modo que, la XET desempeñaría una doble función temporal en los frutos. Por un lado, durante el desarrollo, contribuyendo, con sus altos niveles enzimáticos, al mantenimiento de la firmeza de los frutos y, por otro lado, en la maduración y post-maduración, donde la disminución progresiva de sus niveles enzimáticos le impide mantener la estructura, con el consecuente ablandamiento de los frutos. Obviamente, todo este proceso tiene que estar sujeto a una exhaustiva regulación temporal para controlar que los niveles de XET totales sean bajos al final de la maduración, lo que permitiría a la planta alcanzar con éxito la propagación de las semillas y, consecuentemente, el mantenimiento del ciclo vital de la misma. Nuestros resultados confirman la implicación de la actividad XET en el desarrollo de los frutos, lo que había sido sugerido anteriormente por otros autores (Arrowsmith y de Silva, 1995; Catala *et al.*, 1997 y 2000; Saladie *et al.*, 2006). Lo que no podemos afirmar es que sea la *SXTH1* la responsable exclusiva de los cambios que se producen en la pared celular durante la maduración, ya que no sabemos qué hubiera ocurrido si hubiéramos modificado otro de los genes de la familia de la *SXTHs*.

A lo largo del ciclo vital, la planta está sometida a numerosos estreses a los que responde con modificaciones a todos los niveles. Se ha sugerido que la XET podría estar relacionada con el mecanismo de respuesta frente a distintos estreses, ya que se han descrito tanto cambios en la expresión de algunas XTHs, como cambios en la actividad XET asociados con dichos estreses (Cho *et al.*,

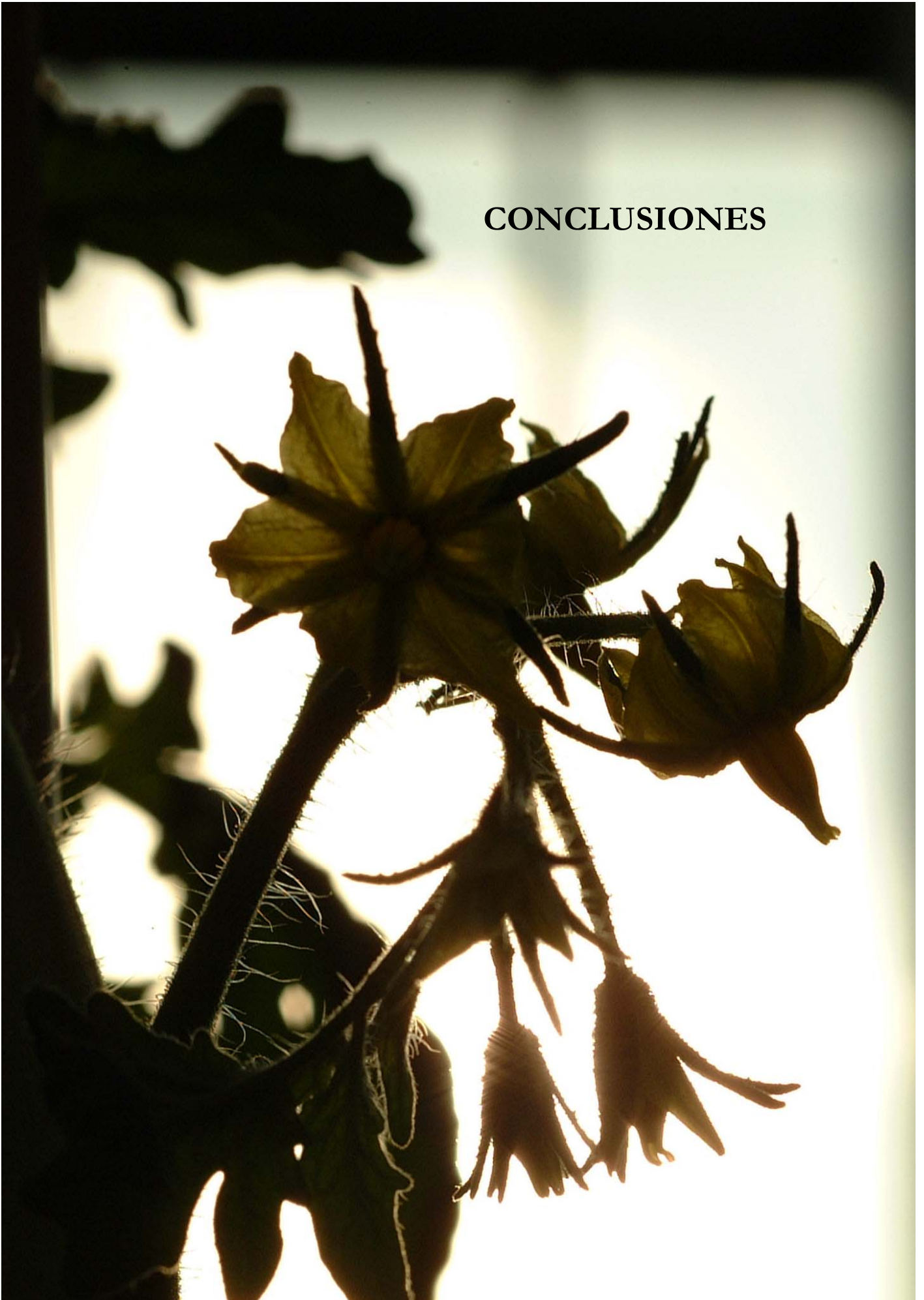
2006). Nuestros resultados con los hipocótilos y las plantas que tenían disminuida la expresión del gen *SXTH1*, contaron con niveles inferiores de XET y respondieron a los estreses abióticos (estrés hídrico, salino y térmico) creciendo menos, lo que puso de manifiesto la implicación de la XTH en la respuesta a los estreses abióticos, probablemente por la modificación de los enlaces de la pared celular y su consecuente efecto sobre el crecimiento. En el caso de los frutos, no hay estudios sobre la posible implicación de la XET en las respuestas de estrés. Nuestros resultados de los tratamientos con estreses bióticos (infección fúngica) en frutos de tomate, indicaron una modulación negativa de la expresión génica de todas las *SXTHs* estudiadas y de la actividad XET total. Estos resultados sugieren la posibilidad de una regulación fúngica a nivel transcripcional de los genes *SXTHs*, de modo que este proceso formaría parte del mecanismo de infección por parte del patógeno. Puesto que el papel de la XTH parece ser el de mantener la estructura del xiloglucano, y en consecuencia la firmeza de los frutos, su disminución en el proceso de infección fúngica contribuirá al ablandamiento y desestructuración de los frutos que tiene lugar durante el progreso de la infección.

Retomando la idea de que la familia XTHs posee un elevado número de isoenzimas y de que está implicada en numerosos procesos fisiológicos donde la pared celular desempeña un papel crucial, se hace evidente una regulación espacial y temporal de los mismos. Varios autores habían puesto de manifiesto, en procesos concretos, la regulación de algunas isoenzimas de la XTH, por fitohormonas, como las auxinas y giberelinas (Catala *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). Nosotros hemos descrito que en procesos fisiológicos como la maduración y la infección fúngica, se produce un aumento de etileno endógeno, mientras que la expresión de las XTHs y la actividad XET se veía mermada, por lo que nos cuestionamos la posibilidad de que ese etileno estuviera modulando la expresión de las XTHs y/o la actividad enzimática XET. Nuestros resultados de los tratamientos con etileno exógeno, mostraron una regulación positiva de expresión génica de la familia *SXTHs* por el etileno, mientras que la actividad XET total disminuyó en todos los casos. Una posible explicación sería, que los genes de la familia *SXTHs* que no han sido

secuenciados, respondieran al etileno exógeno mostrando una disminución de la expresión que, compensara el aumento de la expresión que vemos en los genes secuenciados, lo que explicaría la disminución de la actividad XET total. Por otro lado, nuestros resultados indican que no parece que sea el etileno endógeno, producido durante los procesos de maduración e infección, el que regule la expresión de las SIXTHs en esos procesos, puesto que la aplicación exógena de etileno, provoca un aumento de la expresión de estos genes, mientras que en estos procesos se registró una disminución de la expresión de los mismos. No obstante, hay que tener en cuenta la diferencia de concentraciones entre el etileno endógeno, producido en los procesos fisiológicos, y el aplicado exógenamente, el cual fue notablemente mayor. En cualquier caso, no podemos explicar qué implicaciones fisiológicas tiene el aumento de la expresión de los genes *SIXTHs* provocado por el etileno exógeno, lo que hace necesario seguir investigando los procesos de regulación de esta enzima.

La enzima XTH y la actividad enzimática XET fueron descritas hace tan sólo 15 años, y en este tiempo han sido muchos los nuevos conocimientos aportados que abren a su vez, multitud de puertas para seguir investigando la enzima y sus implicaciones en la vida vegetal. Nosotros hemos querido aportar un ladrillo más en la construcción del conocimiento de la pared celular de plantas.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. Las dos modificaciones génicas realizadas en el gen *SXTH1* en *Solanum lycopersicum* L. provocaron un aumento y disminución de la expresión génica de este isoenzima que se correspondió, de modo general, con el aumento y disminución de la actividad XET. Esta es la primera vez que se han descrito plantas transgénicas que tienen aumentados los niveles de expresión de un gen de la XTH y muestran un aumento de la actividad XET.
2. En plántulas, la sobre-expresión del gen *SXTH1*, aumentó principalmente la actividad XET soluble, provocó cambios irreversibles y permanentes en los enlaces del xiloglucano con el resto de los componentes, cambios que, posiblemente, fueron los responsables de un aumento de la extensibilidad en las zonas de mayor elongación de los hipocótilos, y de la alteración del fenotipo, siendo las plántulas más delgadas, aunque de la misma altura. Esto sugiere que la XET está implicada en el crecimiento, y más concretamente, la isoenzima que codifica el gen *SXTH1*.
3. En las plantas de la línea que tiene disminuida la expresión del gen *SXTH1*, se encontraron cambios en el fenotipo, de modo que estas plantas fueron más delgadas y pesaron menos, aunque no presentaron cambios en el crecimiento en altura. La expresión de *SXTH1* y la actividad XET total fue particularmente importante en los tejidos vasculares. Nuestros resultados sugieren que el gen *SXTH1* podría estar implicado en la diferenciación de los haces vasculares.
4. Los frutos de las plantas que sobre-expresaron el gen *SXTH1* cuentan con una mayor masa molecular del xiloglucano y fueron más duros, presumiblemente por los cambios encontrados en la estructura del xiloglucano provocados por la actividad XET, lo que sugiere que esta enzima es clave para el mantenimiento de la estructura del xiloglucano y de la pared celular. Por lo tanto, la XET desempeñaría una doble función temporal en los frutos. Por un lado, durante el desarrollo, contribuyendo, con sus altos niveles enzimáticos, al mantenimiento

de la firmeza de los frutos y, por otro lado, en la maduración y post-maduración, donde la disminución progresiva de sus niveles enzimáticos le impide mantener la estructura, con el consecuente ablandamiento de los frutos.

5. La respuesta a los estreses abióticos (hídrico, salino y térmico) de las plantas que tenían reprimida la expresión del gen *SXTH1*, fue una disminución del crecimiento, sugiriendo la implicación del gen *SXTH1* en las modificaciones del xiloglucano, que presumiblemente, ocasionarán diferencias en la estructura de la pared celular que alterarán la respuesta a estos estreses.
6. En la respuesta de los frutos a los estreses bióticos (infección fúngica), la expresión génica de todas las *SXTHs* estudiadas y de la actividad XET se redujo. Por lo tanto, si la actividad XET es inhibida durante la infección, el papel mantenedor de la estructura del xiloglucano se anula, ocasionando el ablandamiento del fruto y el avance de la infección fúngica. En este caso, se sugiere la posibilidad de que se produjera una regulación de origen fúngico a nivel molecular de los genes *SXTHs*.
7. El etileno exógeno aplicado a frutos, indujo un aumento de la expresión de todas las *SXTHs* estudiadas, mientras que la actividad XET total disminuyó en todos los casos. Por lo tanto, la disminución de la expresión génica de las *SXTHs*, durante los procesos de la maduración e infección fúngica, no parece ser debida al aumento del etileno endógeno. De modo que, no podemos explicar qué implicaciones fisiológicas tiene el aumento de la expresión de los genes *SXTHs* provocado por el etileno exógeno, lo que hace necesario seguir investigando los procesos de regulación de esta enzima.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

- Abdel-Massih, R. M.; Baydoun, E. A. y Brett, C. T. In vitro biosynthesis of 1→4-β-galactan attached to a pectin-xyloglucan complex in pea. *Planta*. 2003; 16:502-511.
- Akamatsu, T.; Hanzawa, Y.; Ohtake, Y.; Takahashi, T.; Nishitani, K. y Komeda, Y. Expression of endoxyloglucan transferase genes in acaulis mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 1999; 121:715-722.
- Albersheim, P.; Nevins, D. J.; English, P. D. y Karr, A. A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr Res*. 1967; 5:340-345.
- Albersheim, P. y Darvill, A.G. Oligosaccharins: novel molecules that can regulate growth, development, reproduction, y defense against disease in plants. *Sci. Am*. 1985; 253:58-64.
- Albert, M.; Werner, M.; Proksch, P.; Fry, S. C. y Kaldenhoff, R. The cell wall-modifying xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase *LeXTH1* is expressed during the defence reaction of tomato against the plant parasite *Cuscuta reflexa*. *Plant Biol*. 2004; 6:402-407.
- Aldington, S. y Fry, S.C. Oligosaccharins. *Adv Bot Res*. 1993; 19:1-101.
- Almeida, D.P.F. y Huber, D.J. Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: A potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening. *Physiol Plant*. 1999; 105:506-512.
- Andrews, J.; Adams, S.R.; Burton, K. S. y Evered, C.E. Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth. *J Exp Bot*. 2002; 53:2185-2191.
- Annis, S. L. y Goodwin, P. H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *Eur. J. Plant Pathol*. 1997; 103:1-14.
- Antosiewicz, D.M.; Purugganan, M. M.; Polisensky, D.H. y Braam, J. Cellular localization of *Arabidopsis* xyloglucan endotransglycosylase-related proteins during development and after wind stimulation. *Plant Physiol*. 1997; 115:1319-

1328.

- Arioli, T.; Peng, L.; Betzner, A. S.; Burn, J.; Wittke, W.; Herth, W.; Camilleri, C.; Hofte, H.; Plazinski, J.; Birch, R.; Cork, A.; Glover, J.; Redmond, J. y Williamson, R.E. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science*. 1998; 279:717-720.
- Arrowsmith, D. A. y de Silva, J. Characterisation of two tomato fruit-expressed cDNAs encoding xyloglucan endo-transglycosylase. *Plant Mol Biol*. 1995; 28:391-403.
- Arumuganathan, K. y Earle, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep*. 1991; 9:208-219.
- Bacic, G.; Niesman, M. R.; Bennett, H. F.; Magin, R. L. y Swartz, H. M. Modulation of water proton relaxation rates by liposomes containing paramagnetic materials. *Magn Reson Med*. 1988; 6:445-58.
- Barnavon, L.; Doco, T.; Terrier, N.; Agcorges, A.; Romicu, C. y Pellerin, P. Analysis of cell wall neutral sugar composition, β -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant Physiol Biochem*. 2000; 38: 289-300.
- Baron-Epel, O.; Hernandez, D.; Jiang, L. W.; Meiners, S. y Schindler, M. Dynamic continuity of cytoplasmic and membrane compartments between plant cells. *J Cell Biol*. 1988; 106:715-721.
- Barrachina, C. y Lorences, E.P. Xyloglucan endotransglycosylase activity in pine hypocotyls: intracellular localization and relationship with endogenous growth. *Physiol Plant*. 1998; 102:55-60.
- Bell, G. I. Estimate of the sticking probability for cells in uniform shear flow with adhesion caused by specific bonds. *Cell Biophys*. 1981; 3:289-304.
- Bernardo, J. M. Reference posterior distributions for Bayesian inference. *J. Roy. Statist. Soc.* 1979; 41:113-147. Reprinted in *Bayesian Inference* (N. G. Polson and G. C. Tiao, eds.). Brookfield, VT: Edward Elgar. 1995; 229-263.
- Berger, J. O. y Bernardo, J. M. On the development of reference priors. *Bayesian Statistics 4* (J. M. Bernardo *et. al.*, eds.). Oxford: University Press. 1992; 35-60.
- Bishopp, A.; Mahonen, A. P. y Helariutta, Y. Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development*. 2006; 133:1857-1869.

- Blumenkrantz, N. y Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem.* 1973. 54: 484-489.
- Bootten, T. J.; Harris, P. J.; Melton, L. D. y Newman, R. H. Solid-state ¹³C-NMR spectroscopy shows that the xyloglucans in the primary cell walls of mung bean (*Vigna radiata* L.) occur in different domains: a new model for xyloglucan-cellulose interactions in the cell wall. *J Exp Bot.* 2004; 55:571-583.
- Bourquin, V.; Nishikubo, N.; Abe, H.; Brumer, H.; Denman, S.; Eklund, M.; Christiernin, M.; Teeri, T. T.; Sundberg, B. y Mellerowicz, E. J. Xyloglucan endotransglycosylases have a function during the formation of secondary cell walls of vascular tissues. *Plant Cell.* 2002; 14:3073-3088.
- Boyer, J.S. Growth-induced water potentials originate from wall yielding during growth. *J Exp Bot.* 2001; 52:1483-1488.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- Braam, J. y Davies, R.W. Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell.* 1990; 60:357-364.
- Brownleader, M. D.; Jackson, P.; Mobasheri, A.; Pantelides, A. T.; Sumar, S.; Trevan, M. y Dey, P. M. Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1999; 39:149-164.
- Brummell, D.A. y Labavitch, J.M. Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates. *Plant Physiology.* 1997; 115:717-725.
- Brummell, D. A.; Hall, B. D. y Bennett, A. B. Antisense suppression of tomato endo-1→4-β-glucanase *Cel2* mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening. *Plant Mol Biol.* 1999; 40:615-622.
- Brummell, D. A. y Harpster, M. H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol.* 2001; 47:311-340.
- Brummell, D. A.; Dal Cin, V.; Crisosto, C. H. y Labavitch, J. M. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *J Exp*

Bot. 2004a; 55:2029-2039.

