

Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Agrarias



Procesos Metabólicos Asociados con la Productividad y Calidad de Fruto en Cultivares de Manzano Tempranos en Regiones Subtropicales de Argentina.

Paula ALAYÓN LUACES

Tesis para optar al
título de Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste
Área de Recursos Naturales

Director: Dr. Gabriel Oscar Sozzi
Co-director: Dr. Eduardo Antonio Pagano

Corrientes – 2010 – Argentina

*A mi marido
y a mis hijos, Julián y Camila,
por quienes todos los
esfuerzos valen la pena*

Resultado de esta tesis se han publicado y presentado los siguientes trabajos:

PUBLICACIONES

- ✚ ALAYÓN-LUACES, P.; PAGANO, E.A.; MROGINSKI, L.A.; SOZZI, G.O. (2008). Four glycoside hydrolases are differentially modulated by auxins, cytokinins, abscisic acid and gibberellic acid in apple fruit callus cultures. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture* 95 (3): 257-263. Kluwer Academic Publisher
- ✚ ALAYÓN-LUACES, P.; PAGANO, E.A.; MROGINSKI, L.A.; SOZZI, G.O. (2010). Activity levels of six glycoside hydrolases in apple fruit callus cultures depend on the type and concentration of carbohydrates supplied and the presence of plant growth regulators. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture* 101: 1-10

Trabajo enviado a publicar

- ✚ ALAYÓN-LUACES, P.; PONCE, N.M.A.; MROGINSKI, L.A.; STORTZ, C.A.; SOZZI, G.O. Compositional changes in cell wall polysaccharides from apple fruit callus cultures modulated by different plant growth regulators.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y REUNIONES

- ✚ Participante del X Congreso Nacional de la Sociedad Uruguaya de Hortifructicultura.
ALAYON LUACES, P., E. PAGANO y G. SOZZI Incremento de alfa-L-arabinofuranosidasa y beta-D-xilosidasa durante el ablandamiento de **manzanas 'Anna'**.
Libro de Resúmenes en CD, Fructicultura, N° 1. Montevideo, Uruguay.
23-25 de Mayo de 2005
- ✚ Participante del XXIX Congreso Argentino de Horticultura San Fernando del Valle de Catamarca
ALAYÓN LUACES, P.; DI SANTO, C.; PAGANO, E.A.; SOZZI, G.O. Expresión de Alfa-L-Arabinofuranosidasa durante la Ontogenia de **Manzanas 'Anna'** .

ALAYÓN LUACES, P.; TARRAGÓ, J.R.; FALOCI, M.M. MROGINSKI, L.A.; PAGANO, E.A.; SOZZI, G.O. Cultivo *in vitro* de Pulpa de Manzana 'Anna': Detección de Actividad de Alfa-L-arabinofuranosidasa en Callos. 20 al 23 de Septiembre de 2006.

- ✚ Participante de las IV Jornadas de Biología y Tecnología de Postcosecha del Cono Sur. Facultad de Agronomía UBA Buenos Aires.
ALAYÓN LUACES, P.; PAGANO, E.A.; MROGINSKI, L.A., SOZZI, G.O.
Efecto de diferentes auxinas sobre la actividad enzimática de glicosidasas en callos provenientes del cultivo *in vitro* de pulpa de manzanas 'Anna'.
5 y 6 de Julio de 2007.

- ✚ Participante del XXX Congreso Argentino de Horticultura La Plata Buenos Aires.
ALAYÓN LUACES, P.; PAGANO, E.A.; MROGINSKI, L.A., SOZZI, G.O.
Efecto de diferentes citocininas sobre la actividad enzimática de cuatro glicosidasas en callos provenientes del cultivo *in vitro* de pulpa de manzanas 'Anna'.
24 al 28 de Septiembre de 2007

- ✚ Participante de la XIII Reunión Latinoamericana y XXVII Reunión Nacional de Fisiología Vegetal Rosario Santa Fe.
ALAYÓN LUACES, P.; PAGANO, E. A; MROGINSKI, L. A.; SOZZI, G. O.
Efecto de la concentración de sacarosa en la actividad de glicosidasas asociadas a pared celular en callos de manzana.
21 al 24 de Septiembre de 2008.

- ✚ Participante de las V Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología de Postcosecha San Pedro, Buenos Aires.
ALAYÓN LUACES, P.; PAGANO, E. A; MROGINSKI, L. A.; SOZZI, G. O
Efecto de diferentes hidratos de carbono sobre la modulación de seis glicosil hidrolasas de callos de manzana.
27 y 28 de octubre de 2009.

Mi reconocimiento

-A los Centros Científicos en los que se desarrollaron las investigaciones de esta Tesis:

Laboratorio de cultivo de tejidos del IBONE de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste.

Laboratorio de Bioquímica y Cátedra de Fruticultura de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Y a sus directivos, por darme la posibilidad de realizar mi trabajo de tesis en sus instalaciones y brindarme el equipamiento y espacio necesarios.

- A la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE por constituir el marco institucional de mi doctorado.

- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científico Tecnológica por la financiación que me permitieron concretar mi trabajo de tesis.

-A la Subsecretaria de Posgrado de la Universidad Nacional del Nordeste por el subsidio que me ha otorgado para financiar los costos del Doctorado.

- A la Universidad Pública a la cual le debo, al igual que muchos, mi formación de grado y postgrado.

Mi agradecimiento

- A mi Director Dr. Gabriel O. Sozzi y a mi Co-director Dr. Eduardo A. Pagano por dirigir mi trabajo y por su apoyo constante.
- A Luis A. Mroginski, quien durante mis estudios de grado fue partícipe y clave en mi formación como profesional e investigadora y quien incondicionalmente me ayudó, aconsejó y permitió trabajar en el Laboratorio de cultivo de tejidos del IBONE para la realización de mis estudios de tesis doctoral.
- A Ernestina Galdeano y Mónica Collavino por las horas de discusión, de trabajo compartidas y por los aportes a esta tesis, pero principalmente por su amistad.
- A Andrea Ponce quien incondicionalmente me brindó su apoyo, su conocimiento y quien hizo ameno el trabajo lejos de la familia compartiendo largas horas de laboratorio en un clima de amistad.
- A Mercedes Avanza, por su apoyo constante y por ser la única que logra hacer amigables los análisis estadísticos de los experimentos.
- A Mirta Falocci y José Tarragó por su incondicional ayuda técnica y humana.
- A Cacho Encinas (el Manzanero), quien me permitió estudiar y trabajar en su finca de manzanas y quien brindó el material de estudio para esta tesis.
- A Coco Rodríguez y Silvia Bertuzzi por apoyar mi trabajo en forma solidaria y desinteresada.
- A todos los integrantes del Laboratorio de cultivo de tejidos del IBONE por su constante apoyo, sugerencias y amistad.
- A los integrantes de la Cátedra de Fruticultura y Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Agronomía de la UBA por su tiempo y dedicación.

- Al Dr. Carlos Stortz y a los integrantes del Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA por permitirme trabajar en el laboratorio, por sus aportes, consejos y amistad.
- A los integrantes del Laboratorio de Genética del IBONE por su colaboración en el desarrollo de algunos análisis.
- A mi marido e hijos por su comprensión, paciencia, preocupación y por permitirme postergar tiempos compartidos.
- A mi madre y Abel, que me inculcaron el valor del conocimiento y la perseverancia en la vida y en el estudio.
- A mis queridas hermanas, por estar y ser quienes son.
- A papá, Estela y Martín por su ayuda, presencia y constante apoyo.
- A mi querida abuela, quien seguramente desde donde esté, estará feliz por esta tesis.

A todos MUCHAS GRACIAS

Abreviaturas

2,4-D	Acido 2,4- diclorofenoxiacético
2iP	N ⁶ -(2-Isopentenil) adenina
ABA	Acido abcísico
AG₃	Acido giberélico
AIA	Acido indol acético
ANA	Acido 1-naftalen acético
ARA	Arabinosa
BAP	6 - Benzil aminopurina
FI	Fracción iónica
FRU	Fructosa
FSA	Fracción soluble en agua
FUC	Fucosa
GAL	Galactosa
GHP	Glicosil hidrolasas de plantas
GLU	Glucosa
HG	Homogalacturonano
IBA	Acido indol butírico
KIN	Cinetina
LAC	Lactosa
MA	Medio de acondicionamiento (MS + 3% de sacarosa)
MAa	MA suplementado con 150 ppm de ácido ascórbico
MAL	Maltosa
MAN	Manosa
MC	Medio de cultivo (MS + 1mg L ⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg L ⁻¹ BAP)

MC 1	Igual MC
MC 2	MC suplementado con 150 ppm de ácido ascórbico
MS	Sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962)
MS-1	Un subcultivo en MS
MS-10	Diez subcultivos en MS
NaCl	Cloruro de sodio
PIC	Acido 4-Amino-3,5,6-tricloro-piridina-2-carboxílico (Picloram)
PVPP	Polivinilpolipirrolidina
RAF	Rafinosa
RAM	Ramnosa
RCV	Reguladores del crecimiento vegetal
RG I	Ramnogalacturonano I
RG II	Ramnogalacturonano II
SAC	Sacarosa
SOR	Sorbitol
TDZ	Tidiazuron
XIL	Xilosa
ZEA	Zeatina
α-Araf	Alfa-L- Arabinofuranosidasa
α-Gal	Alfa-D- Galactosidasa
α-Xil	Alfa-D- Xilosidasa
β-Gal	Beta-D-Galactosidasa
β-Glu	Beta- D-Glucosidasa
β-Xil	Beta-D- Xilosidasa

Índice

Resumen	1
Abstract	5
Capítulo 1: Introducción general	8
1.1. Composición de la pared celular: panorama general	9
1.2. Modificaciones en las paredes celulares de tejidos de frutos	14
1.3. Glicosidasas asociadas a la pared celular en frutos	19
1.4. La manzana como especie objeto de estudio	26
1.5. El cultivo del manzano cv Anna en Corrientes	29
1.6. El cultivo <i>in vitro</i> como sistema de estudio	31
1.7. Objetivo general	33
Capítulo 2: Cultivo <i>in vitro</i> de pulpa de manzana	34
2.1. Introducción	35
2.2. Objetivos	38
2.3. Materiales y Métodos	38
2.3.1. Material vegetal	38
2.3.2. Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos	40
2.3.3. Tratamientos	42
2.3.3.1. Selección del explante	42
2.3.3.2. Medio de cultivo de acondicionamiento	42
2.3.3.3. Medio de cultivo	42
2.3.3.4. Ennegrecimiento	43
2.3.4. Cultivo e Incubación	43
2.3.5. Parámetros analizados y análisis estadístico	43
2.4. Resultados y Discusión	44
Capítulo 3: Efecto de reguladores del crecimiento en la modulación <i>in vitro</i> de glicosidasas asociadas a pared celular	51
3.1. Introducción	52

3.2.	Objetivos	54
3.3.	Materiales y Métodos	54
3.3.1.	Ensayo con reguladores del crecimiento	54
3.3.2.	Determinación de actividades enzimáticas	56
3.3.3.	Parámetros analizados y análisis estadístico	58
3.4.	Resultados y Discusión	58
3.4.1.	Actividades enzimáticas	58
3.4.2.	Aspecto exo-morfológico y crecimiento de los callos	69
Capítulo 4:	Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la modulación <i>in vitro</i> de glicosidasas asociadas a pared celular	72
4.1.	Introducción	73
4.2.	Objetivos	75
4.3.	Materiales y Métodos	75
4.4.	Resultados y Discusión	76
Capítulo 5:	Efecto de diferentes hidratos de carbono en la modulación <i>in vitro</i> de glicosidasas asociadas a pared celular	85
5.1.	Introducción	86
5.2.	Objetivos	88
5.3.	Materiales y Métodos	88
5.4.	Resultados y Discusión	90
Capítulo 6:	Cambios en la composición de la pared celular de callos de manzana dependientes de su exposición a diferentes reguladores del crecimiento	101
6.1.	Introducción	102
6.2.	Objetivos	104
6.3.	Materiales y Métodos	104
6.3.1.	Material vegetal y tratamientos	104
6.3.2.	Obtención y fraccionamiento de la pared celular	105

6.3.3. Determinación de azúcares totales	106
6.3.4. Determinación de ácidos urónicos	107
6.3.5. Cromatografía de exclusión	108
6.3.6. Determinación de los azúcares neutros	108
6.3.6.1. Hidrólisis reductiva	108
6.3.6.2. Cromatografía Gas-Líquido	110
6.4. Resultados y Discusión	110
6.4.1. Ácidos urónicos y azúcares neutros	110
6.4.2. Efecto de los reguladores del crecimiento vegetal sobre la masa molecular de los polisacáridos pécticos	118
6.4.3. Efecto de los reguladores del crecimiento vegetal sobre la masa molecular de los glicanos de matriz	120
Capítulo 7: Conclusiones	128
Conclusiones	129
Referencias Bibliográficas	132
Anexos	152

Índice de Figuras

Figura I.1	Manzana cultivar Anna en San Luis del Palmar Corrientes	31
Figura II. 1	Cultivo <i>in vitro</i> de pulpa de manzana.	41
Figura II. 2	Respuestas obtenidas del cultivo <i>in vitro</i> de pulpa de manzana.	45
Figura II. 3	Explantos contaminados (c) y ennegrecidos (e), provenientes del cultivo <i>in vitro</i> de pulpa de manzanas maduras con y sin tratamiento de frío.	46
Figura II. 4	Explantos contaminados (c) y ennegrecidos (e), provenientes del cultivo <i>in vitro</i> de pulpa de manzanas inmaduras con y sin tratamiento de frío.	48
Figura II. 5	Callos obtenidos (callo) y explantes sin respuesta (sin), provenientes del cultivo <i>in vitro</i> de pulpa de manzanas maduras con y sin tratamiento de frío.	48
Figura II. 6	Callos obtenidos (callo) y explantes sin respuesta (sin), provenientes del cultivo <i>in vitro</i> de pulpa de manzanas inmaduras con y sin tratamiento de frío.	49
Figura II. 7	Protocolo propuesto para la obtención de callos provenientes de frutos de manzana cv Anna por medio de cultivo <i>in vitro</i>	50
Figura III.1	Actividad específica de α-L-arabinofuranosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal.	60
Figura III.2	Actividad específica de β-D-glucosidasa de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal.	62
Figura III.3	Actividad específica de α-D-xilosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal	63
Figura III.4	Actividad específica de β-D-xilosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal	64
Figura III.5	Actividad específica de α-D-galactosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal.	66