- Brummell, D. A.; Dal Cin, V.; Lurie, S.; Crisosto, C. H. y Labavitch, J. M. Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. *J Exp Bot.* 2004b; 55:2041-2052.
- Brummell, D.A. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct Plant Biol.* 2006; 33:2-103.
- Buchala, A.J. y Franz, G. A hemicellulosic β -glucan from the hypocotyls of *Phaseolus aureus*. *Phytochemistry.* 1974; 13: 1887-1889.
- Burgalassi, S.; Raimondi, L.; Pirisino, R.; Banchelli, G.; Boldrini, E. y Saettone, M. F. Effect of xyloglucan (tamarind seed polysaccharide) on conjunctival cell adhesion to laminin and on corneal epithelium wound healing. *Eur J Ophthalmol.* 2000a; 10:71-76.
- Burgalassi, S.; Chetoni, P.; Panichi, L.; Boldrini, E. y Saettone, M. F. Xyloglucan as a novel vehicle for timolol: pharmacokinetics and pressure lowering activity in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2000b; 16:497-509.
- Burstin, J. Differential expression of two barley XET-related genes during coleoptile growth. *J Exp Bot.* 2000; 51:847-852.
- Campbell, A. D.; Huysamer, M.; Stotz, H. U.; Greve, L. C. y Labavitch, J. M. Comparison of ripening processes in intact tomato fruit and excised pericarp discs. *Plant Physiol.* 1990; 94:1582-1589.
- Campbell, P. y Braam, J. Co- and/or post-translational modifications are critical for TCH4 XET activity. *Plant J.* 1998; 15:553-561.
- Campbell, P. y Braam, J. Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. *Trends Plant Sci.* 1999a; 4:361-366.
- Campbell, P. y Braam, J. In vitro activities of four xyloglucan endotransglycosylases from *Arabidopsis*. *Plant J.* 1999b; 18:371-82.
- Carpita, N. C. Cell wall development in maize coleoptiles. *Plant Physiol.* 1984; 76:205-212.
- Carpita, N. C. y Gibeaut, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties

- of the walls during growth. *Plant J.* 1993; 3:1-30.
- Carpita, N.; McCann, M. y Griffing, L. R. The plant extracellular matrix: news from the cell's frontier. *Plant Cell.* 1996; 8:1451-63.
 - Carpita, N. y McCann, M. The cell wall. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Edited by Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2000. pp. 52-108.
 - Carrari, F. y Fernie, A. R. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *J Exp Bot.* 2006; 57:1883-1897.
 - Cassab, G. I. Plant cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1998; 49:281-309.
 - Catala, C.; Rose, J. K. y Bennett, A. B. Auxin regulation and spatial localization of an endo-1 \rightarrow 4- β -D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *Plant J.* 1997; 12:417-426.
 - Catala, C.; Rose, J. K. y Bennett, A. B. Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. *Plant Physiol.* 2000; 122:527-534.
 - Catala, C.; Rose, J. K.; York, W. S.; Albersheim, P.; Darvill, A. G. y Bennett, A. B. Characterization of a tomato xyloglucan endotransglycosylase gene that is down-regulated by auxin in etiolated hypocotyls. *Plant Physiol.* 2001; 127:1180-1192.
 - Chanliaud, E.; De Silva, J.; Strongitharm, B.; Jeronimidis, G. y Gidley, M. J. Mechanical effects of plant cell wall enzymes on cellulose/xyloglucan composites. *Plant J.* 2004; 38:27-37.
 - Chen, F.; Nonogaki, H. y Bradford, K. J. A gibberellin-regulated xyloglucan endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination. *J Exp Bot.* 2002; 53:215-223.
 - Cho, S. K.; Kim, J. E.; Park, J. A.; Eom, T. J. y Kim, W. T. Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper *CaXTH3*, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *FEBS Lett.* 2006; 580:3136-3144.
 - Choi, D.; Cho, H.T. y Lee, Y. Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiol Plant.* 2006; 126:511-518.
 - Chun, J. y Huber, D.J. Polygalacturonase-mediated solubilization and

- depolymerization of pectic polymers in tomato fruit cell walls. regulation by pH and ionic conditions. *Plant Physiol.* 1998; 117: 1293-1299.
- Church, I.J. y Parsons, A.L. Modified Atmosphere Packaging technology: a review. *J Sci Food Agric.* 1995; 67: 143-152.
 - Collmer, A. y Keen, N. T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol.* 1986; 24: 383-409.
 - Coombe, B. The Development of fleshy fruits. *Ann Rev Plant Physiol.* 1976; 27: 507-528.
 - Cooper, R. M. The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. In *Biochemical Plant Pathology*, Wiley: Chichester, U.K. 1983; pp. 101-137.
 - Cosgrove, D. J. Analysis of the dynamic and steady-state responses of growth rate and turgor pressure to changes in cell parameters. *Plant Physiol.* 1981; 68:1439-1446.
 - Cosgrove, D. J. Wall relaxation and the driving forces for cell expansive growth. *Plant Physiol.* 1987; 84:561-564.
 - Cosgrove, D. J. Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta.* 1989; 177:121-130.
 - Cosgrove, D. J. y Li, Z. C. Role of expansin in cell enlargement of oat coleoptiles (analysis of developmental gradients and photocontrol). *Plant Physiol.* 1993; 103:1321-1328.
 - Cosgrove, D.J. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997; 13:171-201.
 - Cosgrove, D. J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1999; 50:391-417.
 - Cosgrove, D. J. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol Biochem.* 2000; 38:109-124.
 - Cosgrove, D. J. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiol.* 2001; 125:131-134.
 - Cosgrove, D. J. Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6:850-61.

- Cui, D.; Neill, S.J.; Tang, Z. y Cai, W. Gibberellin-regulated XET is differentially induced by auxin in rice leaf sheath bases during gravitropic bending. *J Exp Bot.* 2005; 56:1327-1334.
- Cumming, C. M.; Rizkallah, H. D.; McKendrick, K. A.; Abdel-Massih, R. M.; Baydoun, E. A. y Brett, C. T. Biosynthesis and cell-wall deposition of a pectin-xyloglucan complex in pea. *Planta.* 2005; 222:546-555.
- Cutillas-Iturralde, A.; Zarra, I. y Lorences, E.P. Metabolism of cell wall polysaccharides from persimmon fruit. Pectin solubilization during fruit ripening occurs in apparent absence of polygalacturonase activity. *Physiol Plant.* 1993; 89: 369-375.
- Cutillas-Iturralde, A.; Zarra, I.; Fry, S. C. y Lorences E. P. Implication of persimmon fruit hemicellulose metabolism in the softening process. Importance of xyloglucan endotransglycosylase. *Physiol Plant.* 1994; 91: 169-176.
- Cutillas-Iturralde, A. y Lorences, E. P. Effect of xyloglucan oligosaccharides on growth, viscoelastic properties, and long-term extension of pea shoots. *Plant Physiol.* 1997; 113:103-109.
- Cutillas-Iturralde, A.; Fulton, D.; Fry, S.C. y Lorences, E.P. Xyloglucan-derived oligosaccharides induce ethylene synthesis in persimmon (*Diospyros khaki* L.) fruit. *J Exp Bot.* 1998; 49:701-706.
- Dani, V.; Simon, W. J.; Duranti, M. y Croy, R. R. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics.* 2005; 5:737-45.
- de Silva, J.; Jarman, C. D.; Arrowsmith, D. A.; Stronach, M. S.; Chengappa, S.; Sidebottom, C., y Reid, J. S. Molecular characterization of a xyloglucan-specific endo-(1→4)-β-D-glucanase (xyloglucan endo-transglycosylase) from nasturtium seeds. *Plant J.* 1993; 3:701-711.
- de Silva, J.; Arrowsmith, D.; Hellyer, A.; Whiteman, S. y Robinson, S. Xyloglucan endotransglycosylase and plant growth. *J Exp Bot.* 1994; 45:1693-1701.
- De Vos, M.; Van Oosten, V.R. y Van Poecke, R.M.P. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 2005; 18: 923-927.
- Delmer, D. P. Biosynthesis of cellulose. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 1983;

41:105-153.

- Dellapenna, D.; Kates, D. S. y Bennett, A. B. Polygalacturonase gene expression in rutgers, *rin*, *nor*, and *Nr* tomato fruits. *Plant Physiol.* 1987; 85:502-507.
- Doblin, M. S.; Kurek, I.; Jacob-Wilk, D., y Delmer, D. P. Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* 2002; 43:1407-1420.
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton. J. K.; Rebers, P. A. y Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956; 28: 350-356.
- Dumville, J.C. y Fry, S.C. Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymic mechanism of fruit softening. *Planta.* 2003; 217: 951-961.
- Eckert, J.W. y Brown, G.E. Post-harvest citrus diseases and their control. In: Wardowski WF, Nagy SC, Grierson W, eds. *Fresh citrus fruits.* Westport: AVI. 1986; pp. 315-360.
- Emons, A.M.C. y Mulder, M.B. How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. *Trends Plant Sci.* 2000; 5:1360-1385.
- Eriksson, E.M.; Bovy, A.; Manning, K.; Harrison, L.; Andrews, J.; De Silva, J.; Tucker, G.A. y Seymour, G.B. Effect of the Colorless non-ripening mutant on cell wall biochemistry and geneexpression during tomato fruit development and ripening. *Plant Physiol.* 2004; 136:4184-4197.
- Faik, A.; Desveaux, D. y Maclachlan, G. Enzymic activities responsible for xyloglucan depolymerization in extracts of developing tomato fruit. *Phytochemistry.* 1998; 49:365-376.
- Fanutti, C.; Gidley, M. J. y Reid, J. S. Substrate subsite recognition of the xyloglucan endo-transglycosylase or xyloglucan-specific endo-(1→4)-β-D-glucanase from the cotyledons of germinated nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seeds. *Planta.* 1996; 200:221-228.
- Farkas, V.; Sulova, Z.; Stratilova, E.; Hanna, R. y Maclachlan, G. Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. *Arch Biochem Biophys.* 1992; 298:365-370.
- Fenwick, K. M.; Apperley, D. C.; Cosgrove, D. J. y Jarvis, M. C. Polymer mobility in cell walls of cucumber hypocotyls. *Phytochemistry.* 1999; 51:17-22.

- Fischer, R.L. y Bennet, A.B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1991; 42: 675-703.
- Fleischer, A.; O'Neill, M. A. y Ehwald, R. The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly reased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol.* 1999; 121:829-838.
- Fonseca, S.; Monteiro, L.; Barreiro, M.G. y Pais, M.S. Expression of genes encoding cell wall modifying enzymes is induced by cold storage and reflects changes in pear fruit texture. *J Exp Bot.* 2005; 56:2029-2036.
- Fry, S.C. Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell-wall glycoprotein. *Biochem J.* 1982; 204:449-455.
- Fry, S.C. In-vivo formation of xyloglucan nonasaccharide: A possible biologically active cell-wall fragment. *Planta.* 1986; 169:443-453.
- Fry, S.C. The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Ed. Longman, London. 1988.
- Fry, S.C. The structure and functions of xyloglucan. *J Exp Bot Review.* 1989.
- Fry, S. C.; Smith, R. C.; Renwick, K. F.; Martin, D. J.; Hodge, S. K. y Matthews, K. J. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem J.* 1992; 282:821-828.
- Fry, S. C.; Aldington, S.; Hetherington, P. R. y Aitken, J. Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiol.* 1993a; 103:1-5.
- Fry, S.C. Plant cell expansion: loosening the ties. *Curr Biol.* 1993b; 3:355-357.
- Fry, S. C. Oligosaccharins as plant growth regulators. *Biochem Soc Symp.* 1994; 60:5-14.
- Fry, S.C. The 'dot-blot' assays for glycosyltransferases and glycosylhydrolases: Optimization for xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity. *Plant J.* 1997; 11, 1141-1150.
- Fry, S.C. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical J.* 1998; 332: 507-515.
- Fry, S. C.; Dumville, J. C. y Miller, J. G. Fingerprinting of polysaccharides attacked by hydroxyl radicals in vitro and in the cell walls of ripening pear fruit. *Biochem J.* 2001; 357:729-737.

- Fry, S.C. Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking. *Phytochemistry Rev.* 2004a; 3: 97-111.
- Fry, S.C. Tansley Review: Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist.* 2004b; 161: 641-675.
- Fukuda, T.; Ishikawa, T.; Ogawa, M.; Shiraga, S.; Kato, M.; Suye, S. y Ueda, M. Enhancement of cellulase activity by clones selected from the combinatorial library of the cellulose-binding domain by cell surface engineering. *Biotechnol Prog.* 2006; 22:933-938.
- Gaspar, Y.; Johnson, K. L.; McKenna, J. A.; Bacic, A. y Schultz, C. J. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Mol Biol.* 2001; 47:161-716.
- Gibeaut, D. M.; Pauly, M.; Bacic, A. y Fincher, G. B. Changes in cell wall polysaccharides in developing barley (*Hordeum vulgare*) coleoptiles. *Planta.* 2005; 221:729-738.
- Gilkes, N.R. y Hall, M.A. The hormonal control of cell wall turnover in *Pisum sativum*. *New Phytologist.* 1977; 78:1-15.
- Giovannoni, J.J.; DellaPenna, D.; Bennett, A.B. y Fischer RL. Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic *rin* (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *Plant Cell.* 1989; 1:53-63.
- Giovannoni, J. Molecular biology of fruit development and ripening. In *Methods in Plant Molecular Biology.* (Bryant, J. ed.) Academic Press. 1993. Vol. 10: 253-287.
- Giovannoni, J.; Yen, H.; Shelton, B.; Miller, S.; Vrebalov, J.; Kannan, P.; Tieman, D.; Hackett, R.; Grierson, D. y Klee, H. Genetic mapping of ripening and ethylene-related loci in tomato. *Journal TAG Theoretical and Applied Genetics.* 1999; 98: 1005-1013.
- Goldberg, R. Changes in the properties of cell wall pectin methylesterase along the *Vigna radiata* hypocotyl. *Plant Physiol.* 1984; 61: 58-63.

- Golden, K.D.; John, M.A. y Kean, E.A. β -Galactosidase from *Coffea arabica* and its role in fruit ripening. *Phytochemistry*. 1993; 34:355-360.
- Greenberg, J. y Yao, N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cel Microbiol*. 2004; 6: 201-211.
- Greve, L. C. y Labavitch, J. M. Cell wall metabolism in ripening fruit: V. analysis of cell wall synthesis in ripening tomato pericarp tissue using a D-[U-C]glucose tracer and gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiol*. 1991; 97:1456-1461.
- Grierson, D. Senescence in fruits. *HortScience*. 1987; 22: 859-862.
- Gross, K.C. Fractionation and partial characterization of cell walls from normal and non-ripening mutant tomato fruit. *Physiol Plant*. 1984; 62:25-32.
- Gross, K.C. y Sams, C.E. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry*. 1984; 23: 2457-2461.
- Gross, K.C.; Watada, A.E.; Kang, M.S.; Kim, S.D; Kim, K.S. y Lee, S.W. Biochemical changes associated with the ripening of hot pepper fruit. *Physiol Plant*. 1986; 66:31-36.
- Grubben G. J. Tropical vegetables and their genetic resources. International board for plant genetic resources. FAO, Rome, 1977; 197.
- Ha, M. A.; Apperley, D. C. y Jarvis, M. C. Molecular rigidity in dry and hydrated onion cell walls. *Plant Physiol*. 1997; 115:593-598.
- Hagerman, A.E. y Austin, P.J. Continuous spectrophotometric assay for plant methyl esterase. *J Agric Food Chem*. 1986; 34:440-444.
- Hahn, M.G.; Bucheli, P.; Cervone, F.; Doares, S.H.; O'Neill, R.A.; Darvill, A y Albersheim, P. Roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. In: Nester, E. y Kosuge, T., eds. *Plant Microbe Interaction. Molecular and Genetic Perspectives*, Vol. 3. McGraw Hill, New York. 1989; pp.131-181.
- Hall, C.B. Cellulase activity in tomato fruits according to portion and maturity. *Botanical Gazette*. 1964; 125: 156-157.
- Hall, L.N.; Tucker, G.A.; Smith, C.J.S.; Watson, C.F.; Seymour, G.B.; Bundick, Y.; Boniwell, J.M.; Fletcher, J.D.; Ray, J.A. y Schuch, W. Antisense inhibition of pectin esterase gene expression in transgenic tomatoes. *Plant J*. 1993; 3:121-129.

- Hall, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot.* 2002; 53:1-11.
- Harker, F.R. y Sutherland, P.W. Physiological changes associated with fruit ripening and the development of mealy texture during storage of nectarines. *Postharvest Biol Technol.* 1993; 2:269-277.
- Harpster, M.H.; Brummell, D.A. y Dunsmuir, P. Suppression of a ripening-related endo-1→4-β-glucanase in transgenic pepper fruit does not prevent depolymerization of cell wall polysaccharides during ripening. *Plant Mol Biol.* 2002a; 50: 345-355.
- Harpster, M.H.; Dawson, D.M.; Nevins, D.J.; Dunsmuir, P. y Brummell, D.A. Constitutive overexpression of a ripening-related pepper endo-1→4-β-glucanase in transgenic tomato fruit does not increase xyloglucan depolymerization or fruit softening. *Plant Mol Biol.* 2002b; 50: 357-369.
- Hatfield, R. D. y Nevins, D. J. Hydrolytic activity and substrate specificity of an endoglucanase from *Zea mays* seedling cell walls. *Plant Physiol.* 1987; 83:203-207.
- Hayashi, T.; Wong, Y.S. y Maclachlan, G.A. Pea xyloglucan and cellulose II. Hydrolysis by pea endo-1→4-β-glucanase. *Plant Physiol.* 1984; 75:605-610.
- Hayashi, T.; Marsden, M. P. y Delmer, D. P. Pea xyloglucan and cellulose: VI. Xyloglucan-cellulose interactions in vitro and in vivo. *Plant Physiol.* 1987; 83:384-389.
- Hayashi, T. Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu Rev Plant Physiol.* 1989; 40: 139-168.
- Hayashi, T.; Takeda, T.; Ogawa, K. y Mitsuishi, Y. Effects of the degree of polymerization on the binding of xyloglucans to cellulose. *Plant Cell Physiol.* 1994; 35:893-899.
- Hayashi, T.; Yoshida, K.; Park, Y. W.; Konishi, T. y Baba, K. Cellulose metabolism in plants. *Int Rev Cytol.* 2005; 247:1-34.
- Herbers, K.; Lorences, E.P.; Barrachina, C. y Sonnewald, U. Functional characterisation of *Nicotiana tabacum* xyloglucan endotransglycosylase (NXET-1): generation of transgenic tobacco plants and changes in cell wall xyloglucan. *Planta.* 2001; 212:279-87.
- Hetherington, P. R. y Fry, S. C. Xyloglucan endotransglycosylase activity in

- carrot cell suspensions during cell elongation and somatic embryogenesis. *Plant Physiol.* 1993; 103:987-992.
- His, I.; Driouich, A.; Nicol, F.; Jauneau, A., y Hofte, H. Altered pectin composition in primary cell walls of *korrigan*, a dwarf mutant of *Arabidopsis* deficient in a membrane-bound endo-1→4-β-glucanase. *Planta.* 2001; 212:348-58.
 - Hiwasa, K.; Nakano, R.; Hashimoto, A.; Matsuzaki, M.; Murayama, H.; Inaba, A. y Kubo, Y. European, Chinese and Japanese pear fruits exhibit differential softening characteristics during ripening. *J Exp Bot.* 2004; 55:2281-2290.
 - Holland, N.; Menezes, H.C. y Lafuente, M.T. Carbohydrate metabolism as related to high-temperature conditioning and peel disorders occurring during storage of citrus fruit. *J Agric Food Chem.* 2005; 53:8790-8796.
 - Hoson, T. Regulation of polysaccharides breakdown during auxin induced cell wall loosening. *J Plant Res.* 1993; 106: 369-381.
 - Huang, Q. y Allen, C. Polygalacturonases are required for rapid colonisation and full vitulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. *Physiol. Mol Plant Pathol.* 2000; 57:77-83.
 - Huber, D.J. The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Hortic Rev.* 1983; 5:169-219.
 - Huber, D.J. y O'Donoghue, E.M. Polyuronides in avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening. *Plant Physiol.* 1993; 102:473-480.
 - Hyodo, H.; Yamakawa, S.; Takeda, Y.; Tsuduki, M.; Yokota, A.; Nishitani, K. y Kohchi, T. Active gene expression of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene, XTH9, in inflorescence apices is related to cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 2003; 52:473-482.
 - Imoto, K.; Yokoyama, R. y Nishitani, K. Comprehensive approach to genes involved in cell wall modifications in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 2005; 58:177-192.
 - Iraki, N. M.; Bressan, R. A. y Carpita, N. C. Extracellular polysaccharides and proteins of tobacco cell cultures and changes in composition associated with growth-limiting adaptation to water and saline stress. *Plant Physiol.* 1989; 91:54-

61.

- Ishimaru, M. y Kobayashi, S. Expression of a xyloglucan endo-transglycosylase gene is closely related to grape berry softening. *Plant Sci.* 2002; 162: 621-628.
- Ito, H. y Nishitani, K. Visualization of EXGT-mediated molecular grafting activity in muro by means of a fluorescently labeled xyloglucan oligomer. *Plant and Cell Physiol.* 1999; 40: 1172-1176.
- Jan, A.; Yang, G.; Nakamura, H.; Ichikawa, H.; Kitano, H.; Matsuoka, M.; Matsumoto, H. y Komatsu, S. Characterization of a xyloglucan endotransglucosylase gene that is up-regulated by gibberellin in rice. *Plant Physiol.* 2004; 136:3670-3681.
- Janisiewicz, W.J. y Bors, B. Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61:3261-3267.
- Jarvis, M. C. Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant Cell Environment.* 2003; 26:977-989.
- Jia, Z.; Qin, Q.; Darvill, A. G. y York, W. S. Structure of the xyloglucan produced by suspension-cultured tomato cells. *Carbohydr Res.* 2003; 338:1197-1208.
- Johansson, P.; Brumer, H. 3rd; Baumann, M. J.; Kallas, A. M.; Henriksson, H.; Denman, S. E.; Teeri, T. T. y Jones, T. A. Crystal structures of a poplar xyloglucan endotransglycosylase reveal details of transglycosylation acceptor binding. *Plant Cell.* 2004; 16:874-886.
- John, M.A. y Dey, P.M. Postharvest changes in fruit cell wall. *Adv Food Res.* 1986; 30:139-193.
- Jones, T. M.; Anderson, A.J. y Albersheim, P. Host-pathogen interactions. IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol.* 1972; 2: 153-166.
- Jones, P.J. Clinical nutrition: 7. Functional foods-more than just nutrition. *CMAJ.* 2002; 166:1555-1563.
- Juge, N. Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends Plant Sci.* 2006; 11: 1573 -1586.

- Kacurakova, M.; Smith, A.C.; Gidley, M.J. y Wilson, R.H. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. *Carbohydr Res.* 2002; 337:1145-1153.
- Kahmann, R. y C. Basse, C. Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. *Curr Op Microbiol.* 2001; 4:974-380.
- Kaku, T.; Tabuchi, A.; Wakabayashi, K.; Kamisaka, S. y Hoson, T. Action of xyloglucan hydrolase within the native cell wall architecture and its effect on cell wall extensibility in azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol.* 2002; 43:21-26.
- Kaku, T.; Tabuchi, A.; Wakabayashi, K. y Hoson, T. Xyloglucan oligosaccharides cause cell wall loosening by enhancing xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase activity in azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol.* 2004; 45:77-82.
- Keegstra, K.; Talmadge, K. W.; Bauer, W. D. y Albersheim, P. The structure of plant cell walls: III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiol.* 1973; 51:188-197.
- Keller, B.; Templeton, M. D. y Lamb, C. J. Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein in protoxylem cells of the vascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86:1529-1533.
- Kemsley, E.K. Discriminant analysis of spectroscopic data. (John Wiley and Sons). Principal Components Analysis of the FTIR spectra was performed using the WINDAS. Software package. 1998.
- Keon, J. P. R.; Byrde, R. J. W. y Cooper, R. M. Some aspects of fungal enzymes that degrade plant cell walls. In *Fungal Infection of Plants*. University Press: Cambridge, U.K. 1987; pp 133-157.
- Kieliszewski, M. J. y Shpak, E. Synthetic genes for the elucidation of glycosylation codes for arabinogalactan-proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58:1386-1398.
- Koch, J. L. y Nevins, D. J. Tomato Fruit Cell Wall: I. Use of purified tomato polygalacturonase and pectinmethylesterase to identify developmental changes in pectins. *Plant Physiol.* 1989; 91:816-822.
- Kolattukudy, P. E. Polyesters in higher plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*

2001; 71:1-49.

- Kooiman, P. A method for the determination of amyloid in plant seeds. Recl. TraV. Chim. Pays-Bas 1960; 79: 675-678.
- Kunkel, B.N. y Brooks, D.M. Cross talk between signalling pathways in pathogen defence. Curr Opin Plant Biol. 2002; 5: 325-331.
- Kutschera, U. Cessation of cell elongation in rye coleoptiles is accompanied by a loss of cell wall plasticity. J Exp Bot. 1996; 47: 1387-1394.
- Labavitch, J.M y Ray, P.M. Structure of hemicellulosic polysaccharides of *Avena sativa* coleoptile cell walls. Phytochemistry. 1978; 17:933-937.
- Lashbrook, C. C.; Gonzalez-Bosch, C. y Bennett, A. B. Two divergent endo β -1 \rightarrow 4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. Plant Cell. 1994; 6:1485-1493.
- Lee, D.; Polisensky, D. H. y Braam, J. Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated *Arabidopsis* genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. New Phytol. 2005; 165:429-444.
- Lelievre, J. M.; Tichit, L.; Dao, P.; Fillion, L.; Nam, Y. W.; Pech, J. C. y Latche, A. Effects of chilling on the expression of ethylene biosynthetic genes in Passe-Crassane pear (*Pyrus communis* L.) fruits. Plant Mol Biol. 1997; 33:847-855.
- Leverentz, B.; Conway, W. S.; Janisiewicz, W.; Abadias, M.; Kurtzman, C. P. y Camp, M. J. Biocontrol of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. Appl Environ Microbiol. 2006; 72:1135-1140.
- Levy, S.; York, W. S.; Stuike-Prill, R.; Meyer, B. y Staehelin, L. A. Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosylated sidechain in surface-specific sidechain folding. Plant J. 1991; 1:195-215.
- Levy, S.; Maclachlan, G. y Staehelin, L. A. Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. Plant J. 1997; 11:373-386.
- Lewis, N.G. y Yamamoto, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1990; 41:455-96.
- Li, Y.; Jones, L. y McQueen-Mason, S. Expansins and cell growth. Curr Opin

- Plant Biol. 2003; 6:603-610.
- Lima, D. U.; Loh, W. y Buckeridge, M. S. Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. *Plant Physiol Biochem.* 2004; 42:389-394.
 - Liu, Y.; Hoffman, N. E. y Yang, S. F. Promotion by ethylene of the capability to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in preclimacteric tomato and cantaloupe fruits. *Plant Physiol.* 1985; 77:407-411.
 - Liskay, A.; Kenk, B. y Schopfer, P. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta.* 2003; 217:658-667.
 - Lorences, E. P. y Fry, S. C. Xyloglucan oligosaccharides with at least two R-D-xylose residues act as an acceptor for xyloglucan endotransglycosylase and promote the depolymerization of xyloglucan. *Physiol Plant.* 1993; 88: 105-112.
 - Lorences, E.P. y Fry, S.C. Sequencing of xyloglucan oligosaccharides by partial Driselase digestion: the preparation and quantitative and qualitative analysis of two new tetrasaccharides. *Carbohydr Res.* 1994; 263:285-293.
 - Lund, S.T.; Stall, R.E. y Klee, H.J. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell.* 1998; 10: 371-382.
 - MacAdam, J. W. y Grabber, J. H. Relationship of growth cessation with the formation of diferulate cross-links and *p*-coumaroylated lignins in tall fescue leaf blades. *Planta.* 2002; 215:785-793.
 - Maclachlan, G. y Brady, C. Multiple forms of 1→4-β-glucanase in ripening tomato fruits include a xyloglucanase activatable by xyloglucan oligosaccharides. *Aust J Plant Physiol.* 1992; 19: 137-146.
 - Maclachlan, G. y Brady, C. Endo-1→4-β-glucanase, xyloglucanase and xyloglucan endo-transglycosylase activities versus potential substrates in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 1994; 105: 965-974.
 - Mahajan, S. y Tuteja, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys.* 2005; 444:139-158.
 - Maneerat, C.; Hayata, Y.; Muto, N. y Kuroyanagi, M. Investigation of UV-A light irradiation on tomato fruit injury during storage. *J Food Prot.* 2003; 66:2168-2170.

- Maneerat, C. y Hayata, Y. Antifungal activity of TiO₂ photocatalysis against *Penicillium expansum* in vitro and in fruit tests. *Int J Food Microbiol.* 2006; 107:99-103.
- Marchessault R.G. y Sundararajan P.R. Cellulose. In GO Aspinall, ed. *The Polysaccharides*, Ed 2. Academic Press, New York, 1983; pp. 11-95.
- Marcos, J.F.; González-Candelas, L. y Zacarías, L. Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. *J Exp Bot.* 2005; 56:2183-2193.
- Marga, F.; Grandbois, M.; Cosgrove, D. J. y Baskin, T. I. Cell wall extension results in the coordinate separation of parallel microfibrils: evidence from scanning electron microscopy and atomic force microscopy. *Plant J.* 2005; 43:181-190.
- Masuda, Y. Auxin-induced cell elongation and cell wall changes. *Bot Mag Tokio.* 1990; 103: 345-370.
- Matsui, A.; Yokoyama, R.; Seki, M.; Ito, T.; Shinozaki, K.; Takahashi, T.; Komeda, Y. y Nishitani, K. *AtXTH27* plays an essential role in cell wall modification during the development of tracheary elements. *Plant J.* 2005; 42:525-534.
- Matsumoto, T.; Sakai, F. y Hayashi, T. A Xyloglucan-specific endo-1→4-β-glucanase isolated from auxin-treated pea stems. *Plant Physiol.* 1997; 114:661-667.
- McCann, M. C.; Hammouri, M.; Wilson, R.; Belton, P. y Roberts, K. Fourier transform infrared microspectroscopy is a new way to look at plant cell walls. *Plant Physiol.* 1992; 100:1940-1947.
- McCann, M.C. y Roberts, K. Changes in cell wall architecture during cell elongation. *J. Exp Bot.* 1994; 45:1683-1691.
- McCann, M. C.; Bush, M.; Milioni, D.; Sado, P.; Stacey, N. J.; Catchpole, G.; Defernez, M.; Carpita, N. C.; Hofte, H.; Ulvskov, P.; Wilson, R. H. y Roberts, K. Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall. *Phytochemistry.* 2001; 57:811-821.

- McCollum, T.G.; Huber, D.J. y Cantliffe, D.J. Modification of polyuronides and hemicelluloses during muskmelon fruit softening. *Physiol Plant*. 1989; 6:303-308.
- McDougall, G.J. y Fry, S.C. Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase: evidence for a role of cellulase in cell expansion. *Plant Physiol*. 1990; 93:1042-1048.
- McLauchlan, W.R.; Garcia-Conesa, M.T.; Williamson, G.; Roza, M.; Ravesteyn, P. y Maat, J. A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases. *Biochem J*. 1999; 338:441-446.
- McNeil, M.; Darvill, A. G.; Fry, S. C. y Albersheim, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu Rev Biochem*. 1984; 53:625-663.
- McQueen-Mason, S. J.; Fry, S. C.; Durachko, D. M., y Cosgrove, D. J. The relationship between xyloglucan endotransglycosylase and in-vitro cell wall extension in cucumber hypocotyls. *Planta*. 1993; 190:327-331.
- McQueen-Mason, S. J. y Cosgrove, D. J. Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol*. 1995; 107:87-100.
- Medford, J. I.; Elmer, J. S. y Klee, H. J. Molecular cloning and characterization of genes expressed in shoot apical meristems. *Plant Cell*. 1991; 3:359-370.
- Michelena, V.A. y Boyer, J.S. Complete turgor maintenance at low water potentials in the elongating region of maize leaves. *Plant Physiol*. 1982; 69:1145-1149.
- Miller, J. G. y Fry, S. C. Characteristics of xyloglucan after attack by hydroxyl radicals. *Carbohydr Res*. 2001; 332:389-403.
- Mitcham, E. J.; Gross, K.C. y Ng, T.J. Tomato fruit cell wall synthesis during development and senescence: In vivo radiolabelling of wall fractions using [¹⁴C]sucrose. *Plant Physiol*. 1989; 89:477-481.
- Mitcham, E. J.; Gross, K. C. y Ng, T. J. Ripening and cell wall synthesis in normal and mutant tomato fruit. *Phytochemistry*. 1991; 30:1777-1780.
- Mitcham, E. J. y McDonald, R. E. Cell wall modification during ripening of 'keitt' and 'tommy atkins' mangofruit. *J Am Soc Horti Sci*. 1992; 117: 919-924.
- Nakai, K. y Kanehisa, M. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics*. 1992; 14:897-911.

- Nakamura, T., Yokoyama, R., Tomita, E. y Nishitani, K. Two azuki bean XTH genes, *VaXTH1* and *VaXTH2*, with similar tissue-specific expression profiles, are differently regulated by auxin. *Plant Cell Physiol.* 2003; 44:16-24.
- Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem.* 1944; 153:375-380.
- Nicol, F.; His, I.; Jauneau, A.; Vernhettes, S.; Canut, H. y Hofte, H. A plasma membrane-bound putative endo-1→4-β-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 1998; 17:5563-5576.
- Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S. y von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 1997; 10:1-6.
- Nishitani, K. y Masuda, Y. Auxin-induced changes in the cell wall structure. Changes in the sugar compositions, intrinsic viscosity, and molecular weight distributions of matrix polysaccharides of the epicotyl cell wall of *Vigna angularis*. *Physiol Plant.* 1981; 52:482-494.
- Nishitani, K. y Masuda, Y. Roles of auxin and gibberellic acid in growth and maturation of epicotyls of *Vigna angularis*: Cell wall changes. *Physiol. Plant.* 1982; 56:38-45.
- Nishitani, K. y Masuda, Y. Auxin-induced changes in the cell wall xyloglucans: effect of auxin on the two different subfractions of xyloglucans in the epicotyl cell wall of *Vigna angularis*. *Plant Cell Physiol.* 1983; 24:345-355.
- Nishitani, K. y Tominaga, R. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J Biol Chem.* 1992; 267:21058-21064.
- Nishitani, K. The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. *Int Rev Cytol.* 1997; 173:157-206.
- Nonami, H. y Boyer, J. S. Primary events regulating stem growth at low water potentials. *Plant Physiol.* 1990a; 93:1601-1609.
- Nonami, H. y Boyer, J. S. Wall extensibility and cell hydraulic conductivity decrease in enlarging stem tissues at low water potentials. *Plant Physiol.* 1990b; 93:1610-1619.