Figura III.6	Actividad específica de β-D-galactosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal.	67
Figura III.7	Aspecto exomorfológicos de callos sometidos a los efectos de diferentes tratamientos hormonales	70
Figura IV.1	Actividad específica de α-L-arabinofuranosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con tres concentraciones de sacarosa	77
Figura IV.2	Actividad específica de β-D-glucosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con tres concentraciones de sacarosa	79
Figura IV.3	Actividad específica de α-D-xilosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con tres concentraciones de sacarosa	80
Figura IV.4	Actividad específica de β-D-xilosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con tres concentraciones de sacarosa	81
Figura IV.5	Actividad específica de α-D-galactosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con tres concentraciones de sacarosa	82
Figura IV.6	Actividad específica de β-D-galactosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con tres concentraciones de sacarosa	83
Figura V.1	Actividad específica de α-L-arabinofuranosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con diferentes fuentes carbonadas	97
Figura V.2	Actividad específica de β-D-glucosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con diferentes fuentes carbonadas	97

Figura V.3	Actividad específica de α-D-xilosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con diferentes fuentes carbonadas.	98
Figura V.4	Actividad específica de β-D-xilosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con diferentes fuentes carbonadas.	98
Figura V.5	Actividad específica de α-D-galactosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con diferentes fuentes carbonadas.	99
Figura V.6	Actividad específica de β-D-galactosidasa de callos de pulpa de manzana, tratados o no con reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con diferentes fuentes carbonadas.	99
Figura VI.1	Contenido de ácidos urónicos y contenido de azúcares neutros en diferentes fracciones de la pared celular de callos provenientes del cultivo <i>in vitro</i> de pulpa de manzana tratadas con diferentes reguladores del crecimiento vegetal.	123
Figura VI.2	Composición de azúcares neutros de fracciones de pared celular de pectinas y glicanos de matriz de callos provenientes del cultivo <i>in vitro</i> de pulpa de manzana tratadas con diferentes reguladores del crecimiento vegetal.	124
Figura VI.3	Relaciones: Ara/Gal y (Ara+Gal)/Ram de pectinas y glicanos de matriz de las paredes celulares de callos provenientes del cultivo <i>in vitro</i> de pulpa de manzana	125
Figura VI.4	Perfiles de cromatografía de exclusión de callos provenientes del cultivo <i>in vitro</i> de pulpa de manzana tratadas con diferentes reguladores del crecimiento vegetal. Fracción soluble en CDTA y fracción soluble en Na ₂ CO ₃	126
Figura VI.5	Perfiles de cromatografía de exclusión de callos provenientes del cultivo <i>in vitro</i> de pulpa de manzana tratadas con diferentes reguladores del crecimiento vegetal. Fracción soluble en KOH 4% y fracción soluble en KOH 24%.	127

Índice de Tablas

Tabla II.1	Diversos estudios realizados en manzanas utilizando la técnica de cultivo <i>in vitro</i> de callos.	37
Tabla III.1	Crecimiento callos con tratamientos hormonales luego de 30 días de incubación.	71
Tabla V.1	Efecto de diferentes hidratos de carbono en el crecimiento de los callos.	100
Tabla A.1	Análisis estadístico de diferentes tratamientos para la obtención de callos provenientes del cultivo <i>in vitro</i> de pulpa de manzanas	153
Tabla A.2	Análisis estadístico del efecto de diferentes reguladores del crecimiento vegetal sobre la actividad de seis glicosidasas medidas en la fracción soluble en agua (FSA): α -L-arabinofuranosidasa; β -D-glucosidasa; α -D-galactosidasa; β -D-galactosidasa; α -D-xilosidasa; y β -D-xilosidasa.	154
Tabla A.3	Análisis estadístico del efecto de diferentes reguladores del crecimiento vegetal sobre la actividad de seis glicosidasas medidas en la fracción iónica (FI): α -L-arabinofuranosidasa; β -D-glucosidasa; α -D-galactosidasa; β -D-galactosidasa; α -D-xilosidasa; y β -D-xilosidasa.	155
Tabla A.4	Análisis estadístico de dos vías del efecto de diferentes concentraciones de sacarosa sobre la actividad de seis glicosidasas: α -L-arabinofuranosidasa; β -D-glucosidasa; α -D-galactosidasa; β -D-galactosidasa; α -D-xilosidasa; and β -D-xilosidasa.	156
Tabla A.5	Análisis estadístico del efecto de diferentes hidratos de carbono sobre la actividad de α -L-arabinofuranosidasa y β -D-glucosidasa. Las actividades enzimáticas fueron medidas en la fracción soluble en agua (FSA) y en la fracción iónica (FI).	157
Tabla A.6	Análisis estadístico del efecto de diferentes hidratos de carbono sobre la actividad de α -D-galactosidasa y β -D-galactosidasa. Las actividades enzimáticas fueron medidas en la fracción soluble en agua (FSA) y en la fracción iónica (FI).	158
Tabla A.7	Análisis estadístico de dos vías del efecto de diferentes hidratos de carbono sobre la actividad de α -D-xilosidasa Y β -D-xilosidasa. Las actividades enzimáticas fueron medidas en la fracción soluble en agua (FSA) y en la fracción iónica (FI).	159

Resumen

Esta tesis es la primera investigación a escala sobre los niveles de actividad de glicosidasas de pared celular en respuesta a una variedad de reguladores del crecimiento vegetal y de azúcares, y a concentraciones variables de sacarosa en cultivos de callos de frutos. Se detectaron **actividades α -L-arabinofuranosidasa, α - y β -D-galactosidasa, α - y β -D-xilosidasa, y β -D-glucosidasa** en las fracciones extraídas de cultivos de callos de manzana (*Malus × domestica*) con agua y con una solución reguladora con alta concentración salina. Las enzimas de la fracción liberada con NaCl están muy probablemente asociadas con la pared celular. La actividad resultó modulada diferentemente por doce reguladores del crecimiento vegetal (ácido indol-3-acético, ácido 1-naftalenacético, ácido indol-3-butírico, picloram, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, cinetina, zeatina, N⁶-(2-isopentenil) adenina, 6-bencilaminopurina, tidiazurón, ácido abscísico, y ácido giberélico) adicionados a callos que habían perdido sus requerimientos por reguladores del crecimiento vegetal específicos (fenómeno de habituación).

La presencia y concentración de sacarosa también moduló de diferentes maneras y en distinto grado la actividad de las seis glicósido hidrolasas vegetales extraídas de cultivos de callos de manzana, tanto de la fracción soluble en agua como de la fracción liberada con NaCl. La actividad β -D-glucosidasa se incrementó ante la carencia de sacarosa y la adición de sacarosa disminuyó esa actividad en ambas fracciones, en un medio basal de Murashige y Skoog sin (MS) o con (MC) reguladores del

crecimiento vegetal. Las actividades α -L-arabinofuranosidasa, β -D-galactosidasa y β -D-xilosidasa de la fracción soluble en solución salina alcanzaron su nivel máximo cuando se adicionó sacarosa 0,045 M al medio MS, declinando a concentraciones mayores de sacarosa. La actividad α -D-galactosidasa y α -D-xilosidasa alcanzó el máximo nivel cuando se aplicó sacarosa 0,045 M y no disminuyó significativamente en callos suplementados con sacarosa 0,09 M. Cuando se analizaron los efectos de la presencia o ausencia de reguladores del crecimiento vegetal, las actividades β -D-glucosidasa, α -D-galactosidasa, β -D-galactosidasa, α -D-xilosidasa y β -D-xilosidasa de la fracción soluble en solución salina resultó ser más elevada en MS que en MC. La β -D-glucosidasa puede estar asociada positivamente con ciertas condiciones de estrés tales como la presencia de picloram, la ausencia de otros reguladores del crecimiento vegetal, o la carencia de ciertos azúcares (siendo una excepción el manitol, considerado inerte desde un punto de vista metabólico), indicando que las paredes celulares probablemente funcionen como un reservorio adicional de compuestos carbonados que provee hidratos de carbono bajo situaciones críticas.

Para determinar si los efectos del azúcar son específicos de la sacarosa, se evaluaron otros azúcares (glucosa, fructosa, galactosa, maltosa, lactosa, rafinosa, sorbitol y manitol) con o sin el suplemento de reguladores del crecimiento vegetal. En general, los azúcares-alcohol (manitol, sorbitol) y algunos monosacáridos (fructosa y glucosa en particular) fueron mejores inductores de las actividades α -L-arabinofuranosidasa, β -D-galactosidasa y β -D-xilosidasa provenientes de la fracción salina, que los disacáridos (sacarosa, maltosa y lactosa) o que

el trisacárido rafinosa. Esta tendencia no se extendió a todas las glicósido hidrolasas evaluadas dado que los callos suplementados con sacarosa **mostraron en los extractos salinos una actividad α -D-galactosidasa** más elevada que los suplementados con glucosa, galactosa, sorbitol o manitol. Estos resultados muestran que los azúcares suplementados como fuentes de carbono a los cultivos de tejido de callos también pueden modular la actividad de glicósido hidrolasas de pared celular. La modulación es diferente para cada glicosidasa, específica del azúcar y, al menos en el caso de la sacarosa, dependiente de la concentración. Los resultados también sugieren la existencia de interacciones regulatorias entre los reguladores del crecimiento vegetal y los azúcares como parte de una red intrincada de detección y señalización. La combinación de reguladores del crecimiento vegetal, el tipo y la concentración de azúcares deberían tenerse en consideración para maximizar la actividad de las glicósido hidrolasas para estudios enzimáticos adicionales.

Las funciones estructurales de las paredes celulares no permiten por lo general variaciones pronunciadas del contenido total de pectinas y glicanos de matriz. Sin embargo, esta tesis provee evidencia de que la adición de diferentes reguladores del crecimiento vegetal puede determinar el metabolismo de la pared celular en cultivos de tejidos de callos. Cambios significativos en la composición de la pared celular tuvieron lugar en presencia de tres reguladores del crecimiento vegetal diferentes: picloram, ácido abscísico y ácido giberélico. Los cambios incluyeron alteraciones en el contenido de ácidos urónicos y de azúcares neutros totales, como también en los espectros de monosacáridos y en la relación arabinosa/galactosa. Asimismo, resultaron modificados

significativamente los patrones de distribución del tamaño de los polímeros pécticos y hemicelulósicos. Estos estudios probablemente permitan nuevas oportunidades para definir medios de cultivo 'hechos a medida' con fines específicos, dado que los niveles de reguladores del crecimiento vegetal son capaces de modificar la configuración de los polisacáridos de la pared celular en la biomasa vegetal generada *de novo*.

Abstract

This thesis is the first broad-scale investigation on cell wall glycosidase activity levels in response to a range of plant growth regulators and sugars and to varying concentrations of sucrose in fruit callus cultures. α -L-Arabinofuranosidase, α - and β -D-galactosidase, α - and β -D-xylosidase, and β -D-glucosidase activities were detected in the soluble fraction extracted with water and in the NaCl-released fraction extracted with a high-salt concentration buffer from apple (*Malus × domestica*) callus cultures. Enzymes from the NaCl-released fraction are probably associated with the cell wall. The activity was found to be differently modulated by the addition of twelve plant growth regulators (indole-3-acetic acid, 1-naphthaleneacetic acid, indole-3-butyric acid, picloram, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, kinetin, zeatin, N6-(2-isopentenyl) adenine, 6-benzylaminopurine, thidiazuron, abscisic acid, and gibberellic acid) to callus that had lost their requirement for specific plant growth regulators (“habituation” phenomenon).

Also, sucrose presence and concentration modulated in different ways and to different extents the activity of the six plant glycoside hydrolases extracted from apple callus cultures, both in the water soluble fraction and in the NaCl-released fraction. β -D-Glucosidase activity increased because of sucrose starvation and the addition of sucrose decreased β -D-glucosidase in both fractions, from calli grown in a Murashige and Skoog’s basal medium with (MC) or without (MS) plant growth regulators. α -L-Arabinofuranosidase, β -D-galactosidase and β -D-xylosidase activities in

the NaCl-released fraction reached a maximum when 0.045 M sucrose was added to the MS medium with an ensuing decline at higher sucrose concentrations. α -D-Galactosidase and α -D-xylosidase activities reached a maximum when 0.045 M sucrose was supplied and did not decline significantly in 0.09 M sucrose-supplied calli. When the effects of PGR presence or absence were analysed, β -D-glucosidase, α -D-galactosidase, β -D-galactosidase, α -D-xylosidase and β -D-xylosidase activities in the NaCl-released fraction were found to be higher in MS than in MC. β -D-glucosidase may be positively associated with certain stress conditions such as the presence of picloram, absence of other plant growth regulators, or sugar starvation (except for mannitol which is inert from a metabolic point of view), thus indicating that cell walls are likely to function as an additional carbon-storage pool that provides carbohydrates under critical situations.

To assess whether sugar effects were sucrose-specific, other sugars (glucose, fructose, galactose, maltose, lactose, raffinose, sorbitol and mannitol) were tested, with or without PGR supplementation. In general, sugar alcohols (mannitol, sorbitol) and some monosaccharides (fructose **and glucose in particular**) were better inducers of α -L-arabinofuranosidase, β -D-galactosidase and β -D-xylosidase activities from the NaCl-released fraction than disaccharides (sucrose, maltose, and lactose) or the trisaccharide raffinose. This trend was not widespread to all the glycoside hidrolases assessed since sucrose-supplemented calli displayed higher α -D-galactosidase in the NaCl-released fraction than those supplemented with glucose, galactose, sorbitol or mannitol. These results show that

sugars supplied to callus tissue cultures as a carbon source can also modulate glycoside hydrolase activity. Modulation is different for each glycoside hydrolase, sugar-specific and, at least in the case of sucrose, concentration-dependent. Results also suggest the existence of regulatory interactions between plant growth regulators and sugars as part of an intricate sensing and signalling network. Combination of plant growth regulator, sugar type and concentration should be taken into account to maximize each glycoside hydrolase activity for further enzyme studies.