- Oda, Y.; Mimura, T. y Hasezawa, S. Regulation of secondary wall development by cortical microtubules during tracheary element differentiation in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiol.* 2005; 137:1027-1036.
- O'Donoghue, E.M. y Huber, D.J. Modification of matrix polysaccharides during avocado (*Persea americana*) fruit ripening: an assessment of the role of Cx-cellulase. *Physiol Plant.* 1992; 86:33-42.
- O'Donoghue, E.M.; Huber, D.J.; Timpa, J.D.; Erdos, G.W. y Brecht, J.K. Influence of avocado (*Persea americana*) Cx-cellulase on the structural features of avocado cellulose. *Planta.* 1994; 194:573-584.
- O'Donoghue E. M.; Somerfield, S. D; de Vre, L. A. y Heyes, J. A. Developmental and ripening-related effects on the cell wall of pepino (*Solanum muricatum*) fruit. *J Sci Food Agric.* 1997; 73:455-463.
- Oeser, B.; Heidrich, P. M.; Muller, U.; Tudzynski, P. y Tenberge, K. B. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. *Fungal Genet Biol.* 2002; 36:176-186.
- Oh, M.H. y Clouse, S.D. Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. *Plant Cell.* 1998; 17: 921-924.
- Oh, S.; Park, S. y Han, K. H. Transcriptional regulation of secondary growth in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot.* 2003; 54:2709-2722.
- Ohmiya, Y.; Samejima, M.; Shiroishi, M.; Amano, Y.; Kanda, T.; Sakai, F. y Hayashi, T. Evidence that endo-1→4-β-glucanases act on cellulose in suspension-cultured poplar cells. *Plant J.* 2000; 24:147-158.
- Okamura J.K. y Goldberg, R.G. Tobacco single-copy DNA is highly homologous to sequences present in the genomes of its diploid progenitors. *Mol Gen Genet.* 1985; 198:290-298.
- Okazawa, K.; Sato, Y.; Nakagawa, T.; Asada, K.; Kato, I.; Tomita, E. y Nishitani, K. Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that mediates molecular grafting between matrix polysaccharides in plant cell walls. *J Biol Chem.* 1993; 268:25364-25368.
- Olmstead, R.G. y Palmer, J.D. Implications for the phylogeny, classification, and biogeography of *Solanum* from cpDNA restriction site variation. *Systematic Bot.* 1997; 22:19-29.

- O'Neill, M. A.; Eberhard, S.; Albersheim, P. y Darvill, A. G. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science*. 2001; 294:846-849.
- Ookawara, R.; Satoh, S.; Yoshioka, T. y Ishizawa, K. Expression of alpha-expansin and xyloglucan endotransglucosylase/ hydrolase genes associated with shoot elongation enhanced by anoxia, ethylene and carbon dioxide in arrowhead (*Sagittaria pygmaea* Miq.) tubers. *Ann Bot (Lond)*. 2005; 96:693-702.
- Palmer, S.J. y Davies, W.J. An analysis of relative elemental growth rate, epidermal cell size and xyloglucan endoglycosylase activity through the growing zone of ageing maize leaves. *J Exp Bot*. 1996; 47:339-348.
- Park, Y. W.; Tominaga, R.; Sugiyama, J.; Furuta, Y.; Tanimoto, E.; Samejima, M.; Sakai, F. y Hayashi, T. Enhancement of growth by expression of poplar cellulase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2003; 33:1099-106.
- Parry, M. L. y Rosenzweig, C. Food supply and risk of hunger. *Lancet*. 1993; 342:1345-1347.
- Parry, R.T. Introduction. In principles and applications of modified atmosphere packaging of food. Ed. Parry, R.T. London. 1993. pp. 1 -18.
- Pauly, M.; Albersheim, P.; Darvill, A. y York, W. S. Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *Plant J*. 1999; 20:629-639.
- Pennell, R. I.; Knox, J. P.; Scofield, G. N.; Selvendran, R. R. y Roberts, K. A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. *J Cell Biol*. 1989; 108:1967-1977.
- Pennell, R. Cell walls: structures and signals. *Curr Opin Plant Biol*. 1998; 1:504-510.
- Percy, A.E.; O'Brien, I.E.W.; Jameson, P.E.; Melton, L.D.; MacRae, E.A. y Redgwell, R. J. Xyloglucan endotransglycosylase activity during fruit development and ripening of apple and kiwifruit. *Physiol Plant*. 1996; 96: 43-50.
- Peschke, V. M. y Sachs, M. M. Characterization and expression of transcripts induced by oxygen deprivation in maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol*. 1994; 104:387-394.

- Phillips, C.A. Review: modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological. Quality and safety of produce. *Int J Food Sci.* 1996.
- Pilling, E. y Hofte, H. Feedback from the wall. *Curr Opin Plant Biol.* 2003; 6:611-616.
- Popper, Z. A. y Fry, S. C. Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells. *Ann Bot (Lond).* 2005; 96:91-99.
- Potter, I. y Fry, S.C. Xyloglucan endotransglycosylase activity in pea internodes. Effects of applied gibberellic acid. *Plant Physiol.* 1993; 103:235-241.
- Potter, I y Fry, S.C. Changes in xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity during hormone-induced growth in lettuce and cucumber hypocotyls and spinach cell cultures. *J Exp Bot.* 1994; 45: 1703-1710.
- Pressey, R. β -Galactosidases in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 1983; 71:132-135.
- Pritchard, J.; Hetherington, P.R.; Fry, S.C. y Tomos, A. Xyloglucan endotransglycosylase activity, microfibril orientation and the profiles of cell wall properties along growing regions of maize roots. *J Exp Bot.* 1993; 44:1281-1289.
- Purugganan, M. M.; Braam, J. y Fry, S. C. The *Arabidopsis* TCH4 xyloglucan endotransglycosylase. Substrate specificity, pH optimum, and cold tolerance. *Plant Physiol.* 1997; 115:181-190.
- Real, M.D.; Company, P.; García-Agustín, P.; Bennett, A.B. y González-Bosch, C. Characterization of tomato endo- β -1 \rightarrow 4-glucanase *Cell* protein in fruit during ripening and after fungal infection. *Planta.* 2004; 220:80-86.
- Redgwell, R.J.; Melton, L.D. y Brasch, D.J. Cell-wall polysaccharides of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*): effect of ripening on the structural features of cell-wall materials. *Carbohydr Res.* 1991; 209:191-202.
- Redgwell, R.J.; Melton, L.D. y Brasch, D.J. Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Solubilization of the pectic polymers. *Plant Physiology.* 1992; 98: 71-81.
- Redgwell, R. J. y Fry, S. C. Xyloglucan endotransglycosylase activity increases during kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) ripening (implications for fruit softening). *Plant Physiol.* 1993; 103:1399-1406.

- Redgwell, R.J.; Fischer, M.; Kendal, E. y MacRae, E.A. Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta*. 1997a; 203:174-18
- Redgwell, R.J.; MacRae, E.A.; Hallett, I.; Fischer, M.; Perry, J. y Harker, R. In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta*. 1997b; 203: 162-173.
- Redgwell, R.J. Dietary fiber as a versatile food component: An industrial perspective. *Mol Nutr Food Res*. 2005; 49:421-535.
- Rees, D. A. y Wight, N. J. Molecular cohesion in plant cell walls. Methylation analysis of pectic polysaccharides from the cotyledons of white mustard. *Biochem J*. 1969; 115:431-439.
- Reid, J.S.G. Cell wall storage carbohydrates in seeds: biochemistry of the seed “gums” y “hemicelluloses.” *Adv Bot Res*. 1985; 11:125-155.
- Renard, C. M.; Lomax, J. A. y Boon, J. J. Apple-fruit xyloglucans: a comparative study of enzyme digests of whole cell walls and of alkali-extracted xyloglucans. *Carbohydr Res*. 1992; 232:303-320.
- Rhodes, M.J.C. The maturation and ripening of fruits. In *Senescence in Plants*, K.V. Thimann, ed (Boca Raton, FL: CRC Press). 1980. pp. 157-205.
- Richmond, T. A. y Somerville, C. R. Integrative approaches to determining CSL function. *Plant Mol Biol*. 2001; 47:131-143.
- Ridley, B. L.; O'Neill, M. A. y Mohnen, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 2001; 57:929-967.
- Rizk, S. E.; Abdel-Massih, R. M.; Baydoun, E. A. y Brett, C. T. Protein- and pH-dependent binding of nascent pectin and glucuronoarabinoxylan to xyloglucan in pea. *Planta*. 2000; 211:423-429.
- Roberts, K.; Grief, C.; Hills, G. J. y Shaw, P. J. Cell wall glycoproteins: structure and function. *J Cell Sci Suppl*. 1985; 2:105-127.
- Roberts, R.G. y Reymond, S.T. Chlorine dioxide for reduction of postharvest pathogen inoculum during handling of tree fruits. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60: 2864-2868.
- Robinson, R. y Tomes, M. Ripening inhibitor: a gene with multiple effects on ripening. *Rep Tomato Genet Coop*. 1968; 18:36-37.

- Rogers, I. M.; Kim, Y.-K.; Guo, W.; Gonzalez-Candelas, L.; Li, D. y Kolattukudy, E. Requirement for either a host- or pectininduced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2000; 97: 9813-9818.
- Romo, S.; Jimenez, T.; Labrador, E. y Dopico, B. The gene for a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase from *Cicer arietinum* is strongly expressed in elongating tissues. Plant Physiol Biochem. 2005; 43:169-176.
- Ronen, R.; Zauberman, G.; Akerman, M.; Weksler, A.; Rot, I. y Fuchs, Y. Xylanase and xylosidase activities in avocado fruit. Plant Physiol. 1991; 95:961-964.
- Rose, J. K.; Lee, H. H. y Bennett, A. B. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94:5955-5960.
- Rose, J.K.C.; Hadfield, K.A.; Labavitch, J.M. y Bennett, A.B. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. Plant Physiol. 1998; 117: 345-361.
- Rose, J.K. y Bennett, A.B. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. Trends Plant Sci. 1999; 4:176-183.
- Rose, J.K.; Braam, J.; Fry, S.C. y Nishitani, K. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. Plant Cell Physiol. 2002; 43:1421-1435.
- Rose, J.K.C.; Bashir, S.; Giovannoni, J.J.; Jahn, M.M. y Saravananl, R.S. Cell wall disassembly. In The Plant Cell Wall (JKC Rose ed), Blackwell. 2003. pp. 264-324.
- Rose, J. K.; Saladie, M. y Catala, C. The plot thickens: New perspectives of primary cell wall modification. Curr Opin Plant Biol. 2004; 7:296-301.
- Rosemer, D. A. Gray mold. In Compendium of Apple and Pear Diseases; Jones, A. L., Aldwinckle, H. S., Eds.; APS Press: St. Paul, MN. 1990; pp. 55-56.
- Ross, G.S.; Redgwell, R.J. y MacRae, E.A. Kiwifruit β -galactosidase: isolation and activity against specific fruit cell-wall polysaccharides. Planta. 1993; 189:499-506.

- Ross, G.S.; Wegrzyn, T.; MacRae, E.A. y Redgwell, R.J. Apple β -galactosidase. Activity against cell wall polysaccharides and characterization of a related cDNA clone. *Plant Physiol.* 1994; 106:521-528.
- Ryser, U. Protoxylem: the deposition of a network containing glycine-rich cell wall proteins starts in the cell corners in close association with the pectins of the middle lamella. *Planta.* 2003; 216:854-864.
- Saab, I.N. y Sachs, M.M. Complete cDNA and genomic sequence encoding a flooding-responsive gene from maize (*Zea mays* L.) homologous to xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Physiol.* 1995; 108:439-440.
- Saab, I. N. y Sachs, M. M. A flooding-induced xyloglucan endo-transglycosylase homolog in maize is responsive to ethylene and associated with aerenchyma. *Plant Physiol.* 1996; 112:385-391.
- Sakurai, N.; Fujihara, S.; Yamamoto, R. y Masuda, Y. A stressrelaxation parameter b of the oat coleoptile cell wall and its implication in cell wall loosening. *Plant Growth Regul.* 1982; 1: 75-83.
- Sakurai, N. Cell wall functions in growth and development. *Bot Mag Tokio.* 1991; 104: 235-251.
- Sakurai, N. y Nevins, D.J. Evaluation of stress-relaxation in fruit tissue. *Hort Technol.* 1992; 2: 398-402.
- Sakurai, N. y Nevins, D.J. Changes in physical properties and cell wall polysaccharides of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pericarp tissues. *Physiol Plant.* 1993; 89: 681-686.
- Sakurai, N. y Nevins, D.J. Relationship between fruit softening and wall polysaccharides in avocado (*Persea americana* Mill) mesocarp tissues. *Plant Cell Physiol.* 1997; 38: 603-610.
- Saladie, M.; Rose, J.K.; Cosgrove, D. J. y Catala, C. Characterization of a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) from ripening tomato fruit and implications for the diverse modes of enzymic action. *Plant J.* 2006; 47:282-295.
- Sánchez-Torres, P. y González-Candelas, L. Isolation and characterization of genes differentially expressed during the interaction between apple fruit and *Penicillium expansum*. *Mol Plant Pathol.* 2003; 4:447-457.

- Sapitnitskaya, M.; Maul, P.; McCollum, G. T.; Guy, C. L.; Weiss, B.; Samach, A. y Porat, R. Postharvest heat and conditioning treatments activate different molecular responses and reduce chilling injuries in grapefruit. *J Exp Bot.* 2006; 57:2943-2953.
- Saxena, I. M. y Brown, R. M. Jr. Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Ann Bot (Lond).* 2005; 96:9-21.
- Scheible, W. R. y Pauly, M. Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Curr Opin Plant Biol.* 2004; 7:285-295.
- Schopfer, P.; Liskay, A.; Bechtold, M.; Frahry, G. y Wagner, A. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta.* 2002; 214: 821-828.
- Schroder, R.; Atkinson, R. G.; Langenkamper, G. y Redgwell, R. J. Biochemical and molecular characterisation of xyloglucan endotransglycosylase from ripe kiwifruit. *Planta.* 1998; 204:242-251.
- Schroder, R.; Wegrzyn, T. F.; Bolitho, K. M. y Redgwell, R. J. Mannan transglycosylase: a novel enzyme activity in cell walls of higher plants. *Planta.* 2004; 219:590-600.
- Sene, C.; McCann, M. C.; Wilson, R. H. y Grinter, R. Fourier-transform raman and fourier-transform infrared spectroscopy (an investigation of five higher plant cell walls and their components). *Plant Physiol.* 1994; 106:1623-1631.
- Seymour, G.B. y Taylor, J.E. *Biochemistry of fruit ripening.* London, New York: Chapman and Hall. Tucker GA. (eds). 1993.
- Seymour, G.B. y Gross, K.C. Cell wall disassembly and fruit softening. *Postharvest News Info.* 1996; 7:45-52.
- Seymour, G. B.; Manning, K.; Eriksson, E. M.; Popovich, A. H. y King, G. J. Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *J Exp Bot.* 2002; 53:2065-2071.
- Shani, Z.; Dekel, M.; Tsabary, G. y Shoseyov, O. Cloning and characterization of elongation specific endo-1 \rightarrow 4- β -glucanase (*Cel1*) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 1997; 34:837-842.
- Shin, Y. K.; Yum, H.; Kim, E. S.; Cho, H.; Gothandam, K. M.; Hyun, J. y Chung, Y. Y. *BcXTH1*, a *Brassica campestris* homologue of *Arabidopsis* XTH9, is

associated with cell expansion. *Planta*. 2006; 224:32-41.

- Showalter, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*. 1993; 5:9-23.
- Sims, I. M.; Munro, S. L.; Currie, G.; Craik, D. y Bacic, A. Structural characterisation of xyloglucan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Carbohydr Res*. 1996; 293:147-172.
- Smith, C.J.S.; Watson, C.F.S.; Ray, J.; Bird, C.R.; Morris, P.C.; Schuch, W. y Grierson, D. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*. 1988; 334:724-726.
- Smith, C. J.S.; Watson, C. F.; Morris, P. C.; Bird, C. R.; Seymour, G. B.; Gray, J. E.; Arnold, C.; Tucker, G. A.; Schuch, W. y Harding, S. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Mol Biol*. 1990; 14:369-379.
- Smith, R. C. y Fry, S. C. Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures. *Biochem J*. 1991; 279:529-535.
- Smith, L.G.; Hake, S. y Sylvester, A.W. The tangled-1 mutation alters cell division orientations throughout maize leaf development without altering leaf shape. *Development*. 1996; 122:481-489.
- Smith, L. G. Plant cell division: building walls in the right places. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2:33-9.
- Smith, D.L.; Abbott, J.A. y Gross, K.C. Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiol*. 2002; 129: 1755-1762.
- Somogyi, M. Notes on sugar determination. *J Biol Chem*. 1952; 195:19-23.
- Spollen W.G.; Wu Y.; Sharp R.E. y Saab I.N. Regulation of cell expansion in roots and shoots at low water potentials. In Smith, J.A.C.; Griffith, H. eds, *Water Deficits: Plant Responses from Cell to Community*. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK. 1993. pp. 37-52.
- Stacey, N.J.; Roberts, K.; Carpita, N.C.; Wells, B. y McCann, M.C. Dynamic changes in cell surface molecules are very early events in the differentiation of mesophyll cells from *Zinnia elegans* into tracheary elements. *Plant J*. 1995; 8: 891-906.