The structural functions of cell walls do not generally allow for pronounced variations of the total pectin and matrix glycan content. Nevertheless, this thesis provides evidence that the addition of different plant growth regulators can rule cell-wall metabolism in fruit callus cultures. Significant cell wall compositional changes took place in the presence of three different plant growth regulators: picloram, abscisic acid and gibberellic acid. Changes included alterations in the uronic acid and total neutral sugar content, as well as in the monosaccharide spectra and arabinose/galactose ratio. Also, the size distribution patterns of pectic and hemicellulosic polymers were significantly modified. These studies will probably grant new opportunities to define "tailor-made" culture media for specific purposes since the levels of plant growth regulators can modify the configuration of cell-wall polysaccharides in de novo built plant biomass

CAPÍTULO 1

Introducción general

1.1- Composición de la pared celular: panorama general

La pared celular es un compartimiento dinámico, altamente organizado compuesto por polisacáridos, proteínas y compuestos de naturaleza fenólica (Carpita & Gibeaut, 1993). La pared celular desempeña un papel crucial en la determinación del crecimiento y del desarrollo de la célula vegetal, experimentando continuas modificaciones durante la expansión y diferenciación celular. No todas las funciones de la pared celular son estructurales, sino que algunas moléculas participan en procesos de reconocimiento celular, reacciones metabólicas de síntesis y degradación, o aspectos relacionados a la defensa de las plantas.

La composición y disposición de los polímeros que componen la pared celular varían entre especies, entre tejidos de la misma especie, entre células individuales e inclusive entre regiones de la misma pared que rodea un protoplasto (Carpita & Mc. Cann, 2000).

Existen doce diferentes restos glicosilos constitutivos de todas las paredes primarias, aunque en diferentes cantidades. Estos restos glicosilos incluyen las hexosas (D-glucosa; D-manosa; D-galactosa y L-galactosa), las pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), las 6-deoxi hexosas (L-ramnosa y L-fucosa) y los ácidos hexurónicos (ácido D-galacturónico y ácido D-glucurónico). El ácido D-galacturónico está presente tanto como ácido cuanto como su derivado metil esterificado en el C6. Las paredes primarias contienen también un resto pentosilo ramificado (D-apiosa) y un resto glicosilo ácido ramificado (ácido acérico). En menor medida, se presentan algunos cetoazúcares y restos mono-*O*-metil glicosilos. Todos los restos

hidrocarbonados citados constituyen los hidratos de carbono presentes en las diferentes fracciones de la pared celular. Varios capítulos de este trabajo de tesis se centraron en la investigación de enzimas capaces de liberar cuatro de los restos glicosilos anteriormente citados: D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa y L-arabinosa.

Los polisacáridos constituyentes de las paredes celulares se encuentran formados por largas cadenas de monosacáridos unidos covalentemente en diferentes posiciones.

En el modelo más consensuado, la pared celular de las plantas está compuesta por moléculas de glicanos que se unen a través de secciones de longitud relativamente corta a áreas restringidas de celulosa, formando el marco constitutivo de la pared celular primaria. Este marco de xiloglucano-celulosa, está embebido en una matriz péctica amorfa, compuesta por poliuronidos y otros componentes menos abundantes, que incluyen compuestos fenólicos, proteínas estructurales, enzimas y moléculas receptoras.

La celulosa es un homopolisacárido compuesto exclusivamente por moléculas de glucosa. Se encuentra dispuesta con arreglos paracristalinos (microfibrillas) conformados por cadenas de β -1,4-D-glucosa unidas entre sí por puentes de hidrógeno. Estas microfibrillas de celulosa interactúan en diferentes niveles según la especie y el tejido con los glicanos de matriz **(vulgarmente conocidos con el nombre genérico de "hemicelulosas" los cuales pueden encontrarse recubriendo las microfibrillas o actuando de puente entre microfibrillas hasta formar una red (Brummell & Harpster, 2001).**

Los xiloglucanos se cuentan entre los polímeros que mayoritariamente conforman las hemicelulosas en las plantas. Consisten en cadenas lineales de β -1,4-D-glucosa con numerosos restos de α -xilosa unidos en posición 6 de las unidades de glucosa, algunos de las cuales pueden a su vez encontrarse sustituidos con β -D-galactosa, α -L-arabinosa o α -L-fucosa. La estructura y distribución molecular de estas cadenas laterales de los xiloglucanos varía según la especie y el tejido vegetal (Vincken *et al.*, 1997).

Otro componente mayoritario de los glicanos de matriz son los glucuro-arabinoxilanos que poseen una cadena principal de polímeros de D-xilosa con uniones β -(1 \rightarrow 4) y ramificaciones de α -L-arabinosa y ácido α -D-glucurónico.

Entre los componentes hemicelulósicos en plantas se encuentran en menores cantidades los mananos, los galactomananos y los galactoglucomananos.

La rigidez estructural y la fuerza de la pared celular dependen de la integridad de la red formada por celulosa y glucanos entrelazados. La modificación de los xiloglucanos (XiG) catalizada por las enzimas es un proceso clave para la expansión durante el crecimiento celular (Talbot & Ray, 1992).

Los polisacáridos pécticos constituyen cerca de un tercio de las paredes celulares de las plantas dicotiledóneas (Carpita & Gibeaut, 1993). La matriz péctica de la célula vegetal es una mezcla compleja de polisacáridos ramificados ricos en ácido D-galacturónico. Los espacios entre la red de celulosa-glicanos de matriz son ocupados por estas pectinas altamente hidratadas, que se entrecruzan mediante uniones éster y

mediante uniones iónicas de calcio. Por su parte, la matriz de celulosa-hemicelulosa se une a las pectinas mediante enlaces covalentes entre los xiloglucanos y las pectinas (Thompson & Fry, 2000).

Los homogalacturonanos (HG), polímeros de ramnogalacturonano I (RG I) y ramnogalacturonano II (RG II), son los principales componentes de esta fracción. Los HGs son cadenas de ácido (1→4) α -D-galacturónico, no ramificadas y metilesterificadas, secretadas por el aparato de Golgi y desestificadas por pectinmetilesterasas en grado variable en ciertos dominios de la pared celular. Los RG I son heteropolímeros ramificados de (1→2) α -D-ramnosa alternados con restos de ácido (1→4) α -D-galacturónico que portan cadenas laterales de restos neutros de (1→4) β -D-galactosa y/o (1→5) α -L-arabinosa, predominantemente unidos a las unidades de ramnosa del esqueleto en O-4. El xilogalacturonano y el RG II son los dos homogalacturonanos modificados presentes en la pared celular. El xilogalacturonano posee ramificaciones laterales de xilosa sobre una cadena principal de unidades de ácido galacturónico. La molécula de RG II presenta un esqueleto de HG con cadenas laterales de diversos azúcares que incluyen apiosa, ácido acérico, metil-fucosa, y metil-xilosa. Su estructura se encuentra altamente conservada en las plantas superiores, lo que sugiere una importante función a pesar de su poca abundancia relativa. Los complejos RG II contribuyen a la resistencia a la tensión de las paredes vegetales (Ryden *et al.*, 2003). El RG I es un heteropolímero formado por unidades repetidas del disacárido (1→2) α -D-ramnosa-(1→4) ácido α -D-galacturónico. Otros polisacáridos compuestos principalmente de azúcares neutros, tales como arabinanos, galactanos y arabinogalactanos, se unen en la posición 4 a las unidades de ramnosa, para dar lugar a la formación de

cadena laterales. La mayor variabilidad que presentan las sustancias pécticas se observa en la composición de las cadenas laterales de azúcares neutros.

Se han propuesto diferentes roles para los polímeros pécticos, incluyendo su participación en el grado y tamaño de la porosidad de las paredes, en las propiedades mecánicas de la pared, en la regulación de la adhesión célula-célula, en la expansión celular, en la modulación del pH y balance iónico, en la señalización (oligosacarinas), en el reconocimiento de la presencia de ciertos patógenos y en eventos de la diferenciación celular y organogénesis (Reiter *et al.*, 1997).

Si bien los componentes más abundantes de las paredes celulares son los polisacáridos, también se encuentran proteínas formando parte de la red estructural y algunos componentes de naturaleza fenólica (como el ácido ferúlico y el ácido *p*-cumárico). Las proteínas estructurales que existen en la pared celular son proteínas ricas en hidroxiprolina, ricas en glicina, ricas en prolina, extensinas y proteínas de arabinogalactanos. Las proteínas estructurales pueden formar una red adicional, interactuando con la matriz péctica o entre sí.

Si bien se conoce con bastante detalle cuáles son los componentes que forman parte de las paredes celulares, la forma en que se encuentran dispuestos y la interacción que existe entre las diferentes fracciones, muchos detalles de la interacción entre polímeros aún permanecen confusos.

En los últimos años se han realizado extensas revisiones para estudiar la complejidad estructural de estos componentes de la pared celular y el modo de relación entre ellos. Este conocimiento es fundamental

para interpretar los cambios que ocurren a lo largo de la vida de las paredes celulares y la acción de las enzimas que operan sobre estas estructuras.

1.2- Modificaciones en las paredes celulares de tejidos de frutos

Al igual que sucede con las estructuras creadas por el hombre, la vida de las paredes celulares vegetales involucran la fabricación de los materiales constitutivos, su transporte al sitio de construcción, el ensamblaje de los bloques de construcción para conformar el armazón de la estructura, la remodelación de la arquitectura cuando se requiere, y su desensamblaje y demolición final. Por su importancia agrícola y comercial, la mayor parte de los estudios realizados al presente sobre la pared celular se enfocaron en su desensamblaje durante los procesos del ablandamiento de los frutos, de la abscisión de órganos y de la germinación de semillas (Rose *et al.*, 2003). Estos procesos involucran una despolimerización neta, a menudo llamada “desensamblaje”, para remarcar su connotación de proceso altamente coordinado más que de degradación inespecífica. El proceso de desensamblaje involucra probablemente la acción sinérgica de diferentes enzimas o familias de enzimas que, modificando la pared celular, pueden mediar en la acción de otras (Brummell, 2006; Vicente *et al.*, 2007; Bennett & Labavitch, 2008; Goulao & Oliveira, 2008). En menor medida aunque con no menor profundidad, se emprendieron los estudios relativos a la biosíntesis de la pared celular (Doblin *et al.*, 2003), su ensamblaje y reorganización (Cosgrove, 2003). Todos esos estudios condujeron a una mayor apreciación de la complejidad y de la naturaleza multifuncional de la pared celular primaria. Ésta es hoy considerada una estructura compleja y

altamente dinámica que muestra variaciones temporales y espaciales sustanciales en su arquitectura y composición, lo cual se produce a través de la acción de enzimas que coordinan la síntesis, deposición, reorganización y desensamblaje selectivo de la pared. La modulación de la acción de estas enzimas específicas de pared celular se asocia con el programa de desarrollo y en respuesta a estímulos externos.

La mayoría de los científicos concuerdan en que los cambios en la morfología de los tejidos y órganos que ocurren durante el crecimiento y desarrollo de la planta resultan en buena medida de una división y un agrandamiento celular controlados junto con la modificación estructural y la reorganización de los componentes de la pared, y la síntesis e inserción de material nuevo en la pared existente (Cosgrove, 1999; Rose & Bennett, 1999; Meijer & Murray, 2001; Smith, 2001). Sin embargo, los factores bioquímicos y físicos que regulan las modificaciones de la pared y su expansión no son totalmente comprendidos (Cosgrove, 2003). Las identidades y los modos de acción de las sintasas de polisacáridos y de otras glicosiltransferasas que median la biosíntesis de los polisacáridos no celulósicos más importantes siguen intrigando a los científicos, sin bien se buscan modernas aproximaciones sistémicas (genéticas, bioquímicas y funcionales) para conocer la biosíntesis de la pared celular en plantas (Farrokhi *et al.*, 2006).

Por otra parte, en las últimas décadas se ha brindado particular atención a los cambios en la firmeza operados en los frutos que, por mucho, han sido estudiados a nivel mundial más intensamente. Esto no se debe a que se considere a la firmeza más importante para la calidad final del producto que otros factores como el color o el aroma, sino porque un

ablandamiento prematuro de los frutos virtualmente asegura que los mismos se deterioren rápidamente durante su vida en postcosecha, sucumbiendo a los daños mecánicos y a la acción de agentes patógenos, limitando sus posibilidades de transporte y almacenamiento y afectando, por lo tanto, con mayor gravedad e inmediatez la estructura de costos. Dado que varias de las enzimas objeto de estudio de esta tesis fueron investigadas con mayor asiduidad en relación con el ablandamiento de los frutos, se hace una referencia general a esta cuestión a continuación.

El ablandamiento de los frutos está acompañado por la despolimerización y solubilización de diferentes polisacáridos de la pared celular que incluye pectinas y glicanos de matriz –a menudo acompañados por la reorganización de los mismos–, y por el elevado nivel de expresión de genes, proteínas y actividades enzimáticas asociadas al desensamblaje de dicha pared (Brummell & Harpster, 2001; Giovannoni, 2001; Brummell, 2006; Bennett & Labavitch, 2008; Goulao & Oliveira, 2008).

Los cambios en la estructura de la pared celular están asociados a la disolución de la lámina media y a la disgregación de la pared celular primaria.

Las modificaciones que ocurren en los polisacáridos pécticos son resultantes de dos procesos principales: solubilización y/o despolimerización dependiendo del fruto analizado, ya que es frecuente que existan marcadas diferencias en el patrón de degradación de la pared celular entre frutos de variedades de una misma especie. En frutos de manzano, el ablandamiento de los mismos ocurre sin una extensa despolimerización de los polisacáridos de la pared en general y con pequeña despolimerización y solubilización de pectinas en particular (Yoshioka, et al., 1992; Percy et al., 1997), a

diferencia de lo que ocurre en otros frutos climatéricos modelos, como el tomate, donde la modificación más importante en la pared consiste en una despolimerización y solubilización masiva de poliuronidos (Brummell & Labavich, 1997) y despolimerización de los glicanos de matriz (Tong & Gross, 1988).

Conjuntamente con la solubilización de pectinas, la pérdida de azúcares neutros de las cadenas laterales de las pectinas es otro de los mecanismos que ocurren durante la maduración de los frutos. La pérdida de galactosa es muy pronunciada en especies como tomate, pimiento, melón y manzana, pero no se verifica en todas las especies (revisado por Brummell, 2006). Por ejemplo, en peras europeas y damascos, la arabinosa y la xilosa respectivamente son los principales azúcares neutros que se pierden durante la maduración (Gross & Sams, 1984). Las ciruelas europeas no manifiestan pérdidas de magnitud de arabinosa o galactosa (Gross & Sams, 1984), diferenciándose de otras especies del mismo género, como los duraznos, con moderada pérdida de galactosa y arabinosa (Brummell et al., 2004 a), y las ciruelas japonesas, con pérdidas importantes de arabinosa (Ponce *et al.*, 2010). La despolimerización de pectinas y la pérdida de galactosa y arabinosa incrementan la porosidad de las paredes, que inicialmente limita así el acceso de las enzimas hidrolíticas a sustratos específicos (Baron-Epel *et al.*, 1988).

Uno de los cambios de la pared celular que suele correlacionarse más estrechamente con las variaciones de la firmeza de los frutos es la despolimerización de los glicanos de matriz. Se detectó la disminución del peso molecular de los glicanos de matriz en los frutos de prácticamente todas las especies investigadas (ver Brummell, 2006 y referencias allí

incluidas). Entre los glicanos de matriz se destacan los xiloglucanos, presentes en mayor abundancia en las fracciones más fuertemente unidas a la pared celular. Por otra parte, se observan pocos cambios en el peso molecular de los glucomananos y xilanos, unidos débilmente a la celulosa.

En general, se considera que la celulosa no presenta despolimerizaciones de importancia durante el ablandamiento de los frutos de la mayoría de las especies (Brummell, 2006).

Para analizar si las paredes celulares experimentaron modificaciones de sus componentes, se deben obtener las fracciones enriquecidas en los principales grupos de polímeros, para lo cual las paredes deben ser aisladas, inactivadas sus enzimas y extraídas secuencialmente (Brummell & Harpster, 2001; Brummell, 2006).

Las metodologías variaron con el tiempo y con el material vegetal (Brummell, 2006), pero en todos los casos las extracciones se realizan en varios pasos. Frecuentemente se utilizan los siguientes agentes extractantes:

1. Agentes quelantes como CDTA o EDTA, que remueven los puentes de calcio de la pared, solubilizando las pectinas unidas mediante enlaces iónicos.
2. Na_2CO_3 , que por de-esterificación libera las pectinas unidas a la pared mediante enlaces covalentes; este tratamiento también rompe uniones éster entre moléculas de pectina solubilizadas, resultando en pectinas extraíbles de relativo bajo peso molecular.
3. Alcalis suaves como KOH 1 M ó 4 % (0,7 M), que solubiliza la matriz de glicanos débilmente unidos en la pared (esta

fracción usualmente contiene sólo pequeñas cantidades de xiloglucanos y son principalmente glicanos de entrecruzamiento como glucomananos y glucuronoarabinosilanos).

4. Álcalis fuertes como KOH 4M o 24% (4,3 M), lo que provoca la liberación de glicanos fuertemente unidos en la pared, por medio de la ruptura de puentes de hidrógeno que los ligan con la celulosa, sin que se produzca disolución de las microfibrillas de celulosa. El residuo obtenido luego de esta extracción es principalmente celulosa.

En algunos casos se puede realizar una extracción previa a todos estos pasos con agua para solubilizar las pectinas unidas muy lábilmemente a la pared celular.

1.3- Glicosidasas asociadas a la pared celular en frutos

En los últimos quince años se han investigado intensamente numerosas enzimas que tienen por sustrato variados polímeros de la pared celular de los frutos, en búsqueda de aquéllas que pudieren considerarse claves para el ablandamiento (Brummell & Harpster, 2001; Sozzi, 2004; Brummell, 2006; Vicente *et al.*, 2007; Bennett & Labavitch, 2008; Goulao & Oliveira, 2008). Al bloquear la expresión de los genes codificantes, sin modificar otros caracteres organolépticos, se determinó que ciertas enzimas juegan un papel crítico en la pérdida de firmeza. Son ejemplos de ello la enzima pectato liasa en frutilla (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002), la expansina LeExp1 en tomate (Brummell *et al.*, 1999), y la β -D-galactosidasa II, codificada por el gen *TBG 4*, en tomate (Smith *et al.*,

2002). Este último caso resulta emblemático, porque en los años precedentes se sostuvo que ciertas glicosidasas dependientes del etileno estarían involucradas en el ablandamiento de los frutos (Sozzi *et al.*, 1998). Tiene además suma relevancia económica el hecho de que la supresión de la actividad de una glicosidasa genere tan fuerte impacto en el ablandamiento del fruto, que permanece 40% más firme, y que presenta una sobrevida en almacenamiento de 2 semanas respecto del control (Smith *et al.*, 2002). Dado que varias glicosidasas fueron investigadas más profundamente en frutos, se hará referencia seguidamente a aquellas que serán objeto de estudio en esta tesis.

Durante el ablandamiento de la mayoría de los frutos, uno de los cambios más importantes que ocurre en las paredes celulares es la pérdida de restos de galactosa y/o arabinosa de los polímeros de pared celular (Gross & Sams, 1984; Redgwell *et al.*, 1997; Sozzi, 2004; Brummell, 2006). La galactosa es un componente de los diversos polisacáridos que forman la pared celular incluyendo galactanos, arabinogalactanos, galactomananos, galactoglucomananos, fucogalactoxiloglucanos, además de glicoproteínas de pared. Sin embargo, aparece principalmente como restos galactosilos presentes en ramificaciones laterales del RG I de las pectinas, o como polisacárido independiente formando la cadena principal de galactanos sin ramificaciones, o con ramificaciones de arabinosa (arabinogalactanos) (Carpita & Gibeaut, 1993).

La α -D-Galactosidasa (α -Gal; EC 3.2.1.22) es un tipo de exoglicosidasa capaz de hidrolizar uniones α -galactosídicas. La presencia de este tipo específico de enzimas es esperable en especies que transportan la mayoría de sus asimilados carbonados como oligosacáridos conteniendo α -

D-galactósidos. Sin embargo, los polisacáridos de pared celular contienen una baja concentración galactosa unida mediante uniones α -. Se encontraron α -Gal en tomate, durazno, pera, naranjas, melón, olivo, goldenberry y uva (revisado por Sozzi, 2004; Sozzi & Civello, 2005). Si α -Gal tiene algún rol en el ablandamiento de los frutos, es aún desconocido. Sin embargo, en la pared celular existen componentes que bien pueden ser objetivos potenciales para esta enzima. La α -Gal podría clivar restos α -1,4-galactósidos, que son componentes menores del RG II (O'Neill *et al.*, 1990).

Las β -D-galactosidasas (β -Gal; EC 3.2.1.23) son enzimas que hidrolizan restos galactósidos unidos mediante uniones β -1,4 a otro hidrato de carbono o a una fracción no carbonada. Se han descubierto numerosas β -Gal en frutos de diversas especies constituyendo familias de isoformas, codificadas por familias multigénicas. La más destacada y estudiada es la de tomate (Smith *et al.*, 2000). Sin embargo, no todos los genes estarían relacionados con la maduración. Se propuso que la acción de algunas β -Gal estaría relacionada con el crecimiento como medio de liberación de energía almacenada. En frutos de tomate en maduración, la regulación de dos miembros de una familia de genes de galactosidasa se vincula con la liberación de galactanos y con la consiguiente pérdida de firmeza y de cohesión de los tejidos (Smith *et al.*, 2002; Moctezuma *et al.*, 2003), señalando un rol directo de la galactosa constitutiva de las cadenas laterales de las pectinas en el mantenimiento de la resistencia de la pared. Ross *et al.* (1994) verificaron la actividad *in vitro* de una β -galactosidasa de manzana sobre polisacáridos de pared celular. Alternativamente, las β -Gal podrían ejercer un papel indirecto ya que su acción aumentaría el tamaño de poro, facilitando la exposición de la cadena principal del RG I a la acción

de otras enzimas hidrolíticas (Brummell & Harpster, 2001; Vicente *et al.*, 2007; Bennett & Labavitch, 2008).

Por lo tanto, los galactanos de pectinas parecen estar asociados con diversos aspectos de las propiedades mecánicas de la pared celular, incluyendo la extensibilidad y la firmeza, el grado de adhesión entre células y el tamaño de la porosidad. La acción de las galactosidasas en la degradación de los galactanos de las pectinas podría entonces influir en las propiedades de los tejidos, y en frutos podría resultar en la pérdida de firmeza. Sin embargo en tejidos en crecimiento podría resultar en cambios de la extensibilidad (O'Donoghue *et al.*, 2009).

Las α -L-arabinofuranosidasas (α -L-arabinofuranósido arabinofuranohidrolasas, EC 3.2.1.55; α -Araf) tendrían una función similar a las β -galactosidasas, al actuar sobre las ramificaciones ricas en arabinosa del esqueleto del RG I. Si bien existen **varias isoformas de α -Araf** durante toda la ontogenia del fruto de tomate, una es exclusivamente activa durante la maduración y dependiente del etileno: la misma atacaría fracciones pécticas de la pared celular (Sozzi *et al.*, 2002a; 2002b).

La hidrólisis completa de los arabinoxilanos de la pared celular requeriría la acción adicional de endo- β -1,4-D-xilanasas o 1,4- β -xilano endohidrolasas (EC 3.2.1.8), como así también de β -D-xilosidasas (EC 3.2.1.37; β -Xil). **Las β -Xil** no han sido estudiadas en detalle en frutos climatéricos, aunque ambas actividades se encuentran presentes en palta (Ronen *et al.*, 1991) y en frutos de numerosas especies (revisado por Sozzi, 2004; Sozzi & Civello, 2005). En algunos casos, no se detecta actividad de β -Xil *in vitro*, por ejemplo en manzanas (Dick *et al.*, 1990), aunque puede deberse al uso de metodologías poco apropiadas para su extracción y

determinación (Sozzi & Civello, 2005). Por otra parte, la determinación de actividad contra sustratos de síntesis puede no reflejar la actividad *in vivo*.

Siempre considerando a los frutos climatéricos, Itai *et al.* (1999) informaron la existencia de un clon de β -Xil asociada con la maduración y senescencia de otra Pomoidea, la pera japonesa. En durazno, la expresión del gen *PpAz152* –que muestra homología con genes de β -Xil putativos– resultó ser independiente del etileno (Ruperti *et al.*, 2002). En tomate, dos diferentes cDNAs (*LeXYL1* y *LeXYL2*) mostraron diferentes patrones de expresión, el primero relacionado con el desarrollo del fruto y el segundo con la maduración, aunque ambos resultaron ser independientes del etileno (Itai *et al.*, 2003). En frutos no climatéricos, la expresión del clon *FaXyl1* en frutilla resulta dependiente de la maduración (Martínez *et al.*, 2004). La enzima β -Xil podría estar involucrada en el proceso de ablandamiento, aunque el contenido total de xilosa de la pared celular no cambia apreciablemente durante la maduración en la mayoría de los frutos (Gross & Sams, 1984). Este hecho sugiere una reorganización de los polímeros hemicelulósicos dentro de la pared, más que una digestión de los mismos que conlleve la solubilización o movilización de productos de hidrólisis a reservorios celulares para una metabolización posterior (Sozzi, 2004).

Los residuos α -D-xilosilos aparecen usualmente como cadenas laterales unidas a glucanos o galacturonanos por medio de uniones α -1,6. Las α -D-xilosidasas (α -Xil; EC 3.2.1.) son enzimas capaces de modificar los oligosacáridos componentes de los xiloglucanos en tejidos de plantas. Fueron encontradas en epicótilos de arvejas tratados con auxinas (O'Neill *et al.*, 1989), cotiledones de plántulas de taco de reina (*Tropaeolum majus*) (Fanutti *et al.*, 1991) y hojas de coliflor (Sampedro *et al.*, 2001). En frutos,

se informaron bajos niveles de actividad de la enzima α -Xil en olivo (Heredia *et al.*, 1993) y pimiento (Biles *et al.*, 1997), utilizando p-nitrofenil xilopiranosido como sustrato. O'Neill *et al.* (1989) purificaron una α -Xil de plántulas de arveja que no actúa sobre sustratos cromogénicos (p-nitrofenil- α -D-xilopiranosido), pero que son capaces de clivar uniones α -xilosídicas específicas de oligosacáridos de xiloglucanos. La actividad α -Xil podría también desempeñar un papel clave por el hecho de que los oligosacáridos carentes de restos xilosilos en el extremo no reductor son probablemente incapaces de actuar como aceptores de la enzima xiloglucano endotransglicosilasa (XET; EC 2.4.1.207; Lorences & Fry, 1993). De esta manera, la actividad de la enzima α -Xil podría regular la actividad de la enzima XET in muro y, por lo tanto, intervenir en procesos como el crecimiento o ablandamiento de tejidos en caso de que estos requieran de la enzima XET.