- Steele, N. M. y Fry, S. C. Purification of xyloglucan endotransglycosylases (XETs): a generally applicable and simple method based on reversible formation of an enzyme-substrate complex. *Biochem J.* 1999; 340:207-211.
- Steele, N.M. y Fry, S.C. Differences in catalytic properties between native isoenzymes of xyloglucan endotransglycosylase (XET). *Phytochemistry.* 2000; 54:667-680.
- Steele, N. M.; Sulova, Z.; Campbell, P.; Braam, J.; Farkas, V. y Fry, S. C. Ten isoenzymes of xyloglucan endotransglycosylase from plant cell walls select and cleave the donor substrate stochastically. *Biochem J.* 2001; 355:671-679.
- Sulova, Z. y Farkas, V. Purification of xyloglucan endotransglycosylase based on affinity sorption of the active glycosyl-enzyme intermediate complex to cellulose. *Protein Expr Purif.* 1999; 16:231-235.
- Sweet, D.P.; Shapiro, R.H. y Albersheim, P. Quantitative analysis of various G.L.C. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydr Res.* 1975; 40:217-225.
- Sweet, W.J.; Morrison, J.C.; Labavitch, J.M. y Matthews, M.A. Altered synthesis and composition of cell wall of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves during expansion and growth-inhibiting water deficits. *Plant Cell Physiol.* 1990; 31: 407-414.
- Tabuchi, A.; Mori, H.; Kamisaka, S. y Hoson, T. A new type of endo-xyloglucan transferase devoted to xyloglucan hydrolysis in the cell wall of azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol.* 2001; 42:154-161.
- Takeda, T.; Mitsuishi, Y.; Sakai, F., y Hayashi, T. Xyloglucan endotransglycosylation in suspension-cultured poplar cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1996; 60:1950-1955.
- Takeda, T.; Furuta, Y.; Awano, T.; Mizuno, K.; Mitsuishi, Y. y Hayashi, T. Suppression and acceleration of cell elongation by integration of xyloglucans in pea stem segments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:9055-9060.
- Takeda, T. y Fry, S.C. Control of xyloglucan endotransglucosylase activity by salts and anionic polymers. *Planta.* 2004; 219:722-732.
- Talbott, L.D. y Ray, P.M. Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix polysaccharides: effects of auxin and turgor. *Plant Physiol.* 1992; 98: 369-379.

- Tan, J.; Bednarek, P.; Liu, J.; Schneider, B.; Svatoß, A. y Hahlbrock, K. Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. *Phytochemistry*. 2004; 65:691-699.
- Tepfert, L. y Taylor, M. The permeability of plant cell walls as measured by gel filtration. *Science*. 1987; 213: 761-763.
- Thompson, J. E.; Smith, R. C. y Fry, S. C. Xyloglucan undergoes interpolymeric transglycosylation during binding to the plant cell wall in vivo: evidence from ¹³C/³H dual labelling and isopycnic centrifugation in caesium trifluoroacetate. *Biochem J*. 1997; 327:699-708.
- Thompson, J.E. y Fry, S.C. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta*. 2000; 211:275-286.
- Thompson, J.E. y Fry, S.C. Restructuring of wall-bound xyloglucan by transglycosylation in living plant cells. *Plant J*. 2001; 26:23-34.
- Tieman, D. M.; Harriman, R. W.; Ramamohan, G. y Handa, A. K. An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *Plant Cell*. 1992; 4:667-679.
- Timell, T.E. Wood hemicelluloses. Part I. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. 1964; 19:247-302.
- Tong, C.B.S. y Gross, K.C. Glycosyl-linkage composition of tomato fruit cell wall hemicellulosic fractions during ripening. *Physiol Plant*. 1988; 74: 365-370.
- Uozu, S.; Tanaka-Ueguchi, M.; Kitano, H.; Hattori, K. y Matsuoka, M. Characterization of XET-related genes of rice. *Plant Physiol*. 2000; 122:853-859.
- Van der Hoeven, R.; Ronning, C.; Giovannoni, J.; Martin, G. y Tanksley, S. Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell*. 2002; 14:1441-1456.
- Van Sandt, V. S.; Guisez, Y.; Verbelen, J. P. y Vissenberg, K. Analysis of a xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) from the lycophodiophyte *Selaginella kraussiana* suggests that XTH sequence characteristics and function are highly conserved during the evolution of vascular plants. *J Exp Bot*. 2006; 57:2909-2922.

- Veytsman, B. A. y Cosgrove, D. J. A model of cell wall expansion based on thermodynamics of polymer networks. *Biophys J.* 1998; 75:2240-2250.
- Vincken, J. P.; Beldman, G. y Voragen, A. G. Substrate specificity of endoglucanases: what determines xyloglucanase activity? *Carbohydr Res.* 1997a; 298:299-310.
- Vincken, J. P.; York, W.S; Beldman, C. y Voragen, A.G.J. Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGC. *Plant Physiol.* 1997b; 11: 9-13.
- Vissenberg, K.; Martinez-Vilchez, I. M.; Verbelen, J.P.; Miller, J. G. y Fry, S.C. In vivo colocalization of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of *Arabidopsis* roots. *Plant Cell.* 2000; 12:1229-1237.
- Vissenberg, K.; Fry, S. C. y Verbelen, J. P. Root hair initiation is coupled to a highly localized increase of xyloglucan endotransglycosylase action in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 2001; 127:1125-1135.
- Vissenberg, K.; Van Sandt, V.; Fry, S. C. y Verbelen, J. P. Xyloglucan endotransglucosylase action is high in the root elongation zone and in the trichoblasts of all vascular plants from *Selaginella* to *Zea mays*. *J Exp Bot.* 2003; 54:335-344.
- Vissenberg, K.; Fry, S. C.; Pauly, M.; Hofte, H. y Verbelen, J. P. XTH acts at the microfibril-matrix interface during cell elongation. *J Exp Bot.* 2005a; 56:673-683.
- Vissenberg, K.; Oyama, M.; Osato, Y.; Yokoyama, R.; Verbelen, J.P. y Nishitani, K. Differential expression of *AtXTH17*, *AtXTH18*, *AtXTH19* and *AtXTH20* genes in *Arabidopsis* roots. Physiological roles in specification in cell wall construction. *Plant Cell Physiol.* 2005b; 46:192-200.
- Vogel, J.P.; Raab, T.K.; Schiff, C. y Somerville, S.C. PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2002; 14:2095-2106.
- Vorwerk, S.; Somerville, S. y Somerville, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 2004; 9:203-209.

- Vreeburg, R.A.M. y Fry, S.C. Reactive oxygen species in cell walls. In: 'Anti-oxidants and reactive oxygen species in plants', Blackwell, Oxford Edited by N. Smirnoff. 2005; pp. 215-249.
- Wakabayashi, K.; Yamaura, K.; Sakurai, N. y Kuraishi, S. Unchanged molecular weight distribution of xyloglucans in outer tissue cell walls along intact growing hypocotyls of squash (*Cucurbita maxima* Duch.) seedlings. *Plant Cell Physiol.* 1993; 34: 143-149.
- Wakabayashi, K. Changes in cell wall polysaccharides during fruit ripening. *J Plant Res.* 2004; 113:231-237.
- Walton, J. D. Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* 1994; 104: 1113-1118.
- Wang, K.L.C; Li, H. y Ecker, J.R. Ethylene biosynthesis and signalling networks. *Plant Cell.* 2002; 14: S131-S151.
- Wang, Z. Y.; MacRae, E. A.; Wright, M. A.; Bolitho, K. M.; Ross, G. S. y Atkinson, R. G. Polygalacturonase gene expression in kiwifruit: relationship to fruit softening and ethylene production. *Plant Mol Biol.* 2000; 42:317-328.
- Wang, S. y Tang J. Radio frequency heating: a potential method for post-harvest pest control in nuts and dry products. *J Zhejiang Univ SCI.* 2004; 5:1169-1174.
- Watanabe, S.; Kojima, K.; Ide, Y. y Sasaki, S. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* in vitro. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2000; 63:199-206.
- Whitney, S. E.; Gidley, M. J. y McQueen-Mason, S. J. Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. *Plant J.* 2000; 22:327-34.
- Willats, W. G.; McCartney, L.; Mackie, W. y Knox, J. P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol.* 2001; 47:9-27.
- Williamson, C. E. Ethylene, a metabolic product of diseased and injured plants. *Phytopathology.* 1950; 40: 205-208.
- Wilkening, S. y Bader, A. Quantitative real-time polymerase chain reaction: methodical analysis and mathematical model. *J Biomol Tech.* 2004; 15:107-111.
- Wu, Y.; Spollen, W. G.; Sharp, R. E.; Hetherington, P. R. y Fry, S. C. Root growth maintenance at low water potentials (increased activity of xyloglucan endotransglycosylase and its possible regulation by abscisic acid). *Plant Physiol.* 1994; 106:607-615.

- Wu, Y.; Sharp, R. E.; Durachko, D.M. y Cosgrove, D.J. Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiol.* 1996; 111:765-772.
- Wu, Y. y Cosgrove, D. J. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *J Exp Bot.* 2000; 51:1543-1553.
- Wu, Y.; Jeong, B. R.; Fry, S. C. y Boyer, J. S. Change in XET activities, cell wall extensibility and hypocotyl elongation of soybean seedlings at low water potential. *Planta.* 2005; 220:593-601.
- Xu, W.; Purugganan, M.M.; Polisensky, D. H.; Antosiewicz, D. M.; Fry, S. C. y Braam, J. *Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell.* 1995; 7:1555-1567.
- Xu, W.; Campbell, P.; Vargheese, A.K. y Braam, J. The *Arabidopsis* XET-related gene family: environmental and hormonal regulation of expression. *Plant J.* 1996; 9:879-889.
- Yacoby, N.; Freeman, S.; Dinoor, A.; Kneen, N. T. y Prusky, D. Expression of pectate lyase from *Coletotrichum gloeosporioides* in *C. magna* promotes pathogenicity. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2001; 13: 887-891.
- Yang, S.F. y Hoffman, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol.* 1984; 35:155-189.
- Yao, C.; Conway, W. S. y Sams, C. E. Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from apple fruit. *Phytopathology* 1996; 96: 1160-1166.
- Yao, C; Conway, W.S.; Ren, R.; Smith, D.; Ross, G.S. y Sams, C.E. Gene encoding polygalacturonase inhibitor in apple fruit is developmentally regulated and activated by wounding and fungal infection. *Plant Mol Biol.* 1999; 39:1231-1241.
- Yakushiji, H.; Sakurai, N. y Morinaga, K. Changes in cell-wall polysaccharides from the mesocarp of grape berries during veraison. *Physiol Plant.* 2001; 111:188-195.
- Yashoda, H. M.; Prabha, T. N. y Tharanathan, R. N. Mango ripening-chemical and structural characterization of pectic and hemicellulosic polysaccharides.

- Carbohydr Res. 2005; 340:1335-1342.
- Yokoyama, R. y Nishitani, K. A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol. 2001; 42:1025-33.
 - Yokoyama, R.; Rose, J.K., y Nishitani, K. A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis. Plant Physiol. 2004; 134:1088-1099.
 - York, W. S.; Darvill, A. G. y Albersheim, P. Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. Plant Physiol. 1984; 75:295-297.
 - York, W. S.; Harvey, L. K.; Guillen, R.; Albersheim, P. y Darvill, A. G. Structural analysis of tamarind seed xyloglucan oligosaccharides using β -galactosidase digestion and spectroscopic methods. Carbohydr Res. 1993; 248:285-301.
 - York, W. S.; Kumar Kolli, V. S.; Orlando, R.; Albersheim, P. y Darvill, A. G. The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. Carbohydr Res. 1996; 285:99-128.
 - Yuna, H.P.; Kwonb, C.; Kangb, B.G.; Leec, J.S.; Hand, T.; Change, S.C. y Kima, S. A xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase 1, *XTH1*, is associated with cell elongation in mungbean hypocotyls. Physiol Plant. 2005; 125: 106-117.
 - Zagory, D. y Kader, A.A. Modified atmosphere packaging of fresh produce. Food Technology. Chicago. 1988. Vol.42, pp.70-74, 76-77.
 - Zhang, G. F. y Staehelin, L. A. Functional compartmentation of the golgi apparatus of plant cells : immunocytochemical analysis of high-pressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. Plant Physiol. 1992; 99:1070-1083.
 - Zurek, D.M. y Clouse, S. D. Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. Plant Physiol. 1994; 104:161-170.
 - Zykwincka, A. W.; Ralet, M. C.; Garnier, C. D. y Thibault, J. F. Evidence for in vitro binding of pectin side chains to cellulose. Plant Physiol. 2005; 139:397-407.
 - Zainon, M.A.; Ng, S.Y.; Othman, R.; Goh, L.Y. y Lazan, H. Isolation,

characterization and significance of papaya β -galactanases to cell wall modification and fruit softening during ripening. *Physiol Plant*. 1998; 104:105-115.

Referencias de páginas de internet

<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/fam/GH16.html>

<http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html>

<http://bioinformatics.org/sms/>

<http://clustalw.genome.jp>

<http://dna-9.int-med.uiowa.edu/realtime.htm#rt%20quant>

<http://es.wikipedia.org/wiki/Micrograph%C3%Ada>

<http://labs.plantbio.cornell.edu/xth/tomato.htm>

<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

<http://proligo2.proligo.com/Calculation/calculation.html>

<http://psort.nibb.ac.jp>

http://www.agrobot.com/Info_tecnica/Alternativos/horticultura/AL_000014ho.htm

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>

<http://www.cerc.uga.edu/~mao/intro/outline.htm>

<http://www.cect.org/>

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

<http://www.expasy.org/>

<http://www.fagro.edu.uy/~huertas/docs/cartillatomate.pdf>

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>

<http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

<http://www.plantbio.cornell.edu/XTH>

<http://www.realtimeprimers.org/>

<http://www.sgn.cornell.edu/index.pl>

http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=tomato

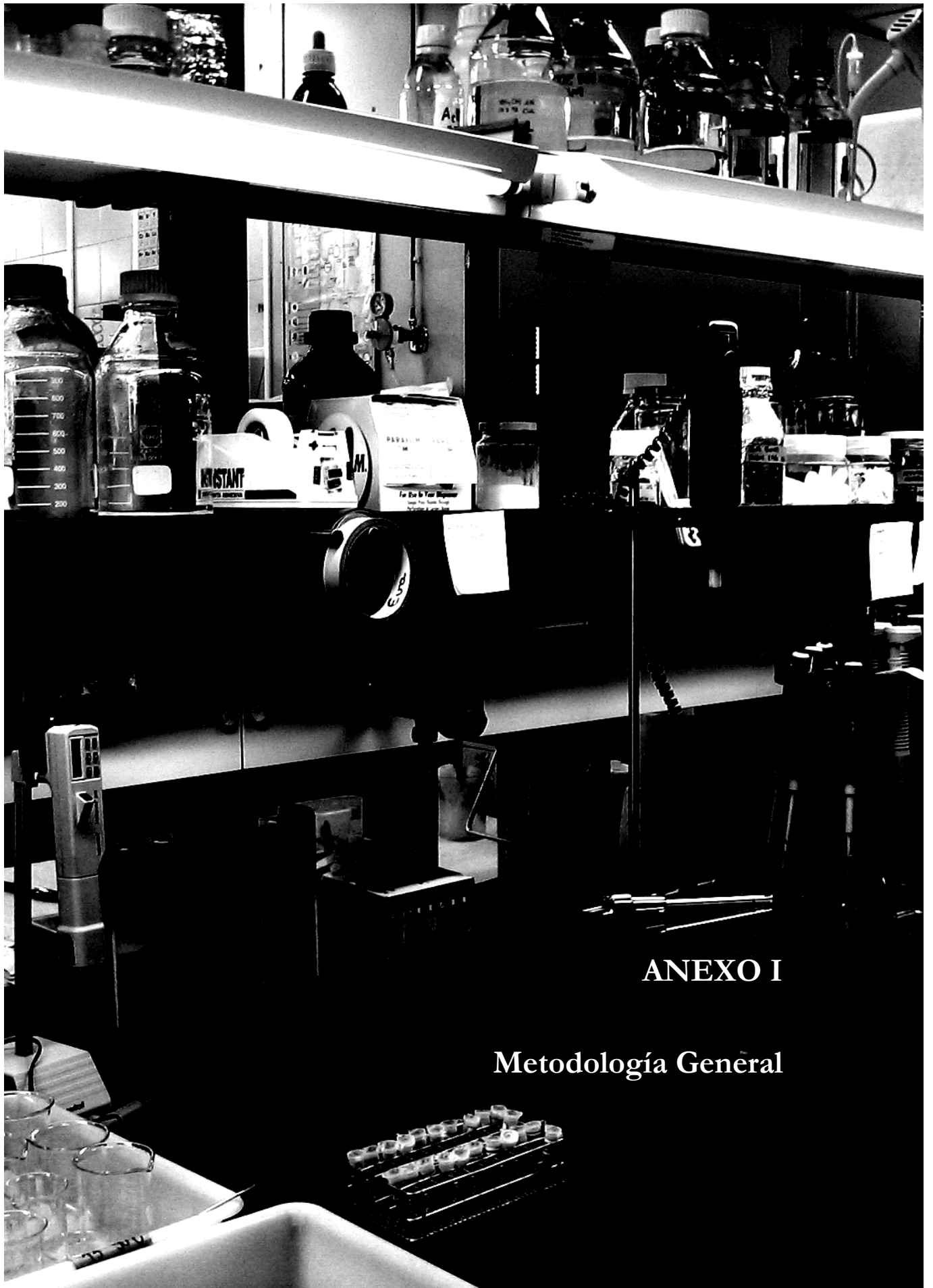
Normativa específica

Normativa descrita para instalaciones y actividades que se desarrollan con organismos modificados genéticamente (OMG) Nivel 3:

- Ley 15/1997 de Junio.
- RD 951/1997 de 20 de Junio.
- Directiva 98/81/CE de 26 de Octubre de 1998
- Ley 9/2003 de 25 de Abril.
- RD 178/2004 de 30 de Enero por el que se aprueba el reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003 de 25 de Abril.