Las β -D-glucosidasas (β -D-glucósido glucohidrolasas, EC 3.2.1.21; β -Glu) se encuentran también ampliamente distribuidas en frutos como manzana, tomate, naranja, melón, durazno, damasco, ciruela, cereza y goldenberry (Sozzi, 2004). Estas enzimas han sido purificadas parcialmente en muy pocos frutos, todos ellos no climatéricos: naranja (Cameron *et al.*, 2001) y cereza dulce (Gerardi *et al.*, 2001). Suelen presentar actividad contra una variada gama de disacáridos (celobiosa, laminaribiosa y genciobiosa entre otros). La β -Glu de cereza dulce presenta además actividad contra prunasina. Algunos miembros de esta familia de enzimas se localizan en el apoplasto y citosol, mientras que otros encuentran anclaje exclusivamente en la pared celular (Gerardi *et al.*, 2001). El estudio de estas enzimas resulta particularmente atractivo, porque muchos

compuestos responsables del aroma de estos frutos son resultantes de hidrólisis de uniones glucosídicas (ver, para manzana, Schwab & Schreier, 1990). En manzana, la mayor parte de la actividad β -Glu está relacionada con la pared celular, dado que se requiere una elevada fuerza iónica para la extracción de la enzima (Dick *et al.*, 1990). Solamente se ha publicado el aislamiento de un gen en frutos (denominado *pBAN EU89*), a partir de la cáscara de banana, cuya expresión es dependiente de la maduración y que codifica para una proteína cuya secuencia guarda similitud con la de una β -Glu (Drury *et al.*, 1999).

Como se comentó anteriormente, muchas glicosidasas están presentes como familias de isoformas. Mientras algunos miembros de una dada familia pueden atacar ciertas fracciones de la pared celular, es posible que no todos estén involucrados en el metabolismo de dicha pared. No sólo se desconoce su distribución temporal en la ontogenia del fruto o sus sustratos *in vivo*, sino que tampoco se conoce su distribución espacial entre los diferentes tejidos, ni su regulación. Sin embargo, un punto resulta más llamativo aún: similares enzimas de pared celular y estructuras poliméricas se encuentran presentes en la mayoría de los frutos, pero la textura de los mismos y la forma en que éstos se ablandan resultan radicalmente diferentes. Esto señala que la presencia de una determinada familia de enzimas en diferentes especies no asegura el cumplimiento de la misma función *in vivo* y refleja el amplio rango de mecanismos involucrados en la despolimerización de la pared celular que afectan las propiedades texturales de los frutos. De allí que el fruto de cada especie constituye, en buena medida, un modelo propio y exclusivo de maduración, y las extrapolaciones de una especie a otra pocas veces resultan válidas (Sozzi & Civello, 2004).

1.4- La manzana como especie objeto de estudio

Las manzanas se encuentran entre las frutas frescas de consumo masivo que más incrementaron su popularidad desde 1970 (How, 1993). Las estadísticas no sólo reflejan el crecimiento en su consumo, particularmente en países desarrollados como los EE.UU., sino las importantes oscilaciones de año en año en el consumo de manzanas *per capita*. Estas modificaciones en los niveles de consumo en plazos cortos no son exclusivas de las manzanas y resultan de cambios en los niveles de suministro más que de cambios en la demanda. Las cosechas abundantes conllevan más elevados niveles de consumo *per capita*, y la disponibilidad de producciones locales puede asimismo incrementar el consumo (Putnam & Allshouse, 1991).

Durante la campaña 2007-2008, las principales zonas productoras de manzana de Argentina produjeron 750.200 toneladas de manzanas, de las cuales el 28% tuvieron por destino la exportación. De éstas, el 49,4% de la producción corresponde a 'Red Delicious', y 19,3% adicional a 'Granny Smith', en tanto que el cultivar temprano 'Gala' contribuyó con el 20,3 % (Anuario Estadístico 2008, Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica). El desarrollo del transporte de larga distancia favoreció la disminución de la importancia de la proximidad al mercado y facilitó la concentración de la producción en áreas con elevada especialización situadas en las provincias de Río Negro, Mendoza y Neuquén. Más aún, la industria de la manzana está experimentando en el mundo un período de intensa competencia que algunos economistas han descrito como un "estado de hipercompetencia" (Eklund Axelson & Axelson, 2000).

Sin embargo, esta concentración de la producción no ha eliminado las producciones locales: muchos productores en diferentes áreas del país han

desarrollado producciones exitosas basadas principalmente en la venta directa a los consumidores, comercios y cadenas de supermercados próximas, aprovechando la llegada más temprana y rápida al mercado y la frescura de sus productos. Los estudios de preferencia realizados con consumidores de manzanas demostraron que los hábitos de consumo desarrollados durante la infancia tienen un impacto significativo en la dieta de los adultos (Krebs-Smith *et al.*, 1996) y que los cultivares consumidos en la casa paterna mantienen una influencia decisiva en las predilecciones de los hijos (Cheng *et al.*, 1996). Las preferencias por manzanas propias de la región también parecen estar fuertemente influidas por la familiaridad por dichos cultivares (Cliff *et al.*, 1999). Por otra parte, variados estudios han demostrado que la calidad de las manzanas es más importante para los consumidores que el precio, siempre que éste varíe dentro de un rango comercial razonable. De hecho, la elasticidad cruzada de precios indica que los cítricos pueden convertirse en sustitutos de las manzanas, de forma que un incremento desmesurado en los precios de éstas últimas provoca un incremento en el consumo de cítricos en detrimento del de manzanas, y viceversa (Richards, 1999; Richards & Patterson, 2000). Estas situaciones pueden conspirar contra una deseable variedad en la dieta.

Durante su ontogenia, el fruto atraviesa diversas etapas caracterizadas por una serie de continuos cambios metabólicos. Luego de la fecundación, la división celular inicial y el cuaje, el fruto experimenta tres etapas fisiológicas fundamentales: crecimiento, maduración y senescencia. La etapa de mayor complejidad es la de la maduración, en la cual se distinguen dos fases: la maduración fisiológica y la maduración organoléptica (Reid, 2002). La primera, que asegura las posibilidades ulteriores del fruto de

alcanzar la madurez organoléptica, sólo se completa adecuadamente con la permanencia del fruto en el árbol. La madurez organoléptica es el proceso por medio del cual las frutas adquieren las características sensoriales que las definen como comestibles, es decir, olfativa, gustativa y visualmente atractivas para su consumo (Reid, 2002) En un fruto climatérico como la manzana, esta etapa se puede completar tanto en el árbol como separado de él (postcosecha). El climaterio respiratorio en frutos fue descrito por primera vez por Kidd & West en 1924 utilizando manzanas en sus ensayos. La producción de CO₂ se incrementa entre 50 y 100% durante la maduración organoléptica, mientras que la producción de etileno, fitohormona gaseosa que regula la maduración organoléptica, aumenta simultáneamente unas 1000 veces. El ablandamiento, el cambio de color de fondo de verde a amarillo, la formación de ceras epicuticulares, y la síntesis de compuestos aromáticos se encuentran directamente asociados a dicho climaterio (Knee, 1993). Sin embargo, la dinámica de la maduración y varios de sus principales indicadores varían sustantivamente, dependiendo del cultivar estudiado (Gussman *et al.*, 1993).

En el caso particular de las manzanas de cultivares tempranos, una de las mayores debilidades es su ablandamiento acelerado durante la maduración. Este problema es particularmente serio en el producto cosechado tardíamente, que suele presentar un mayor porcentaje de descarte en el mercado. Las manzanas manifiestan por lo general una muy buena respuesta a las bajas temperaturas y atmósferas controladas, aunque existe una variación importante que depende del cultivar (revisado por Kupferman, 1997). Los cultivares tempranos han sido los menos estudiados, particularmente los producidos en zonas subtropicales.

1.5- El cultivo del manzano cv Anna en Corrientes

El manzano crece espontáneamente en montes de Europa y Asia Central. Por su adaptación a un amplio rango de condiciones climáticas, a diversos suelos y sistemas de cultivo, el manzano se cultiva extensamente en Europa, Norte y Sud América, Nueva Zelanda, Australia y Asia. Sus cultivares se cuentan en gran número en la mayoría de los países con climas templados (Janick *et al.*, 1996).

Este cultivo es conocido por su alto requerimiento en unidades de frío. Sin embargo, existen grandes diferencias entre cultivares, con oscilaciones de requerimientos que van desde las 200 a las 1400 horas de frío (Samson, 1991). La mayoría de los cultivares antiguos presentan requerimientos de frío más acentuados para la ruptura de su dormición de sus yemas. En la actualidad y merced al mejoramiento genético, se cuenta con cultivares de bajos requerimientos de frío y frutos de buena calidad.

La Fruticultura en el Nordeste Argentino se limita básicamente a cultivos cítricos (naranjas, mandarinas y limones). Casi no existen plantaciones frutícolas comerciales de importancia de otras especies. Esto genera la necesidad de buscar alternativas frutícolas agrónomicamente factibles y económicamente viables que brinden a los productores un cultivo intensivo y rentable para diversificar la producción de frutas de la zona. En el Noreste Argentino prácticamente no se registran estudios con materiales de manzanos de bajos requerimientos de frío, con excepción de algunas evaluaciones de plantaciones de manzanos realizadas en el INTA Cerro Azul, provincia de Misiones. Las plantaciones comerciales de la provincia de Misiones nuclea unas 20 hectáreas de pequeños productores. Las mismas

tienen alrededor de 10 años de implantación y cuentan con cultivares provenientes de Brasil.

En la Provincia de Corrientes, en las localidades de Capital, San Luis del Palmar y Santa Rosa, se producen manzanas de los cultivares Anna, Eva, Anabella, y Caricia, de bajos requerimientos de frío, sobre los portainjertos MM111, EM9 y pie correntino, este último de importancia local. Las plantas de más edad en estos montes son de 8 años.

Existen trabajos experimentales en ejecución con el fin de evaluar el comportamiento vegetativo y reproductivo de estos cultivares en dos montes ubicados en las localidades de San Luis del Palmar y en el Campo Experimental de la FCA-UNNE, en Corrientes Capital. Los resultados preliminares indican que, si bien todos los cultivares cumplimentan los requerimientos de unidades de frío (dado que tienen lugar tanto la floración como la fructificación), el cv. Anna presenta el mejor comportamiento, tanto por su productividad como por la calidad y tamaño de sus frutos. Sin embargo, no se registran trabajos vinculados con el cultivo de callos *in vitro* de este cultivar, o el estudio de enzimas de pared celular.

El cultivar Anna es el resultado del cruzamiento de "Red Hadassiya" x "Golden Delicious" efectuado en Doar Na Shomron, Israel, por Abba Stein en 1959 (Brooks, 1972). Su cultivo se ha extendido ampliamente por las zonas subtropicales del mundo por sus bajos requerimientos de horas de frío (150 a 200 horas). Sus frutos son redondo-cónicos a cónicos-alargados, con fondo amarillo y coloración rojo-rosada (Figura I.1). En San Luis del Palmar la cosecha es en la segunda quincena de noviembre y por ser un cultivar de cosecha temprana se caracteriza por la rápida pérdida de

firmeza de sus frutos, lo cual se traduce en menores posibilidades de comercialización.



FIG I.1: Manzana cultivar Anna en San Luis del Palmar Corrientes.

1.6- El cultivo *in vitro* como sistema de estudio

El cultivo de tejidos consiste en el aislamiento de una porción de la planta (explante), proporcionándole artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Roca & Mroginski, 1993).

El cultivo aséptico *in vitro* de células, tejidos, órganos y sus componentes bajo condiciones físicas y químicas definidas constituye una herramienta importante, tanto para estudios básicos como aplicados. Sus orígenes, que se remontan hasta los inicios del siglo XX, se deben al científico alemán Haberlandt. Los primeros estudios se realizaron en cultivos de enraizamiento, cultivo de embriones y el primer cultivo de callos. El período entre 1940 y 1960 fue marcado por el desarrollo de nuevas técnicas y por el mejoramiento de aquellas que estaban en uso. Fue la disponibilidad de esas técnicas las que lideraron la aplicación del cultivo de tejidos en seis grandes áreas: comportamiento celular (que incluye citología, nutrición, metabolismo, morfogénesis, embriogénesis y patología), modificación de plantas y mejoramiento, plantas libres de patógenos, almacenamiento de

germoplasma, propagación clonal y formación de productos (principalmente metabolitos secundarios), éstos últimos iniciados a mediados de la década de 1960. En la década de 1990 continuó la expansión de la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro*, a un gran número de especies vegetales. Actualmente el cultivo *in vitro* de células sigue siendo una herramienta para el estudio de áreas básicas de la biología de plantas y bioquímica y ocupa un lugar de gran importancia en estudios de biología molecular y biotecnología (Thorpe, 2007).

Las células de las plantas **son "totipotentes"**, lo cual significa que: 1) cada célula cultivada retiene la totalidad de la información genética de la planta madre; 2) cada célula está potencialmente preparada para reproducir toda esta información y, en consecuencia, 3) cada célula es capaz de regenerar un nuevo individuo.

El cultivo de células de plantas recibió mucha atención como potencial fuente de síntesis y extracción de productos naturales (Bourgaud *et al*, 2001), como así también constituyendo un sistema para el estudio de procesos metabólicos (Dougall, 1980).

Los callos, son masas de células desorganizadas, provenientes del cultivo de órganos o tejidos diferenciados, que presentan una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada. Las respuestas cualitativas y cuantitativas del crecimiento del callo en cultivo involucran un sinergismo estrecho y complejo entre el origen del tejido usado para la primera inducción, la composición del medio y las condiciones físicas que prevalecen durante esta etapa (Barba Álvarez, 1991).

A diferencia de los sistemas que involucran plantas enteras, el cultivo *in vitro* de callos, que crece bajo condiciones controladas elimina los efectos

del ambiente que inciden sobre los procesos fisiológicos que puedan suceder en la planta, órgano o tejido que se desea estudiar.

El cultivo *in vitro* de callos representa un sistema biológico artificial que provee una fuente de tejido conveniente y fácil de manejar, que puede regenerarse con relativa rapidez y desde donde se pueden obtener sin dificultad las enzimas asociadas a la pared celular que, como se detallará más adelante, son objeto de nuestro estudio. Por otra parte este sistema de cultivo *in vitro* de callos también permite realizar una gran amplitud de estudios que involucran la adición de reguladores del crecimiento vegetal y de diferentes tipos y concentraciones de hidratos de carbono al medio de cultivo, en niveles similares a los fisiológicos. Por las ventajas previamente señaladas, el cultivo *in vitro* de callos constituye el sistema de estudio utilizado en esta tesis.