Normativa de gestión de isótopos de vida media nuclear:

- Orden ECO/1449/2003.



ANEXO I

Metodología General

Determinación de ácidos urónicos

(Blumenkratz y Asboe-Hansen, 1973).

A una alícuota de 0,4 ml de muestra acuosa y se le añade 2,4 ml de tetraborato sódico 12,5 mM en H₂SO₄ concentrado. Se enfría en baño de hielo, se hierve durante 5 minutos y se deja enfriar. Se le añade 40 µl de *m*-hidroxibifenilfenol al 0,15% en NaOH al 0,5% y se agita vigorosamente en vortex durante 1 minuto. Tras 5 minutos se mide la absorbancia de la muestra a 520 nm. Se cuantifican los ácidos urónicos haciendo uso de una recta patrón de calibrado de ácido galacturónico (sal sódica, Sigma Che. Co.).

Determinación de azúcares totales

(Dubois *et al.*, 1956).

A una alícuota de 0,4 ml de muestra acuosa y se le añade 0,4 ml de fenol al 5% (v/v) y 2 ml de H₂SO₄ concentrado. Se agita vigorosamente y se deja enfriar durante 30 minutos. Se mide la absorbancia a 490 nm. La cuantificación se lleva a cabo interpolando los valores de la absorbancia de la muestra en una recta patrón de calibrado de glucosa.

Este método infravalora el contenido de azúcares totales si la muestra contiene un elevado porcentaje de ácidos urónicos, ya que generan una respuesta menor que la glucosa al fenol-sulfúrico, como sucede en las fracciones pécticas. Este problema se soluciona sumando los azúcares neutros más los ácidos urónicos de la muestra. Los azúcares neutros se obtienen por la diferencia entre la cantidad de azúcares totales calculados mediante la interpolación en una recta de ácido galacturónico a 490 nm y la cantidad de ácidos urónicos virtuales medidos a 490 nm e interpolados en la misma recta. Los ácidos urónicos son cuantificados mediante la interpolación en una recta patrón de ácido galacturónico medida a 520 nm.

Determinación de xiloglucano

(Kooiman, 1960; modificado por Nishitani y Masuda, 1981).

A una alícuota de 1 ml de muestra acuosa y se le añade 2 ml de Na₂SO₄ al 15% (p/v) en baño de hielo (si la muestra está disuelta en NaOH 1M, se debe neutralizar con 0,1 ml de ácido acético glacial). Se agitan las muestras y se les añade 0,25 ml de una mezcla de I₂ al 0,5% y IK al 1% (p/v) en baño de hielo. Se agita vigorosamente y se mantiene en oscuridad a 4 °C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se mide la absorbancia a 640nm. Para cuantificar el xiloglucano se aplica el factor de respuesta donde DO = 1 se corresponde con 125 µg ml⁻¹, factor descrito para el xiloglucano de Solanáceas (Herbers *et al.* 2001).

Determinación de azúcares reductores

(Somogyi-Nelson, 1952).

A una alícuota de 0,2 ml de muestra acuosa se le añade 0,2 ml del reactivo Somogyi. Se hierve durante 10 minutos y se enfría. Se le añade 0,2 ml del reactivo Nelson y se agita hasta que cese el desprendimiento de CO₂. Se le añade 2,4 ml de agua destilada, se agita y se centrifuga a 12000 g durante 10 minutos, tras lo cual se mide la absorbancia de la muestra a 540 nm. La cuantificación se lleva a cabo interpolando los valores de la absorbancia de la muestra en una recta patrón de calibrado de ácido galacturónico (sal sódica, Sigma Che. Co.).

Reactivo Somogyi

A: Disolver 24 g carbonato sódico y 12 g tartrato sódico en 250 ml agua. Añadir 50 ml de sulfato cúprico al 10%. Añadir 16 g de bicarbonato sódico. B: 100 g de sulfato sódico anhidro en 500 ml de agua (hervir). Mezclar A y B (frías). Completar hasta 1 litro. Dejar reposar 1 semana. Filtrar. Guardar en la oscuridad.

Reactivo Nelson

A: 25 g molibdato amónico en 450 ml de agua. Añadir 25 ml de ácido sulfúrico. B: 3 g de arseniato sódico en 25 ml de agua. Mezclar A y B. Incubar 48 h a 37 °C.

Determinación de azúcares neutros por cromatografía de gases

(Albersheim *et al.*, 1967).

El análisis de azúcares neutros se basa en la formación de alditoles y posterior acetilación de los mismos. La muestra patrón contiene 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cada uno de los siguientes azúcares: ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa. Para la preparación de alditol-acetatos se pesa 1 g de paredes celulares y se le añade 1 ml de TFA 2 N que contiene 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de mio-inositol tanto a las muestras como a los patrones. Se hidroliza a 121 °C durante 1 hora y se recoge la fracción soluble. Se deja secar bajo corriente de aire a 50 °C, para eliminar el ácido. Se añade 0,5 ml de NaBH_4 (20 mg ml^{-1} disuelto en NH_4OH 1N) y se mantiene a temperatura ambiente durante 1 hora para la reducción de los azúcares hasta alditoles. Se añaden unas gotas de ácido acético glacial hasta que cesa el desprendimiento de hidrógeno, para eliminar el exceso de borohidruro. Se secan bajo corriente de aire a 50 °C y se lavan 5 veces con 1 ml de metanol, para eliminar el exceso de borato producido en la acetilación. A continuación, se añade 1 ml de anhídrido acético, se incuba a 121 °C durante 3 h para acetilar la muestra y se deja enfriar hasta la formación de cristales de acetato sódico. Se decanta la fase soluble y se seca bajo corriente de aire a temperatura ambiente. Se añade agua destilada y diclorometano, se agita bien y se centrifuga. Se inyectan 2 μl de la fase orgánica (inferior) de las muestras y los patrones en el cromatógrafo de gases Shimadzu GC-14A con detector FID y columna Teknokroma 3% SP-2340 Supelcoport 100/120 de 1,2 m de longitud y diámetro interior de 3 mm. Se usa helio como gas transportador inerte (35 ml min^{-1}) y oxígeno e hidrógeno para el FID. Las condiciones térmicas de la determinación son de 210 °C de temperatura en la columna, 230 °C de temperatura en el inyector y 250 °C de temperatura en el detector. Los azúcares neutros se cuantificaron mediante los valores resultantes de la muestra patrón de azúcares y del patrón interno de mio-inositol, mediante el cálculo de los $\text{RF}_{\text{azúcar}}$ ($\text{área mio-inositol}/\text{área azúcar}$)_{patrón}. De modo que los μg de un azúcar en la muestra = ($\text{área azúcar}/\text{área mio-inositol}$)_{muestra} x $\text{RF}_{\text{azúcar}}$ x 100.

Cuantificación de proteínas

(Bradford, 1976).

A un volumen de 0,8 ml de muestra acuosa se le añadieron 0,2 ml de reactivo de determinación (Comassie Brilliant Blue G-250, Bio-Rad. California, EEUU). Se agitó y tras 5 minutos se midió la absorbancia a 595 nm. La cuantificación se llevó a cabo usando una recta patrón de albúmina bovina (Sigma, Che. Co.).

Sustratos para la actividad XET

Obtención de xiloglucano parcialmente purificado

Se toman 200 mg de hemicelulosas de manzana y se disuelven en 20 ml de CaCl_2 al 15% (p/v). Se centrifugan a 15000 g durante 30 minutos. Al sobrenadante se le añaden 2 ml de una mezcla de I_2 al 3% y IK al 4% y se mantiene a 4 °C durante 2 horas. Se centrifuga a 15000 g durante 30 minutos y el precipitado se disuelve en 20 ml de agua caliente. Se neutraliza con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, se dializa frente a agua destilada durante 1-2 días, se concentra en rotavapor y se determina el contenido en azúcares totales y xiloglucano.

Obtención de oligosacáridos del xiloglucano. Identificación por cromatografía líquida en capa fina

Se incubaron 0,1 g de hemicelulosas en 10 ml de ácido acético 50 mM ajustado con NaOH 1 M a pH 4,7 con 10 mg de celulasa de *Trichoderma reesei* (ATCC 26921, C-8546 Sigma Che. Co.) durante 3 horas a 25 °C. Se centrifugó 5 minutos a 2500 g y el sobrenadante se separó por cromatografía de exclusión molecular en columna de Bio-Gel® P-2 Fine (Bio-Rad. California, EEUU) eluida con ácido acético 50 mM ajustado con piridina a pH 4,7. Se recogieron 100 fracciones de 2 ml cada una y se cuantificaron los azúcares totales con el objetivo de acotar el pico donde eluyen los heptasacáridos. Se evaporaron las fracciones seleccionadas para eliminar la piridina y el ácido acético y se diluyeron en agua. Se cargaron 20 µg de azúcares de cada fracción y se identificaron los oligosacáridos por TLC (cromatografía en capa fina) en

cromatofolios (20 x 20 cm) AL Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Alemania) usando como solvente propanol:nitrometano:agua (5:2:3; v/v/v) y maltoheptaosa y glucosa (Sigma Che. Co.) como patrones. Se reveló la placa pulverizando etanol:H₂SO₄ (9:1; v/v) e incubando 10 minutos a 100 °C. Los oligosacáridos se identificaron mediante el valor de R_f de la muestra que indica la distancia que migra el oligosacárido respecto al frente del solvente en la placa, en función de su estructura y tamaño. (Fry, 1988)

Marcaje e identificación de oligosacáridos del xiloglucano con [³H]

Se tomaron 3 mg del heptasacárido XXXG, identificado por cromatografía líquida en capa fina y se mezclaron con 925 MBq de NaB₃H₄ (0,946 mg, radioactividad específica 37 TBq/mol) en 250 µl de NH₄OH 1N. La muestra se dejó durante 18 horas a temperatura ambiente para asegurarse de que los azúcares se habían reducido a alditoles. Se añadieron 250 µl de ácido acético glacial y se mantuvo en agitación durante 18 horas, para eliminar el exceso de borohidruro y el desprendimiento de ³H₂. Después se llevó el alditol marcado a un volumen de 1 ml con ácido acético:piridina:agua (1/1/98). Se desaló en una columna de Bio-Gel® P-2 Fine (Bio-Rad. California, EEUU), se recogieron fracciones de 1 ml y se les cuantificó la radioactividad y el contenido en azúcares de cada una de ellas. Se identificaron las fracciones que contenían el XXXG marcado con tritio y se mezclaron. Se determinó la radioactividad específica resultando 8,6 TBq/mol y la eficiencia porcentual del marcaje, que fue de 23,2%. Tras alicuotarse se congeló a -25 °C.

Análisis bayesiano de datos

Los análisis estadísticos suele ser difíciles de implementar en ciertos modelos biológicos, los cuales se adaptan mejor a un análisis que considere los antecedentes previos del suceso y los asocie con los esperados. Por ello, se aplicó el análisis Bayesiano a los datos de extensibilidad de hipocótilos, productividad de las plantas, dureza de los frutos y producción de etileno de los estadios de maduración de los mismos, puesto que se ajustan perfectamente al axioma explicado anteriormente.

Así, el análisis Bayesiano permite la comparación de dos medias estrictamente positivas (μ_1 y μ_2) de dos poblaciones con distribución normal y la misma varianza desconocida (σ^2). Se basa en muestras tomadas al azar y cuyos tamaños pueden ser distintos, como por ejemplo: $x = \{x_1, \dots, x_n\}$ donde $N(x | \mu_1, \sigma)$ y $y = \{y_1, \dots, y_m\}$ desde $N(y | \mu_2, \sigma)$. El valor de interés es el ratio entre las medias de las poblaciones ($\Phi = \mu_1 / \mu_2$), el cual es necesario para la obtención de la distribución posterior $\pi(\Phi | x, y)$. Haciendo uso del algoritmo propuesto por Bernardo, 1979 y Berger y Bernardo, 1992 y considerando que las muestras tienen un tamaño moderado donde $n \geq 1$, $m \geq 1$ y $S^2 = n \sum_i (x_i - \bar{x})^2 + m \sum_i (y_i - \bar{y})^2$, podemos expresar el paradigma Bayesiano como sigue:

$$\pi(\Phi | x, y) \approx N(\Phi | \bar{x}/\bar{y}, \sqrt{((S^2/n+m) (nx^2+my^2/mny^4))})$$



ANEXO II

El cultivo del tomate

EL CULTIVO DEL TOMATE

Origen

El origen del género *Solanum lycopersicum* L. se localiza en la región andina que se extiende desde el sur de Colombia al norte de Chile, pero fue en México donde se domesticó. Durante el siglo XVI se consumían en México tomates de distintas formas y tamaños e incluso verdes y amarillos, pero por entonces ya habían sido traídos a España y servían como alimento en el Mediterráneo. En otros países europeos solo se utilizaban en farmacia y así se mantuvieron en Alemania hasta comienzos del siglo XIX. Los españoles y portugueses difundieron el tomate a Oriente Medio y África, y de allí a otros países asiáticos, y de Europa también se difundió a Estados Unidos y Canadá.

Taxonomía y morfología

Familia: *Solanaceae*.

Especie: *Solanum lycopersicum* L. (Olmstead y Palmer, 1997). Antes denominado: *Lycopersicum esculentum* Mill.

Planta: Perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual. Puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas).

Sistema radicular: Raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias.

Tallo principal: Eje con un grosor que oscila entre 2-4 cm en su base, sobre el que se van desarrollando hojas, tallos secundarios (ramificación simpoidal) e inflorescencias.

Hoja: Compuesta e imparipinnada, con folíolos peciolados, lobulados y con borde dentado, en número de 7 a 9 y recubiertos de pelos glandulares. Las hojas se disponen de forma alternativa sobre el tallo. Los haces vasculares son prominentes, sobre todo en el envés, y constan de un nervio principal.

Flor: Es perfecta, regular e hipógina y consta de 5 o más sépalos, de igual número de pétalos de color amarillo y dispuestos de forma helicoidal a intervalos de 135°, de igual número de estambres soldados que se alternan con los pétalos y forman un cono estaminal que envuelve al gineceo, y de un ovario bi o plurilocular. Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso (dicasio), generalmente en número de 3 a 10. Es frecuente que el eje principal de la inflorescencia se ramifique por debajo de la primera flor formada dando lugar a una inflorescencia compuesta, de forma que se han descrito algunas con más de 300 flores. La primera flor se forma en la yema apical y las demás se disponen lateralmente por debajo de la primera, alrededor del eje principal. La flor se une al eje floral por medio de un pedicelo articulado que contiene la zona de abscisión, que se distingue por un engrosamiento con un pequeño surco originado por una reducción del espesor del cortex. Las inflorescencias se desarrollan cada 2-3 hojas en las axilas.

Fruto: Baya bi o plurilocular que puede alcanzar un peso que oscila entre unos pocos miligramos y 600 gramos. Está constituido por el pericarpo, el tejido placentario y las semillas. El fruto puede recolectarse separándolo por la zona de abscisión del pedicelo, como ocurre en las variedades industriales, en las que es indeseable la presencia de parte del pecíolo, o bien puede separarse por la zona peduncular de unión al fruto.

Importancia económica y distribución geográfica

El tomate es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos

años se debe principalmente al aumento en el rendimiento, y en menor proporción, al aumento de la superficie cultivada.

El tomate en fresco se consume principalmente en ensaladas, cocido o frito. En mucha menor escala se utiliza como encurtido.

Países	Producción tomates Año 2002 (toneladas)		
		Grecia	2.000.000
		Federación de Rusia	1.950.000
		Chile	1.200.000
China	25.466.211	Portugal	1.132.000
Estados Unidos	10.250.000	Ucrania	1.100.000
Turquía	9.000.000	Uzbekistán	1.000.000
India	8.500.000	Marruecos	881.000
Italia	7.000.000	Nigeria	879.000
Egipto	6.328.720	Francia	870.000
España	3.600.000	Túnez	850.000
Brasil	3.518.163	Argelia	800.000
Irán	3.000.000	Japón	797.600
México	2.100.000	Argentina	700.000

Fuente: F.A.O.

Tipos de tomates comercializados

Principales tipos de tomate comercializados:

Tipo Beef: Plantas vigorosas hasta el 6°-7° racimos, a partir del cual pierde bastante vigor coincidiendo con el engorde de los primeros racimos. Frutos de gran tamaño y poca consistencia. Producción precoz y agrupada. Cierre pistilar irregular.

Tipo Marmande: Plantas poco vigorosas que emiten de 4 a 6 racimos aprovechables. El fruto se caracteriza por su buen sabor y su forma acostillada, achatada y multilocular, que puede variar en función de la época de cultivo.