1.7- Objetivo general

El objetivo general de esta tesis fue estudiar la modulación *in vitro* de la composición de la pared celular, la variación de la actividad de glicosil hidrolasas asociadas a la pared celular resultante de la influencia de reguladores del crecimiento y de azúcares, y la posible incidencia de los niveles de actividad de esas enzimas sobre la cambios operados en la pared, utilizando callos cultivados de manzana 'Anna' como sistema.

CAPÍTULO 2

Cultivo *in vitro* de pulpa de
manzana

2.1. Introducción

El cultivo de *in vitro* de tejidos vegetales puede ser definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común la característica de que una parte separada del vegetal (explante) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Mroginski *et al.*, 2004). Todas y cada una de las fases que involucra esta técnica, necesarias para llegar a un objetivo exitoso, están condicionadas por factores propios de cada etapa. Uno de los principales factores a tener en cuenta es el objetivo que se persigue con el cultivo *in vitro*. Por nombrar algunos, esta técnica puede ser aplicada para la obtención de plantas con sanidad controlada, micropropagación, obtención de híbridos interespecíficos, obtención de plantas haploides, producción de sustancias útiles, conservación e intercambio de germoplasma o para abordar estudios básicos.

Cuando se utiliza esta técnica para realizar estudios básicos, lo que se busca en muchos casos es la obtención de un sistema de callos (masas de células no organizadas) para estudiar algún proceso fisiológico particular.

A menudo resulta interesante el uso del cultivo *in vitro* de tejidos porque representa un sistema biológico artificial que simplifica las complejas interrelaciones que existen entre las distintas partes de una planta entera, inclusive dentro de un único órgano. Buenos ejemplos de ello son el cultivo de varias especies para el estudio de la floración *in vitro* (Scorza, 1982; Rastogi & Sawhney, 1989; Dickens, 1990; Chia *et al.*, 1999) y de la fructificación *in vitro* (Tisserat & Galletta, 1995; Franklin *et al.*, 2000; Bohdi

Padma & Leung, 2003). Estas técnicas brindan también una valiosa ayuda para estudiar la rizogénesis *in vitro* (De Klerk *et al.*, 1999). El cultivo *in vitro* de microestacas de portainjertos de manzanas ofrece numerosas ventajas para el estudio de mecanismos y respuestas involucrados ante la presencia de situaciones de estrés salino y osmótico (Molassiotis *et al.*, 2006). También se utilizan suspensiones celulares de gramíneas para el estudio del efecto de graminicidas sobre el metabolismo de los lípidos (Price *et al.*, 2003).

Desde hace tiempo se utiliza en manzanas el sistema de cultivo *in vitro* de callos para abordar diversos estudios (ver revisión en Skirvin *et al.*, 1986). Este sistema se utilizó para realizar variadas investigaciones básicas en manzana (Tabla II.1).

La selección del explante está condicionada por lo que se quiere estudiar. Por eso, la correcta elección del mismo puede definir la obtención o no de las respuestas buscadas. Para esta elección es necesario tener en cuenta la edad fisiológica del órgano de donde se obtendrá el material, la época del año, el tamaño del explante, y las características particulares del mismo como ser la presencia de tejidos altamente susceptibles a la oxidación, como es el caso de la pulpa de manzana por la acción de polifenol oxidasas (Nicolas *et al.*, 1994).

La introducción exitosa del material está íntimamente relacionada al manejo de la asepsia, que es uno de los principales problemas que se presenta cuando se quieren establecer los cultivos. La contaminación de los explantes con diversos tipos de microorganismos ocurre principalmente por las condiciones altamente predisponentes del ambiente de cultivo para la proliferación de microorganismos indeseados.

El medio de cultivo que se le proporciona al explante es el que en gran escala define la respuesta de dicho explante. Un medio de cultivo esta básicamente compuesto por una fuente carbonada, nutrientes minerales, sustancias vitamínicas, sustancias reguladoras del crecimiento y, en el caso de medios semisólidos, un agente gelificante. La modificación de los tipos, concentración o combinación de estos componentes podría modular de manera diferencial el metabolismo del tejido objeto de estudio.

Año	Objetivo	Autor/es
1958	Primer cultivo exitoso de tejidos de frutos de manzana	Letham
1970	Estudio de las bases fisiológicas del cultivo de tejidos de pulpa de manzana	Nitsch <i>et al.</i>
1977	Intento de correlacionar la textura de los frutos con características de crecimiento de los callos.	Wallner
1979	Detección y caracterización de una sorbitol deshidrogenasa en callos	Negm y Loescher
1985	Análisis de metodología para aislar proteínas y peroxidasas a partir de callos	Berger <i>et al.</i>
1986	Estudio de la acción fitopatógenos (<i>Venturia inequalis</i>)	Beech y Gessler
1988	Análisis bioquímico del perfil lipídico en callos y frutos de manzana	Prabha <i>et al.</i>
2006	Estudio de metabolitos primarios y el metabolismo de ácidos orgánicos en manzanas	Prabha <i>et al.</i>
2006	Importancia de la arginina descarboxilasa en respuesta a estrés salino en callos	Liu <i>et al.</i>

Tabla II.1: *Diversos estudios realizados en manzanas utilizando la técnica de cultivo in vitro de callos.*

Entre las principales limitaciones señaladas para la introducción *in vitro* de manzana, se cita el ennegrecimiento de los explantes (Wanstreet, 1982). Esta oxidación (“browning”) es debida principalmente a la presencia

de polifenol oxidasas (PPO; EC 1.10.3.1) que son exudadas de la superficie cortada, reaccionando con compuestos presentes en el medio de cultivo. Estos componentes pueden ser tóxicos para el explante, causando inclusive la muerte del mismo. La eliminación o disminución de esta oxidación puede lograrse con la incorporación de agentes antioxidantes al medio de cultivo, como por ejemplo el ácido ascórbico.

La incubación de los cultivos se debe llevar a cabo bajo condiciones controladas de temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperíodo, humedad atmosférica e higiene.

Para establecer un protocolo exitoso que nos permita generar un sistema de estudio, es necesario ajustar todos y cada uno de estos factores.

2.2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo fueron establecer un protocolo efectivo para la obtención de callos provenientes de pulpa de manzana cv Anna y utilizarlo como sistema para el estudio de los efectos moduladores de diferentes sustancias sobre seis glicósido hidrolasas: α -L-arabinofuranosidasa [α -Araf; EC 3.2.1.55], β -D-glucosidasa [β -Glu; EC 3.2.1.21], α y β -D-xilosidasa [α -Xil y β -Xil; EC 3.2.1.- y EC 3.2.1.37, respectivamente] y α y β -D-galactosidasa [α -Gal y β -Gal; EC 3.2.1.22- y EC 3.2.1.23, respectivamente] asociadas a pared celular.

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. Material vegetal

Los frutos de manzanos (*Malus × domestica* Borkh.) de donde se obtuvieron los explantes provinieron de plantas del cultivar Anna injertado

sobre el portainjerto "Pie Correntino" implantadas en una finca particular en el año 2001 en la localidad de San Luis del Palmar situada a 25 km al sudeste de Corrientes Capital (**58° 49' W, 27° 28' S**; Altura: 60 m.s.n.m.).

El lote consta de media hectárea con plantas conducidas en espaldera, en un marco de plantación de 2 m entre plantas y 4 m entre líneas, implantadas en un suelo franco arcilloso con características mólicas, con materia orgánica 1,7%, pH 6.2; fósforo 5 ppm (Bray-Kurtz N°1) y calcio 5,6 cmol kg⁻¹ con una profundidad efectiva de suelo de aproximadamente 100 cm.

'*Anna*' pertenece a los cultivares de bajo requerimiento de horas de frío. Es el resultado del cruzamiento de 'Red Hadassiya' x 'Golden Delicious' efectuado en Doar Na Shomron, Israel, por Abba Stein en 1959 (Brooks & Olmo, 1972). Su cultivo se extendió ampliamente en las zonas subtropicales del mundo por sus bajos requerimientos de horas de frío (150 a 200 horas) y por su buen comportamiento agronómico. Sus frutos son redondo-cónicos a cónicos-alargados, con fondo amarillo y coloración de cobertura rojorosa. El periodo de cosecha registrado en Corrientes se extiende desde la segunda quincena de noviembre hasta la primera de diciembre.

"*Pie Correntino*" (PC) es un pie criollo, probablemente proveniente de semilla, implantado en la localidad de San Luis del Palmar. Posee un porte semivigoroso, buen comportamiento sanitario y ante situaciones de sequía.

En estudios previos realizados en la Cátedra de Fruticultura de la FCA-UNNE en convenio con un productor se evaluó el comportamiento agronómico de la combinación.

2.3.2. Cultivo *in vitro* de tejidos

Los explantes fueron obtenidos de frutos de manzanas inmaduras de 75 días después de plena floración. De acuerdo con Skirvin *et al.* (1986) la desinfección consistió en colocar los frutos sin pelar en etanol 70% durante un minuto, seguido por la inmersión durante 30 minutos en solución de hipoclorito de sodio 1,8% con el agregado de dos gotas de Tween®. Transcurrido el tiempo de inmersión se enjuagaron las frutas cuatro veces en una cámara de flujo laminar con agua destilada estéril. En los tratamientos que involucraron frío, la desinfección y los enjuagues se realizaron con agua a 5 °C.

Previo al cultivo, se pelaron tajadas de los frutos. El cultivo se realizó sin luz directa a fin de evitar la oxidación de los explantes. Cada explante consistió **en un cubo de 5 mm de lado, proveniente del hipanto (“corteza” o “pulpa”)** obtenido a una profundidad de 1 cm desde la capa externa del hipanto (“cáscara”).

Los medios de cultivo se dispensaron en tubos de 11 mL (3 mL de medio de cultivo/tubo) que fueron cubiertos con papel de aluminio y esterilizados en autoclave a 0,101 MPa durante 20 minutos. El pH de todos los medios de cultivo se ajustó a 5,8 con el agregado de KOH o HCl, **previo a la adición de agar 0,65% (Sigma, A1296).** Los trozos de “pulpa” se cultivaron individualmente en tubos de vidrio

El medio de cultivo de iniciación estuvo compuesto por las sales minerales y vitaminas de Murashige & Skoog (1962) (MS) suplementados con 2,4-D 1 mg L⁻¹ y BAP 0,1 mg L⁻¹ como reguladores vegetales del crecimiento y sacarosa 3% como fuente de energía (MC).

Los explantes se cultivaron (1/tubo) en cámara de flujo laminar, recubriéndolos con Resinite AF50®. Posteriormente, los cultivos se ubicaron en condiciones de oscuridad (cámara oscura) a temperatura controlada de 27 ± 2 °C para su incubación.

Los callos obtenidos luego de 30 días de incubación se repicaron a medio de cultivo de iniciación fresco, eliminándose tejido de "pulpa" excedente. Cada 30 días, se subcultivaron los callos en el mismo medio de cultivo fresco, con el objetivo de obtener volumen de material de estudio en activo crecimiento (Figura II.1).

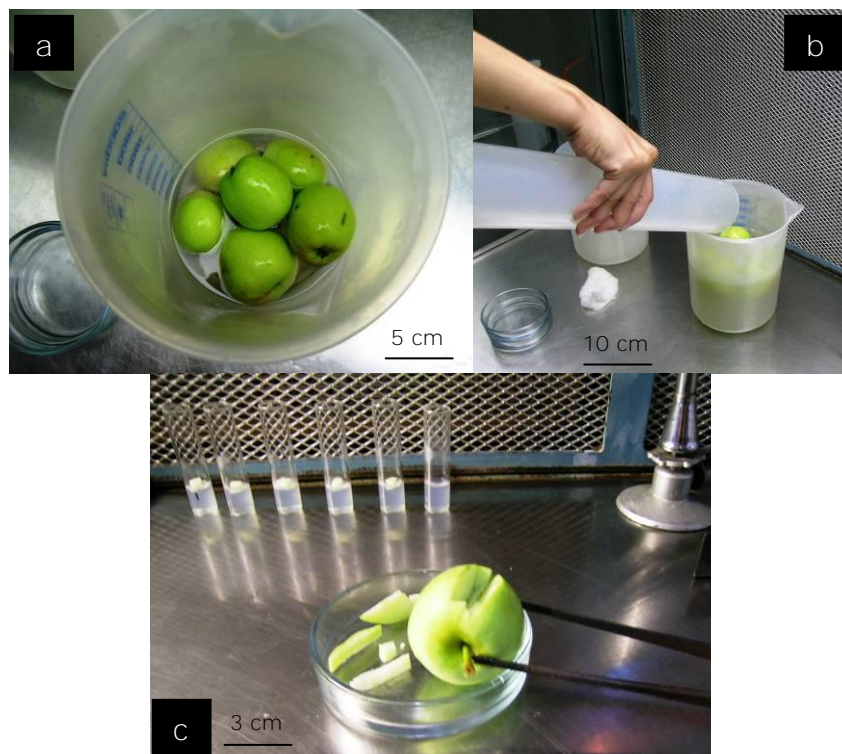


FIG II. 1: Cultivo in vitro de pulpa de manzana. a) Frutas de manzana inmaduras, b) procesos de desinfección en flujo laminar, c) obtención de explante y cultivo.

2.3.3. Tratamientos

2.3.3.1. Selección del explante

Con el objetivo de evaluar que estadio de crecimiento de los frutos era el más apropiado para obtener callos, se utilizaron como explantes manzanas de la variedad Anna cultivadas en San Luis del Palmar Corrientes en dos momentos del crecimiento del fruto: a los 75 días después de plena floración (frutos inmaduros) y luego de 110 días después de plena floración (frutos maduros). Los explantes en ambos casos consistieron en un cubo de 5mm de lado, provenientes del hipanto ("corteza" o "pulpa") a una profundidad de 1 cm desde la capa externa del hipanto ("cáscara").