Tipo Vemone: Plantas finas y de hoja estrecha, de porte indeterminado y marco de plantación muy denso. Frutos de calibre grande que presentan un elevado grado de acidez y azúcar, inducido por el agricultor al someterlo a estrés hídrico. Son variedades con pocas resistencias a enfermedades.

Tipo Money Maker: Plantas de porte generalmente indeterminado. Frutos de calibre mediano, lisos, redondos y con buena formación en racimo.

Tipo Cocktail: Plantas muy finas de crecimiento indeterminado. Frutos de peso comprendido entre 30 y 50 gramos, redondos, generalmente con 2 lóculos, sensibles al rajado y usados principalmente como adorno de platos. También existen frutos aperados que presentan las características de un tomate de industria debido a su consistencia, contenido en sólidos solubles y acidez, aunque su consumo se realiza principalmente en fresco.

Tipo Cereza (Cherry): Plantas vigorosas de crecimiento indeterminado. Frutos de pequeño tamaño y de piel fina con tendencia al rajado, puesto que es muy sensible a los cambios bruscos de temperatura. Se agrupan en ramilletes de 15 a más de 50 frutos. Sabor dulce y agradable.

Tipo Larga Vida: Tipo mayoritariamente cultivado en la provincia de Almería. La introducción de los genes *Nor* y *Rin* es la responsable de su larga vida, confiriéndole mayor consistencia y gran conservación de los frutos de cara a su comercialización, en detrimento del sabor. Generalmente se buscan frutos de calibres grandes y medianos, de superficie lisa y coloración uniforme anaranjada o roja.

Tipo Ramillete: Cada vez más presente en los mercados, resulta difícil definir que tipo de tomate es ideal para ramillete, aunque generalmente se buscan las siguientes características: frutos de calibre mediano, de color rojo vivo, insertos en ramilletes en forma de raspa de pescado.

Requerimientos edafoclimáticos

El manejo racional de los factores climáticos de forma conjunta es fundamental para el funcionamiento adecuado del cultivo, ya que todos se encuentran estrechamente relacionados y la actuación sobre uno de estos incide sobre el resto.

Temperatura: La temperatura óptima de desarrollo oscila entre 20 y 30 °C durante el día y entre 1 y 17 °C durante la noche; temperaturas superiores a los 30-35 °C afectan a la fructificación, por mal desarrollo de óvulos y al desarrollo de la planta en general y del sistema radicular en particular. Temperaturas inferiores a 12-15 °C también originan problemas en el desarrollo de la planta. A temperaturas superiores a 25 °C e inferiores a 12 °C la fecundación es defectuosa o nula.

La maduración del fruto está muy influida por la temperatura en lo referente tanto a la precocidad como a la coloración, de forma que valores cercanos a los 10 °C así como superiores a los 30 °C originan tonalidades amarillentas.

No obstante, los valores de temperatura descritos son meramente indicativos, debiendo tener en cuenta las interacciones de la temperatura con el resto de los parámetros climáticos.

Humedad: La humedad relativa óptima oscila entre un 60% y un 80%. Humedades relativas muy elevadas favorecen el desarrollo de enfermedades aéreas, fúngicas y el agrietamiento del fruto, además de dificultar la fecundación, debido a que el polen se compacta, abortando parte de las flores. El rajado del fruto igualmente puede tener su origen en un exceso de humedad edáfica o riego abundante tras un período de estrés hídrico. También una humedad relativa baja dificulta la fijación del polen al estigma de la flor.

Luminosidad: Valores reducidos de luminosidad pueden incidir de forma negativa sobre los procesos de la floración, fecundación así como el desarrollo vegetativo de la planta. En los momentos críticos durante el período vegetativo resulta crucial la interrelación existente entre la temperatura diurna y nocturna y la luminosidad.

Suelo: La planta de tomate no es muy exigente en cuanto a suelos, excepto en lo que se refiere al drenaje, aunque prefiere suelos sueltos de textura silíceo-arcillosa y ricos en materia orgánica. No obstante, se desarrolla perfectamente en suelos arcillosos enarenados. En cuanto al pH, los suelos pueden ser desde ligeramente ácidos hasta ligeramente alcalinos cuando están enarenados. Es la especie cultivada en invernadero que mejor tolera las condiciones de salinidad tanto del suelo como del agua de riego.

Fertilización carbónica: La aportación de CO₂ permite compensar el consumo de las plantas y garantiza el mantenimiento de una concentración superior a la media en la atmósfera del invernadero; así la fotosíntesis se estimula y se acelera el crecimiento de las plantas. Del enriquecimiento en CO₂ del invernadero depende la calidad, la productividad y la precocidad de los cultivos. Hay que tener presente que un exceso de CO₂ produce daños debidos al cierre de los estomas, que cesan la fotosíntesis y pueden originar quemaduras. En el cultivo del tomate las cantidades óptimas de CO₂ son de 700-800 ppm. En cuanto a los rendimientos netos dan incrementos del 15-25% en función del tipo de invernadero y el sistema de control climático.

Particularidades del cultivo

Marcos de plantación: El marco de plantación se establece en función del porte de la planta, que a su vez dependerá de la variedad comercial cultivada. El más frecuentemente empleado es de 1,5 metros entre líneas y 0,5 metros entre plantas, aunque cuando se trata de plantas de porte medio es común aumentar la densidad de plantación a 2 plantas por metro cuadrado con marcos de 1 m x 0,5 m. Cuando se tutoran las plantas con perchas, las líneas deben ser “pareadas” para poder pasar las plantas de una línea a otra formando una cadena sin fin, dejando pasillos amplios para la bajada de perchas (aproximadamente de 1,3 m) y una distancia entre líneas conjuntas de unos 70 cm.

Poda de formación: Es una práctica imprescindible para las variedades de crecimiento indeterminado. Se realiza a los 15-20 días del trasplante con la

aparición de los primeros tallos laterales, que serán eliminados, al igual que las hojas más viejas, mejorando así la aireación del cuello y facilitando la realización del aporcado. Así mismo se determinará el número de tallos a dejar por planta. Son frecuentes las podas a 1 o 2 brazos, aunque en tomates de tipo Cherry suelen dejarse 3 y hasta 4 tallos.

Aporcado y rehundido: Práctica que se realiza en suelos enarenados tras la poda de formación, con el fin de favorecer la formación de un mayor número de raíces, y que consiste en cubrir la parte inferior de la planta con arena. El rehundido es una variante del aporcado que se lleva a cabo doblando la planta, tras haber sido ligeramente rascada, hasta que entre en contacto con la tierra, cubriéndola ligeramente con arena, dejando fuera la yema terminal y un par de hojas.

Tutorado: Es una práctica imprescindible para mantener la planta erguida y evitar que las hojas, y sobre todo los frutos, toquen el suelo, mejorando así la aireación general de la planta y favoreciendo el aprovechamiento de la radiación y la realización de las labores culturales. Todo ello repercutirá en la producción final, calidad del fruto y control de las enfermedades.

La sujeción suele realizarse con hilo de polipropileno (rafia) sujeto de una extremo a la zona basal de la planta (liado, anudado o sujeto mediante bridas) y de otro a un alambre situado a determinada altura por encima de la planta (1,8-2,4 m sobre el suelo). Conforme la planta va creciendo se va liando o sujetando al hilo tutor mediante bridas, hasta que la planta alcance el alambre. A partir de este momento existen tres opciones:

- Bajar la planta descolgando el hilo. Este sistema está empezando a introducirse con la utilización de un mecanismo de sujeción denominado “de perchas”, que consiste en colocar las perchas con hilo enrollado alrededor de ellas para ir dejándolo caer conforme la planta va creciendo, sujetándola al hilo mediante clips. De esta forma la planta siempre se desarrolla hacia arriba, recibiendo el máximo de luminosidad, por lo que incide en una mejora de la calidad del fruto y un incremento de la producción.

- Dejar que la planta crezca cayendo por propia gravedad.
- Dejar que la planta vaya creciendo horizontalmente sobre los alambres del emparrillado.

Destallado: Consiste en la eliminación de brotes axilares para mejorar el desarrollo del tallo principal. Debe realizarse con la mayor frecuencia posible (semanalmente en verano-otoño y cada 10-15 días en invierno) para evitar la pérdida de biomasa fotosintéticamente activa y la realización de heridas. Los cortes deben ser limpios para evitar la posible entrada de enfermedades. En épocas de riesgo es aconsejable realizar un tratamiento fitosanitario con algún fungicida-bactericida cicatrizante, como pueden ser los derivados del cobre.

Deshojado: Es recomendable tanto en las hojas senescentes, con objeto de facilitar la aireación y mejorar el color de los frutos, como en hojas enfermas, que deben sacarse inmediatamente del invernadero, eliminando así la fuente de inóculo.

Despunte de inflorescencias y aclareo de frutos: Ambas prácticas están adquiriendo cierta importancia desde hace unos años, con la introducción del tomate en racimo, y se realizan con el fin de homogeneizar y aumentar el tamaño de los frutos restantes, así como su calidad. Se distinguen dos tipos de aclareo: el aclareo sistemático sobre los racimos, dejando un número de frutos fijo, eliminando los frutos inmaduros mal posicionados. Y el aclareo selectivo sobre frutos, que reúnen determinadas condiciones independientemente de su posición en el racimo; como pueden ser: frutos dañados por insectos, deformes y aquellos que tienen un reducido calibre.

Fertirrigación: En los cultivos protegidos de tomate el aporte de agua y gran parte de los nutrientes se realiza de forma generalizada mediante riego por goteo y va ser función del estado fenológico de la planta así como del ambiente en que ésta se desarrolla (tipo de suelo, condiciones climáticas, calidad del agua de riego, etc.).

En cultivo en suelo y en enarenado; el establecimiento del momento y volumen de riego vendrá dado básicamente por los siguientes parámetros:

- Tensión del agua en el suelo (tensión mátrica), que se determinará mediante un manejo adecuado de tensiómetros, siendo conveniente regar antes de alcanzar los 20-30 centibares.
- Tipo de suelo (capacidad de campo, porcentaje de saturación).
- Evapotranspiración del cultivo.
- Eficacia de riego (uniformidad de caudal de los goteros).
- Calidad del agua de riego (a peor calidad, mayores son los volúmenes de agua).

En la práctica en los enarenados de Almería la frecuencia de riego para un cultivo ya establecido es de 2-3 veces por semana en invierno, aumentando a 4-7 veces por semana en primavera-verano, con caudales de 2-3 litros por planta.

En cultivo hidropónico el riego está automatizado y existen distintos sistemas para determinar las necesidades de riego del cultivo, siendo el más extendido el empleo de bandejas de riego a la demanda. El tiempo y el volumen de riego dependerán de las características físicas del sustrato.

En cuanto a la nutrición por los **macroelementos**, cabe destacar la importancia de la relación N/K a lo largo de todo el ciclo de cultivo, que suele ser de 1/1 desde el trasplante hasta la floración, cambiando hasta 1/2 e incluso 1/3 durante el período de recolección. En el cultivo del tomate en racimo el papel del potasio en la maduración del tomate es esencial, pudiéndose emplear en forma de nitrato potásico, sulfato potásico, fosfato monopotásico o mediante quelatos.

La adición de inhibidores de la nitrificación ralentizan la oxidación de amonio a nitrato, de manera que el amonio se mantiene durante más tiempo en el suelo, ya que este tipo de fertilizantes afectan a las bacterias que participan en este proceso. De esta manera el nitrógeno se suministra de forma gradual, ya que se adapta a las necesidades de cada cultivo a lo largo de su periodo de desarrollo y disminuyen las pérdidas de nitrato por lixiviación y desnitrificación, pues el efecto contrario tiene lugar con la adición de abonos minerales con elevado contenido en nitrógeno amoniacal.

El fósforo juega un papel relevante en las etapas de enraizamiento y floración, ya que es determinante sobre la formación de raíces y sobre el tamaño de las flores. En ocasiones se abusa de él, buscando un acortamiento de entrenudos en las épocas tempranas en las que la planta tiende a ahilarse. Durante el invierno hay que aumentar el aporte de este elemento, así como de magnesio, para evitar fuertes carencias por enfriamiento del suelo.

El calcio es otro macroelemento fundamental en la nutrición del tomate para evitar la necrosis apical (blossom end rot), ocasionado normalmente por la carencia o bloqueo del calcio en terrenos generalmente salinos o por graves irregularidades en los riegos.

Entre los **microelementos** de mayor importancia en la nutrición del tomate está el hierro, que juega un papel primordial en la coloración de los frutos, y en menor medida en cuanto a su empleo, se sitúan manganeso, zinc, boro y molibdeno.

A la hora de abonar, existe un margen muy amplio de abonado en el que no se aprecian diferencias sustanciales en el cultivo, pudiendo encontrar “recetas” muy variadas y contradictorias dentro de una misma zona, con el mismo tipo de suelo y la misma variedad. No obstante, para no cometer grandes errores, no se deben sobrepasar dosis de abono total superiores a 2 g l⁻¹, siendo común aportar 1 g l⁻¹ para aguas de conductividad próxima a 1 mS cm⁻¹.

Actualmente se emplean básicamente dos métodos para establecer las necesidades de abonado:

- En función de las extracciones del cultivo, sobre las que existe una amplia y variada bibliografía.
- En base a una solución nutritiva “ideal” a la que se ajustarán los aportes previo análisis de agua. Este método es el que se emplea en cultivos hidropónicos, y para poder llevarlo a cabo en suelo o en enarenado, requiere la colocación de sondas de succión para poder determinar la composición de la solución del suelo mediante análisis de macro y micronutrientes, conductividad eléctrica y pH.

Los fertilizantes de uso más extendidos son los abonos simples en forma de sólidos solubles (nitrato cálcico, nitrato potásico, nitrato amónico, fosfato monopotásico, fosfato monoamónico, sulfato potásico, sulfato magnésico) y en forma líquida (ácido fosfórico, ácido nítrico), debido a su bajo coste y a que permiten un fácil ajuste de la solución nutritiva, aunque existen en el mercado abonos complejos sólidos cristalinos y líquidos que se ajustan adecuadamente, solos o en combinación con los abonos simples, a los equilibrios requeridos en las distintas fases de desarrollo del cultivo.

El aporte de microelementos, que años atrás se había descuidado en gran medida, resulta vital para una nutrición adecuada, pudiendo encontrar en el mercado una amplia gama de sólidos y líquidos en forma mineral y en forma de quelatos, cuando es necesario favorecer su estabilidad en el medio de cultivo y su absorción por la planta.

La clorosis férrica es característica de especies que crecen en suelos calizos. La deficiencia en hierro acorta el ciclo vital de las plantas, los rendimientos disminuyen y los frutos son de peor calidad. El quelato férrico, es una de las mejores soluciones para combatir la clorosis férrica, pero tienen un elevado precio, por ello si se disminuyen las cantidades de quelato que se aplican se reducirían costos y aumentarían los beneficios.

También se dispone de numerosos correctores de carencias tanto de macro como de micronutrientes que pueden aplicarse vía foliar o riego por goteo, aminoácidos de uso preventivo y curativo, que ayudan a la planta en momentos críticos de su desarrollo o bajo condiciones ambientales desfavorables, así como otros productos (ácidos húmicos y fúlvicos, correctores salinos, etc.), que mejoran las condiciones del medio y facilitan la asimilación de nutrientes por la planta.

Las sustancias húmicas complejan la mayoría de los metales presentes en el suelo, aumentando su disponibilidad en las plantas. Los aminoácidos también juegan un papel importante en la captación de nutrientes.

La fertirrigación carbónica consiste en el uso de agua carbonatada para el riego. El agua carbonatada se consigue mediante la inyección de CO₂ a presión en la tubería principal de manera que al disolverse en el agua de riego produce ácido carbónico que reduce el pH del agua y origina diversos bicarbonatos al reaccionar con carbonatos y otras sales presentes en el agua. El agua carbonatada recibe a continuación los fertilizantes habituales para el riego cuya solubilidad mejora en un agua ligeramente ácida.

La utilización del agua carbonatada es rentable en el cultivo del tomate; encontrándose la dosis óptima en torno a los 0,20 g de CO₂ l⁻¹, produciendo los mayores incrementos de cosecha. El mayor tamaño de los frutos se alcanza con una dosis de 0,35 g de CO₂ l⁻¹.

Plagas y enfermedades

Plagas

- Araña roja (*Tetranychus urticae* (Koch), *T. turkestanii* (Ugarov & Nikolski) y *T. ludeni* (Tacher)).
- Vasate (*Aculops lycopersici* (Masse)).
- Mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum* (West) y *Bemisia tabaci* (Genn.)).
- Pulgón (*Aphis gossypii* (Sulzer) y *Myzus persicae* (Glover)).
- Trips (*Frankliniella occidentalis* (Pergande)).
- Minadores de hoja (*Liriomyza trifolii* (Burgess), *Liriomyza bryoniae*, *Liriomyza strigata*, *Liriomyza huidobrensis*).
- Orugas (*Spodoptera exigua* (Hübner), *Spodoptera litoralis* (Boisduval), *Heliothis armigera* (Hübner), *Heliothis peltigera* (Dennis y Schiff), *Chrysodeisis chalcites* (Esper), *Autographa gamma* (L.)).
- Nemátodos (*Meloidogyne* spp.).

Enfermedades

- Oidiopsis (*Leveillula taurica* (Lev.) Arnaud)).
- Podredumbre gris (*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. *Botrytis cinerea* (Pers)).

- Podredumbre blanca (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary).
- Mildiu (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary).
- Alternariosis (*Alternaria solani*)
- *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc) Snyder & Hansen.
- *Verticillium dahliae* Kleb.
- Mancha negra del tomate (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe)).

Virus

- TSWV: Tomato Spotted Wilt Virus.
- TYLCV: Tomato Yellow Leaf Curl Virus.
- ToMV: Tomato Mosaic Virus.
- PVY: Potato Virus Y.
- TBSV: Tomato Bushy Stunt Virus.
- PepMV: Pepino Mosaic Virus.

Alteraciones del fruto

Podredumbre apical (blossom-end rot): Comienza con la aparición de lesiones de color tostado claro, que al aumentar de tamaño se oscurecen y se vuelven coriáceas, y que a menudo pueden ser enmascaradas por una podredumbre negra secundaria. Comienza por la zona de la cicatriz pistilar, aunque puede también producirse en alguno de los lados. En ocasiones, se producen lesiones negras internas que no son visibles en el exterior del fruto. La aparición de esta fisiopatía está relacionada con niveles deficientes de calcio en el fruto. El estrés hídrico y la salinidad influyen también directamente en su aparición. Existen también distintos niveles de sensibilidad varietal. Los frutos afectados por podredumbre apical maduran mucho más rápidamente que los frutos normales.

Tejido blanco interno: Depende del cultivar y de las condiciones ambientales. Normalmente solo se producen unas cuantas fibras blancas dispersas por el pericarpio, aunque la formación de tejido blanco se encuentra generalmente en la capa más externa del fruto. En ocasiones, el tejido afectado se extiende desde el centro del fruto. Esta fisiopatía puede ser muy variable, por ejemplo en tomates de un mismo racimo pueden diferir entre sí en cuanto a la cantidad de tejido blanco que se forma en ellos.

Un estado nutricional adecuado, especialmente en cuanto al potasio, reduce la formación de tejido blanco. Se recomienda evitar condiciones de estrés y emplear cultivares tolerantes.

Rajado de frutos: Existen dos tipos de rajado en el fruto de tomate: el concéntrico y el radial. El agrietado concéntrico consiste en la rotura de la epidermis formando patrones circulares alrededor de la cicatriz peduncular. El agrietado radial consiste en una rotura que irradia desde la cicatriz peduncular hacia el pistilar. Las principales causas de esta alteración son: desequilibrios en los riegos y fertilización y bajada brusca de las temperaturas nocturnas después de un período de calor. Los frutos expuestos al ambiente se agrietan más fácilmente que los que se encuentran protegidos por el follaje; esto es debido a las grandes fluctuaciones de temperatura que resultan de la exposición directa a los rayos de sol y que durante los periodos de lluvia, los frutos expuestos al sol se enfrían rápidamente.

"Catface" o cicatriz leñosa pistilar: Los tomates con esta fisiopatía carecen normalmente de forma y presentan grandes cicatrices y agujeros en el extremo pistilar del fruto. En ocasiones, el fruto tiene forma arriñonada con largas cicatrices. Una de las causas es el clima frío, la poda también puede incrementar este tipo de deformación bajo ciertas condiciones y los niveles altos de nitrógeno pueden agravar el problema.

Recolección

Normas para Tomates: La mínima madurez para cosecha (Pitón Verde) se define en términos de la estructura interna del fruto: las semillas están completamente desarrolladas y no se cortan al rebanar el fruto; el material gelatinoso esta presente en al menos un lóculo y se esta formando en otros.

Tomates de Larga Vida (Shelf-Life Tomatoes): La maduración normal se ve severamente afectada cuando los frutos se cosechan en el estado Pitón Verde. La mínima madurez de cosecha corresponde al estadio Naranja, en este estadio más del 30% pero no más del 60% de la superficie del fruto muestra un color rosa-rojo.

Tomate en racimo: El ritmo de recolección debe adaptarse a la maduración de los racimos. En invierno con invernadero sin calefacción y ciclo largo, se efectuaran pases con una regularidad de 15/20 días, mientras que a finales de primavera puede llegar a 7/10 días.

Post-cosecha

Calidad: La calidad del tomate estándar se basa principalmente en la uniformidad de forma y en la ausencia de defectos de crecimiento y manejo. El tamaño no es un factor que defina el grado de calidad, pero puede influir de manera importante en las expectativas de su calidad comercial. La norma comunitaria distingue cuatro tipos de tomates: redondos lisos, asurcados, oblongos o alargados y tomates cherry (cerezas) y cocktail (adorno). Existen tres categorías, según la calidad de los frutos: Extra, primera y segunda.

Forma: Bien formado, redondo, forma globosa, globosa aplanada u ovalada, dependiendo del tipo.

Color: Color uniforme (anaranjado-rojo a rojo intenso; amarillo claro). Sin hombros verdes.

Apariencia: Lisa y con las cicatrices correspondientes a la punta floral y al pedúnculo pequeñas. Ausencia de grietas de crecimiento, cara de gato o cicatriz

leñosa pistilar (cat face), sutura (zippering), quemaduras de sol, daños por insectos y daño mecánico o magulladuras.

Firmeza: Firme al tacto. No debe estar suave ni se debe deformar fácilmente debido a sobremadurez.

Temperaturas óptimas: Pitón: 12,5-15 °C. Naranja: 10-12,5 °C. Maduro: 7-10 °C de 3 a 5 días. Los tomates Pitón Verde pueden almacenarse a 12,5 °C durante 14 días antes de madurarlos sin reducción significativa de su calidad sensorial y desarrollo de color. La pudrición puede aumentar si se les almacena más de dos semanas a esta temperatura. Después de alcanzar el estado Maduro, la vida es generalmente de 8 a 10 días si se aplica una temperatura dentro del intervalo recomendado. Durante la distribución comercial es posible encontrar que se aplican temperaturas de tránsito o de almacenamiento de corto plazo inferiores a lo recomendado, pero es muy probable que ocurra daño por frío después de algunos días. Se ha demostrado que se puede extender la vida de almacenamiento del tomate con la aplicación de atmósfera controlada.

Temperaturas de maduración: 18-21 °C; 90-95% HR para una maduración normal, 14-16 °C para una maduración lenta (por ejemplo, en tránsito).

Daño por frío: Los tomates son sensibles al daño por frío a temperaturas inferiores a 10 °C si se les mantiene en estas condiciones durante 2 semanas o a 5 °C por un período mayor a los 6-8 días. Los síntomas del daño por frío son alteración de la maduración (incapacidad para desarrollar completo color y pleno sabor, aparición irregular del color o manchado, suavización prematura), picado (depresiones en la superficie), pardeamiento de las semillas e incremento de pudriciones (especialmente pudrición negra, black mold, causada por *Alternaria* spp.). El daño por frío es acumulativo y puede iniciarse en el campo antes de la cosecha.

Humedad relativa óptima: 90-95%; la humedad relativa alta es esencial para maximizar la calidad post-cosecha y prevenir la pérdida de agua (desección). Los períodos prolongados de elevada humedad o la condensación pueden

incrementar las pudriciones de la cicatriz del pedúnculo y de la superficie del fruto.

Tasa de respiración: mL CO₂ x kg⁻¹ x h⁻¹

Temperatura	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
Verde Maduro	3-4NR	6-9	8-14	14-21	18-26
Madurando		7-8	12-15	12-22	15-26

NR: no recomendada por más de unos días debido al daño por frío.

Tasa de producción de etileno: 1,2-1,5µL kg⁻¹h⁻¹ a 10 °C y 4,3-4,9µL kg⁻¹h⁻¹ a 20 °C. Los tomates son sensibles al etileno presente en el ambiente, ya que este gas inicia su maduración. Los tomates madurando producen etileno a una tasa moderada por lo que no deben almacenarse o transportarse con productos sensibles al etileno como las lechugas y los pepinos.

Maduración: Una maduración rápida ocurre a temperaturas entre 12,5-25 °C; HR 90-95%; etileno 100 ppm. Debe mantenerse una buena circulación de aire para asegurar uniformidad en la temperatura del cuarto de maduración y prevenir la acumulación de CO₂. El CO₂ retarda la acción del etileno para estimular la maduración. La temperatura óptima de maduración que asegura buena calidad sensorial y nutricional es de 20 °C. A esta temperatura el desarrollo de color es óptimo y la retención de vitamina C alta. Los tomates separados de la planta y madurados a temperaturas superiores a 25 °C desarrollan un color más amarillo y menos rojo y son más blandos. El tratamiento con etileno generalmente dura 24-72 h. Algunas veces se aplica un segundo tratamiento después del re-empaque cuando se cosechan accidentalmente frutos verde inmaduros.

Efectos de atmósferas controladas o modificadas (Church y Parsons, 1995; Phillips, 1996): El almacenamiento en atmósfera controlada o modificada ofrece un beneficio moderado. Las bajas concentraciones de O₂ (3-5%) retrasan la maduración y el desarrollo de pudriciones en la cicatriz del pedúnculo y en la superficie sin afectar severamente la calidad sensorial para la

mayoría de los consumidores. Se han reportado hasta 7 semanas como período de almacenamiento usando una combinación de 4% O₂, 2% CO₂ y 5% CO. Así, las características de los materiales que forman el embalaje donde se comercializan los frutos juegan un papel muy importante.

Tratamientos post-cosecha: Una vez que separamos al fruto de la planta existen una serie de factores que alterarán el desarrollo y la calidad de los mismos, los cuales deberemos controlar y reducir para alargar la vida post-cosecha. Así, los daños mecánicos, la transpiración, las alteraciones fisiológicas (daño por frío), las ocasionadas por deficiencias minerales (absorción, transporte, distribución y utilización en la planta) y las alteraciones microbiológicas (superficiales o externas) constituyen los factores que pueden mermar el desarrollo y la calidad de los frutos.

Para minimizar el efecto de la **transpiración** se aplican prácticas de control de humedades relativas altas y corrientes de aire, además de embalajes apropiados y uso de materiales impermeables en contacto con los frutos.

Los **daños por frío** se evitan conociendo la fisiológica hortofrutícola y con los tratamientos de aclimatación a las bajas o altas temperaturas o en almacenamiento isobárico, donde las concentraciones de los gases están controladas, de modo que minimiza los daños térmicos, puesto que hace menos sensibles a los frutos (Sapitnitskaya et al., 2006).

Las **deficiencias en minerales** de calcio, boro, sodio, potasio, fósforo y nitrógeno ocasionadas en la planta por problemas en la absorción de la raíz, el transporte por el tronco, la distribución por las ramas y utilización por el fruto provocan disminución de la calidad y de la capacidad de almacenamiento. La solución debe buscarse en la adecuación y control de las prácticas agrícolas que evitaren estas deficiencias nutricionales.

Las **alteraciones microbiológicas** pueden ser externas e internas, pero sólo si existe una herida que permita la entrada del patógeno. Así, de forma rutinaria se les aplica a los frutos una técnica denominada “curado” donde los frutos desarrollan diferentes productos que constituirán el “peridermo”. Este

tratamiento consiste en mantener los frutos durante 10 o 15 días a una temperatura de entre 7 y 15 °C y una humedad relativa del 95%. Estas alteraciones pueden ser tratadas mediante tratamientos físicos, como el control de temperatura y humedad relativa, la inmersión en agua caliente y las radiaciones ionizantes (Maneerat et al., 2003; Maneerat y Hayata, 2006), con tratamientos químicos, como los fungicidas, cloro (Roberts y Reymond, 1994), anhídrido sulfuroso, tratamientos cereos (además protegen de la pérdida de agua) o por último con tratamientos de biocontrol (Janisiewicz y Bors, 1995; Leverentz et al., 2006).

Asimismo, se han diseñado **frutos transgénicos** para influir en el retraso de la maduración mediante la modificación de ciertas enzimas que metabolizan la pared celular, como los tomates FLAVR SAVR™ (Calgene), que tienen modificada la expresión de la poligalacturonasa.

Comercialización

La competencia en el mercado del fruto fresco del tomate, hace que los sistemas de comercialización planteen la obtención de una nueva gama de productos que permita llegar a un segmento de mercado definido. En el caso del tomate, la obtención de nuevos cultivares es un objetivo continuado por las diferentes casas comercializadoras de semillas abordado desde perspectivas muy distintas.

El **tomate en racimo** se presenta como una nueva forma de comercializar este producto con una expansión creciente. Para llevar a destino los frutos de tomate en racimos se deben tener en cuenta los siguientes parámetros:

- Número de frutos y calibre: el mercado norteamericano demanda racimos de 4-5 frutos y calibres grandes, al contrario que el mercado británico que demanda racimos de 8-9 frutos y calibres medianos.
- Uniformidad tanto en la calidad como en la firmeza de los frutos.

- Presentación del racimo: Raquis bien formado y buena disposición de los frutos.
- Ausencia de defectos de polinización y cuajado.
- Resistencia al desprendimiento durante el proceso postcosecha.
- Sensación de frescura: Raquis turgente, verde y con el aroma característico.

El **tomate cherry**, conocido también como tomate cereza o enano, es una hortaliza exótica que se caracteriza por su fruto redondo, piel fina, color rojo al madurar y sabor intenso. Este tipo de tomate puede presentarse tanto en rama como suelto. El tomate cherry es muy apreciado en los mercados internacionales, siendo sus principales importadores el Reino Unido, Alemania, Estados Unidos, Francia y Canadá. Este tipo de tomate se está convirtiendo en una hortaliza de consumo cotidiano que va ganando espacio en los lineales de las grandes superficies, y no solo en las extranjeras, pues su introducción en nuestro país se está produciendo a un ritmo acelerado.

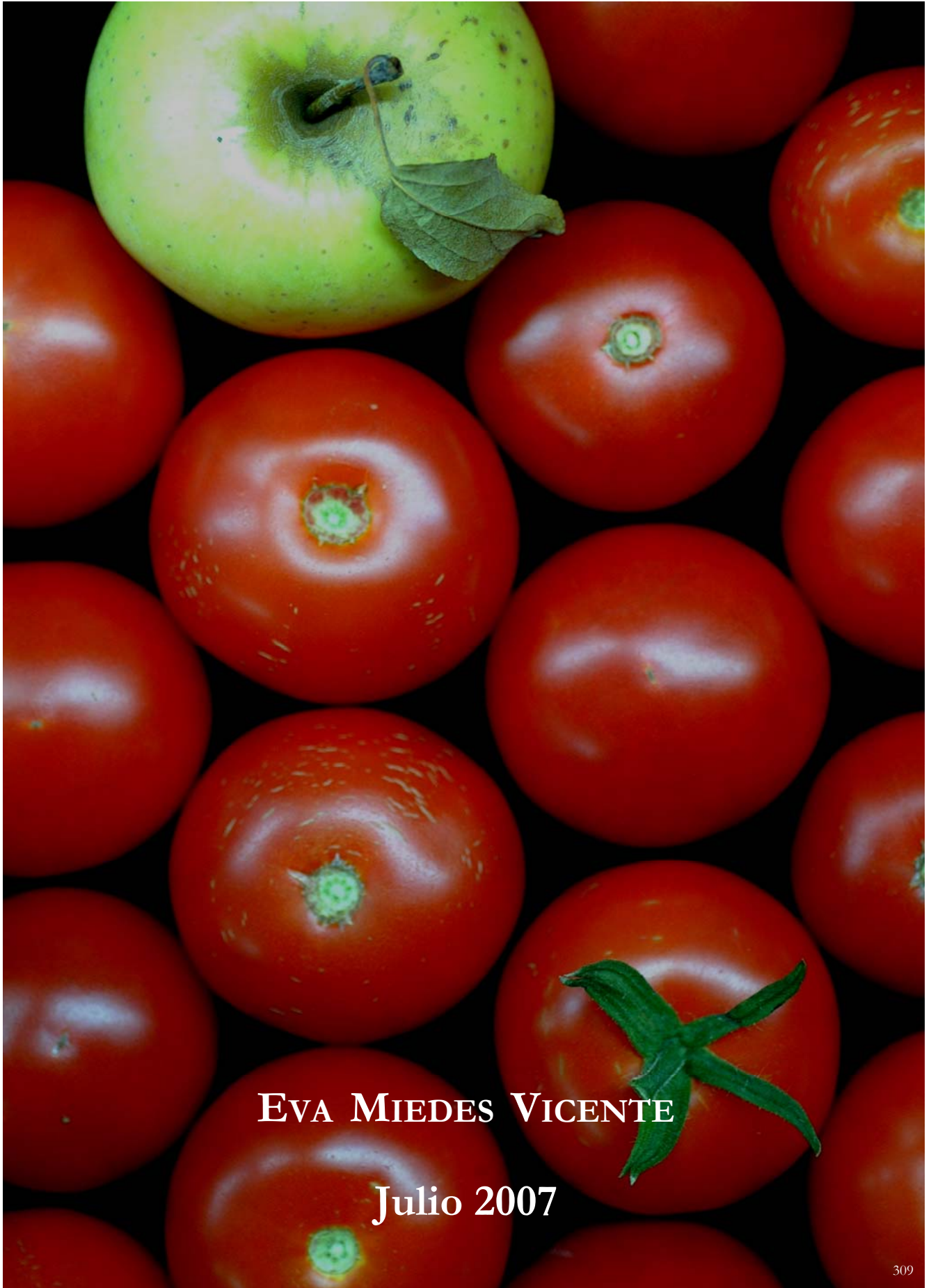
Valor nutricional

Valor nutricional del tomate por 100 g de sustancia comestible es el siguiente:

Residuos (%):	6,0	Tiamina (mg):	0,06
Materia seca (g):	6,2	Riboflavina (mg):	0,04
Energía (kcal):	20,0	Niacina (mg):	0,6
Proteínas (g):	1,2	Vitamina C (mg):	23
Fibra (g):	0,7	Valor Nutritivo	
Calcio (mg):	7,0	Medio (VNM):	2,39
Hierro (mg):	0,6	VNM por 100 g	
Caroteno (mg):	0,5	de materia seca:	38,5

Fuente: Grubben, 1977





EVA MIEDES VICENTE

Julio 2007