2.3.3.2. Medio de cultivo de acondicionamiento

Con el objeto de disminuir los problemas de contaminación y "aclimatar" al tejido a las condiciones *in vitro* se utilizó, de acuerdo con Cheng (1978) y previo al cultivo de inducción, un medio de cultivo de acondicionamiento compuesto por sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 3% de sacarosa como fuente carbonada (MA). Los explantes fueron mantenidos en este medio durante una semana. Al cabo del mismo se eliminaron los explantes contaminados o que presentaban ennegrecimiento.

2.3.3.3. Medio de cultivo

El medio de cultivo de inducción fue el propuesto por Pech *et al.* (1975) compuesto por las sales minerales y vitaminas de MS suplementado con 1 mg L⁻¹ 2,4-D y 0.1 mg L⁻¹ de BAP mas 3% de sacarosa como fuente de energía (MC 1).

2.3.3.4. Ennegrecimiento

Con el objeto de disminuir el ennegrecimiento de los explantes se ensayó el efecto antioxidante del ácido ascórbico en cultivo de pulpa de manzana 'Anna'. Se empleó sal sódica de ácido ascórbico 150 ppm, incorporándola tanto al medio de cultivo de acondicionamiento (MAa) como al medio de inducción (MC 2).

Considerando que en la oxidación interviene principalmente la acción de distintas isoformas de una enzima se hipotetizó que, si se realizaba todo el proceso de cultivo a bajas temperaturas, se podría reducir el ennegrecimiento de los explantes. Para ello se evaluó el efecto del frío como condición favorable para disminuir los efectos indeseables de la oxidación. A tal efecto, se trató a los frutos de ambas edades en condiciones de temperatura ambiente y con frío (5°C) desde cosecha hasta su cultivo.

2.3.4. Cultivo e Incubación

Con el objetivo de disminuir los efectos nocivos de la oxidación, el cultivo se realizó en cámara de flujo laminar disminuyendo al máximo la iluminación ($2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los explantes fueron cultivados e incubados como se describió anteriormente.

2.3.5. Parámetros analizados y análisis estadístico

En todos los tratamientos se midieron: obtención de callos (callo), explantes sin respuesta (sin), explantes contaminados (c) y explantes ennegrecidos (e) informando los resultados en porcentaje. Se cultivaron 25 tubos por tratamiento con tres repeticiones independientes de cada uno. Los resultados se presentan como medias \pm el desvío estándar. Se determinaron las diferencias significativas por ANOVA y se compararon las

medias de los tratamientos por medio de la prueba de Tukey ($p < 0,05$) (Anexos Tabla A.1).

2.4. Resultados y Discusión

Luego de 7 días de cultivo de los explantes, se observó en algunos de ellos el inicio de la formación de callos. El aspecto de los explantes y la diferenciación de callos variaron, independientemente del tratamiento. En algunos casos no se observó ningún síntoma de oxidación y presencia de callos blancos transparentes (Figura II. 2 a y b). Otros explantes tomaron coloración marrón (probablemente por la oxidación del mismo) y, sin embargo, en los mismos también se diferenciaron callos (Figura II. 2 c y d). Otros explantes se volvieron totalmente marrones (ennegrecidos) sin observarse en ellos formación de callos (Figura II. 2 e y f). Por último, un grupo de ellos no tomaron ninguna coloración en particular pero tampoco dieron callos (sin respuestas).

En todos los casos, la desinfección propuesta dio muy buenas respuestas en el cultivo de frutas inmaduras. Sin embargo, prácticamente se obtuvieron explantes contaminados en todos los tratamientos de frutos maduros, y hasta 20% en los tratamientos en los que se subcultivaron los explantes de MA a MC 1 y a MC 2 (Figura II.3). Sin embargo en estos mismos tratamientos la utilización de frío disminuyó entre 3,6 y 3,75 veces la infección respectivamente, observándose un comportamiento similar ante el uso de frío en todos los tratamientos de frutas maduras.

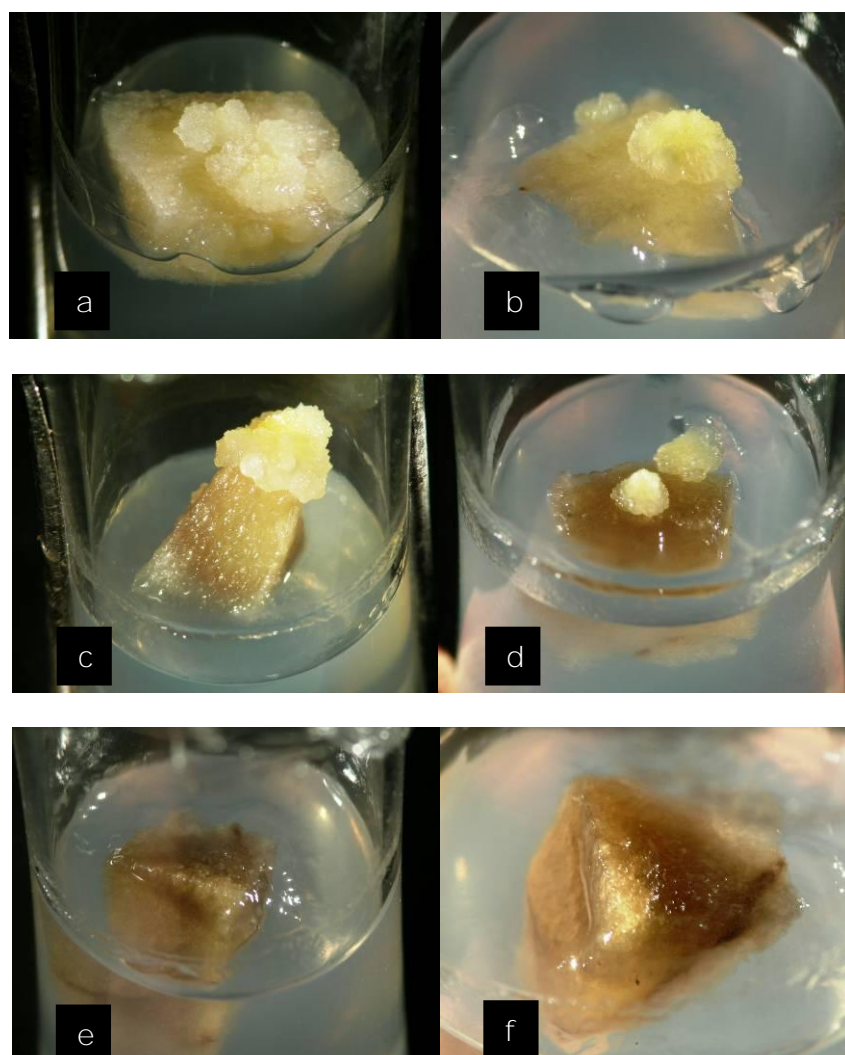


FIG II. 2: Respuestas obtenidas del cultivo in vitro de pulpa de manzana. (a y b) callos blancos transparentes, sin oxidación apreciable en el explante. (c y d) callos provenientes de explantes que sufrieron ennegrecimiento. (e y f) callos notablemente ennegrecidos de los cuales no se diferenciaron callos.

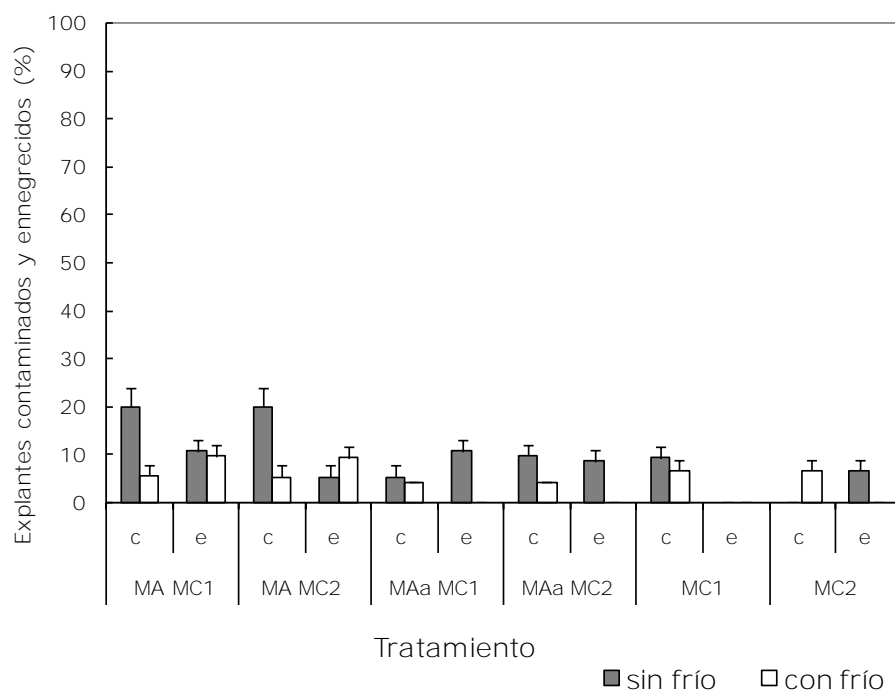


FIG II. 3: Explantes contaminados (c) y ennegrecidos (e), expresados en porcentaje, provenientes del cultivo *in vitro* de pulpa de manzanas maduras con y sin tratamiento de frío.

En el caso del cultivo de manzanas inmaduras, el porcentaje de infección fue muy bajo (4%) o nulo en la mayoría de los tratamientos (Figura II. 4), con y sin utilización de frío, demostrándose así que el protocolo de desinfección propuesto es sumamente conveniente para la introducción *in vitro* de frutas de manzana inmaduras.

Indudablemente, el ennegrecimiento de los explantes inhibe el desarrollo de los mismos e inclusive causa su muerte. En el caso de los frutos maduros (Figura II.3) tratados sin frío, el único tratamiento en que no se observaron explantes ennegrecidos fue en el tratamiento en el que se cultivó directamente en MC 1, siendo 10,67% la oxidación máxima cuando los explantes tratados sin frío fueron cultivados una semana en MAa previo al repique en el MC 1. Sin embargo, cuando los frutos maduros fueron

tratados con frío, sólo se observaron explantes ennegrecidos en los tratamientos a MA a MC 1 y a MC 2 (9,72% y 9,33% respectivamente), sugiriendo que la adición de un compuesto antioxidante al medio de acondicionamiento, conjuntamente con la utilización de frío, fueron tratamientos efectivos para evitar la oxidación de la pulpa de manzana proveniente de frutos maduros. En el caso del cultivo de frutos inmaduros, todos los tratamientos fueron altamente efectivos para impedir la oxidación, ya que no se obtuvieron explantes ennegrecidos en ninguno de los tratamientos (Figura II. 4). Estos resultados sugieren que la causa de la ausencia de oxidación en el cultivo de estos explantes radica en factores intrínsecos de los mismos. Es probable que estos explantes contengan menores niveles de PPO, principal causante de oxidación enzimática en manzana (Haruta *et al.* 1999).

En todos los tratamientos se obtuvieron callos (Figura II. 5 y II. 6).

El máximo porcentaje de callos obtenidos del cultivo de pulpa de manzanas maduras se observó en el tratamiento en el que los explantes tratados con frío, se cultivaron directamente en MC 1 (85,33%) (Figura II. 5) no habiéndose encontrado diferencias significativas ($<0,005$) entre los tratamientos con y sin frío en ninguno de los medios de cultivo ensayados. Se encontraron diferencias en los explantes de frutos maduros sin respuestas, que alcanzaron 44,44% y 43,06% en los tratamientos de MAa subcultivados a MC 1 y a MC 2 con frío respectivamente.

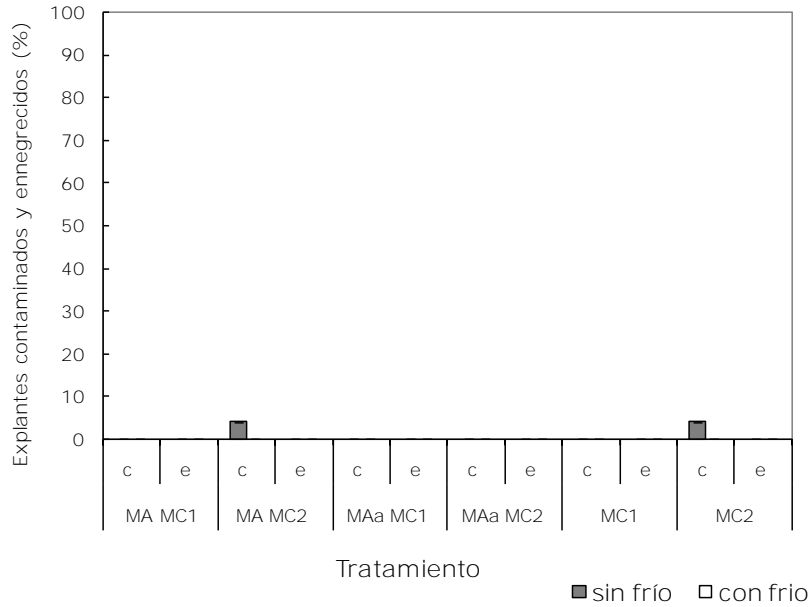


FIG II. 4: Explantes contaminados (c) y ennegrecidos (e), expresados en porcentaje, provenientes del cultivo *in vitro* de pulpa de manzanas inmaduras con y sin tratamiento de frío.

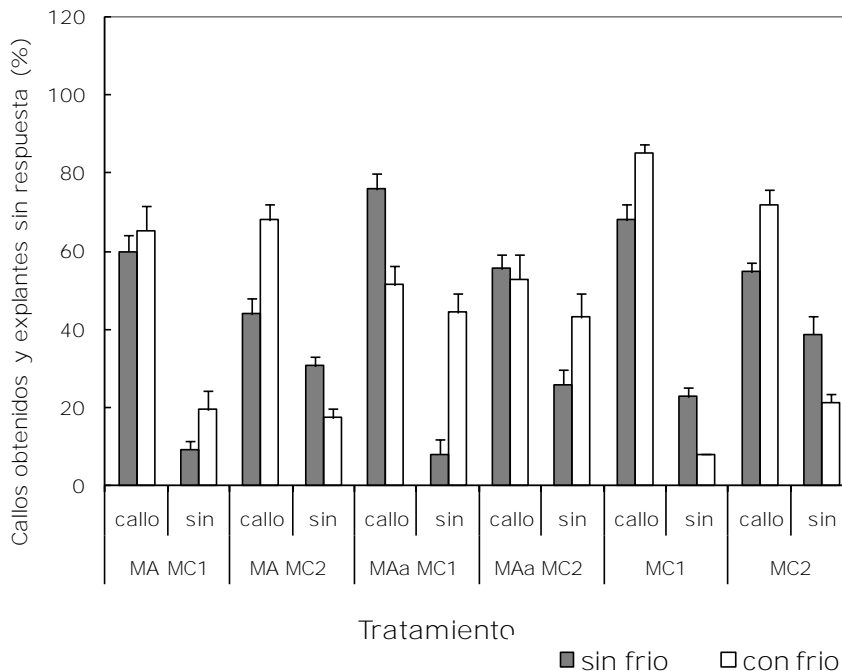


FIG II. 5: Callos obtenidos (callo) y explantes sin respuesta (sin), expresados en porcentaje, provenientes del cultivo *in vitro* de pulpa de manzanas maduras con y sin tratamiento de frío.

El cultivo de frutos inmaduros dio muy buenas respuestas en la diferenciación de callos, obteniéndose en todos los tratamientos porcentajes superiores a 65% (Figura II. 6). Se encontraron diferencias entre el uso o no de frío en los tratamientos de MA a MC 1, de MA a MC 2 y cultivados directamente en MC 2. Sin embargo no hubieron diferencias en los tratamientos de MAa subcultivado a MC 1 y a MC 2 y cultivados directamente en MC 1. La obtención de callos en los explantes cultivados directamente en MC 1 y MC 2 y tratados con frío fue de 100%. Los explantes sin respuestas no superaron el 29,33% (de MA a MC 2 sin frío) habiéndose encontrado diferencias significativas entre el uso y no de frío en los tratamientos de MA a MC 1; de MA a MC 2 y cultivados directamente en MC 2, coincidiendo con los encontrados en la obtención de callos.

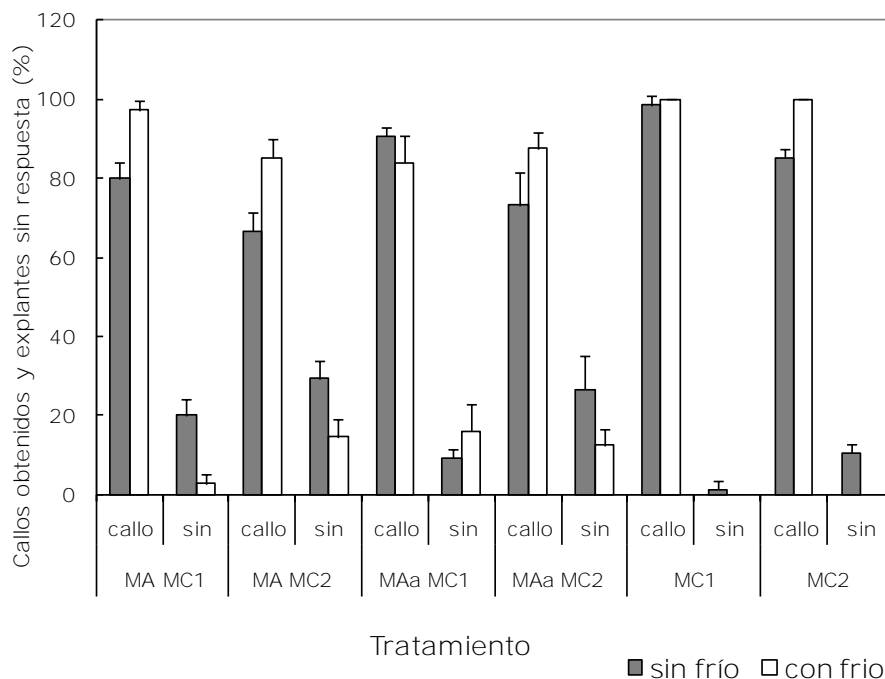
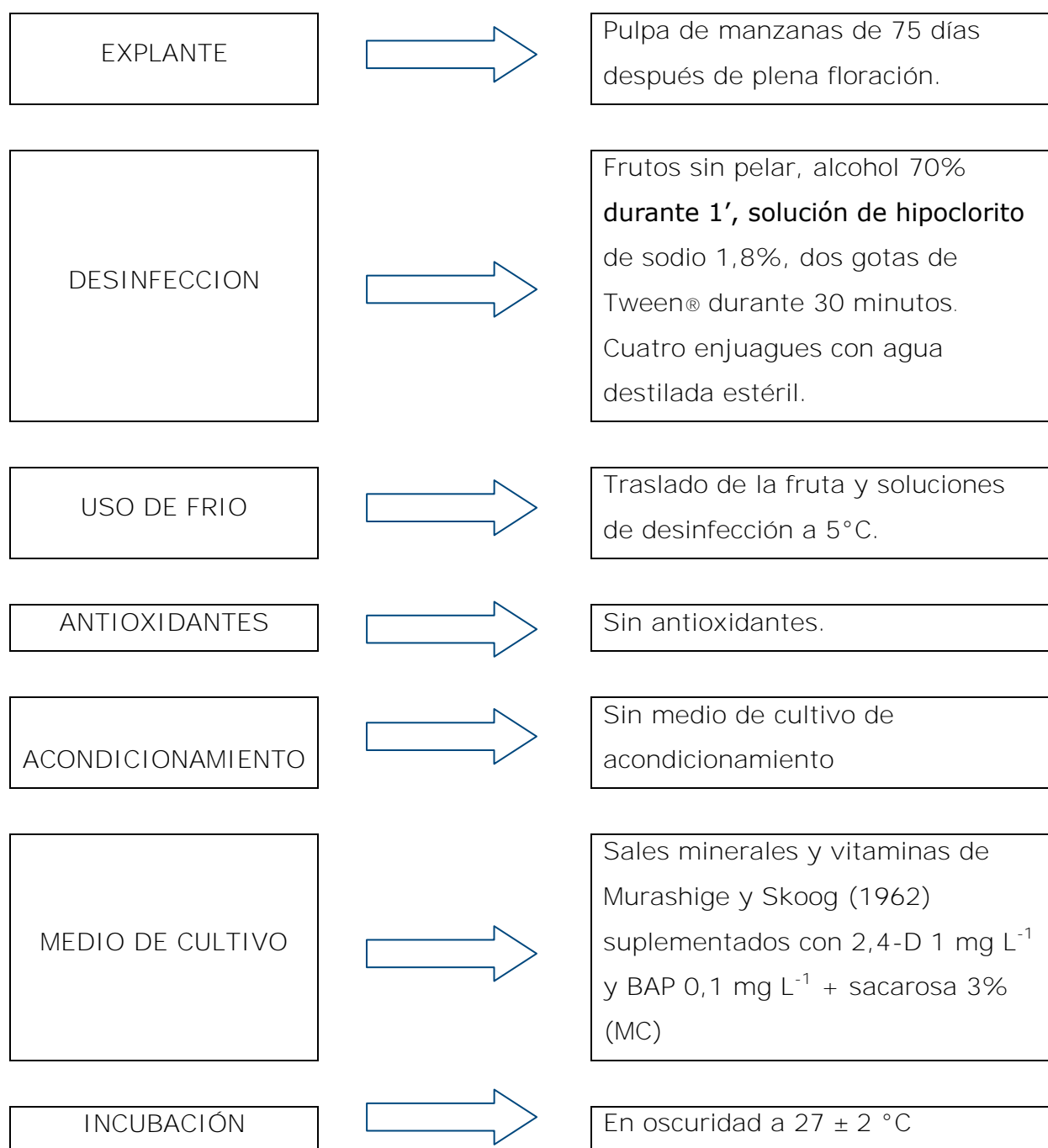


FIG II. 6: Callos obtenidos (callo) y explantes sin respuesta (sin), expresados en porcentaje, provenientes del cultivo in vitro de pulpa de manzanas inmaduras con y sin tratamiento de frío.

Basados en los resultados obtenidos, se propone un protocolo para obtención de callos por medio del cultivo *in vitro* de pulpa de manzana (Figura II.7).

FIG II.7: *Protocolo propuesto para la obtención de callos provenientes de frutos de manzana cv Anna por medio de cultivo in vitro.*



CAPÍTULO 3

Efecto de reguladores del crecimiento en la modulación *in vitro* de glicosidasas asociadas a pared celular

3.1. Introducción

Las glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.) son un grupo de enzimas ampliamente estudiadas (Davies et al., 2005) que hidrolizan uniones glicosídicas entre dos o más hidratos de carbono o entre un hidrato de carbono y un compuesto no hidrocarbonado. A pesar del logro de avances sustanciales en el conocimiento de las múltiples funciones de las glicosidasas en plantas, muchos otros aspectos permanecen aún desconocidos. Varias glicosil hidrolasas de las plantas (GHPs) se encuentran unidas a la pared celular donde pueden potencialmente cortar restos terminales no reducidos de varios homo y heteropolisacáridos de pectinas y hemicelulosas, como así también de diferentes glicoconjugados (Rose et al., 2003; Sozzi, 2004). A pesar de que estas proteínas son vitales en la remodelación de la pared celular, en el metabolismo energético, en la señalización y en la defensa durante el crecimiento y desarrollo, y en las repuestas ante situaciones de estrés (Farrokhi et al., 2006), la complejidad estructural de los polisacáridos que conforman la pared celular hace dificultosa la determinación de los sitios específicos en donde estas enzimas podrían producir cambios funcionales significativos en la pared celular. Más aún, algunas de estas GHPs son enzimas multifuncionales. A la inversa, otras GHPs no se encuentran unidas a la pared celular, son capaces de reconocer uniones localizadas en diferentes moléculas aunque sus sustratos específicos y funciones son aún indefinidos.

Muchas de las investigaciones realizadas en el estudio de la regulación de glicosil hidrolasas se realizaron mayoritariamente en microorganismos debido principalmente a su potencial valor industrial en la

bioconversión de hemicelulosas y pectinas. Sin embargo, los progresos en el estudio y análisis de la modulación de GHPs por reguladores del crecimiento vegetal (RCV) en tejidos vegetales son limitados debido a diferentes problemas que obstaculizaron las investigaciones en esta área del conocimiento. Para realizar estudios en órganos intactos de plantas se requieren infiltraciones por vacío, o la pulverización o inmersión de los órganos vegetales en soluciones de diferentes RCV. Estas metodologías son poco precisas, ya que la entrada y distribución de los RCV en el tejido vegetal son inciertas debido a las barreras naturales que presentan los órganos a la difusión. Además, los tratamientos a cada órgano vegetal deberían ser diferentes, dependiendo de la morfología y anatomía particular de cada tejido y órgano objeto de estudio. Por ejemplo sumergir frutas en soluciones concentradas de RCV puede inducir estrés químico (Sozzi *et al.*, 2000; Vendrell, 1988). Otra metodología para estudiar las respuestas fisiológicas a la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de RCV se basa en la utilización de órganos separados de la planta. Sin embargo este método genera cortes o heridas en los órganos utilizados, induciendo la liberación de etileno. Como excepción, Sozzi *et al.* (2002) demostraron la utilidad del uso de órganos separados de la planta cuando éstos resultan incapaces de producir o de percibir el etileno. Utilizando discos de pericarpio de tomate antisentido para la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa, incapaces de sintetizar etileno ante situaciones de daño al tejido, estos autores excluyeron la interacción entre los RCV aplicados y el etileno producido por el corte del fruto.

El cultivo de frutos y del cáliz (Cohen, 1996; Ishida *et al.*, 1993), como así también el cultivo *in vitro* de callos (Liu *et al.*, 2006) se

utilizaron para caracterizar diferentes aspectos del metabolismo de los frutos. El cultivo *in vitro* de callos representa un sistema biológico artificial que provee una fuente de tejido conveniente y fácil de manejar, que puede regenerarse relativamente rápido y del cual se podrían potencialmente obtener sin dificultad las enzimas asociadas a la pared celular, objeto de nuestro estudio. Por otra parte este sistema de cultivo *in vitro* de callos también permite realizar una gran amplitud de estudios que involucran la adición de niveles fisiológicos de RCV como así también de otros metabolitos al medio de cultivo.

Sin embargo, no hay trabajos científicos publicados previamente acerca de la presencia de GHPs en callos de frutos en general ni de manzanas en particular, ni sobre la modulación de su actividad potencial por diferentes RCV.

3.2. Objetivos

El objetivo de este trabajo fue verificar la presencia de seis GHPs: α -L-arabinofuranosidasa [α -Araf; EC 3.2.1.55], β -D-glucosidasa [β -Glu; EC 3.2.1.21], α - y β -D-xilosidasa [α -Xil y β -Xil; EC 3.2.1.- y EC 3.2.1.37, respectivamente] y α - y β -D-galactosidasa [α -Gal y β -Gal; EC 3.2.1.22 y EC 3.2.1.23, respectivamente] en callos de manzana cultivados *in vitro*, y evaluar su modulación por la adición de diferentes RCV.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Ensayo con reguladores del crecimiento

El material vegetal y la introducción del mismo *in vitro* se realizó según el protocolo descrito en el Capítulo 2.

Para reducir el efecto de los RCV naturales a su mínima expresión, los callos fueron subcultivados una vez (MS-1) o diez veces (MS-10) cada 30 días en MS fresco sin suplemento de hormonas, con el agregado de sacarosa 3% como fuente carbonada. El crecimiento de los callos en un medio basal privado de RCV se debe al denominado “fenómeno de habituación” (en inglés, “*habituation*”). Este fenómeno fue inicialmente descrito en zanahorias por Gautheret (1942), y posteriormente fue observado en cultivo de callos de otras especies incluyendo tabaco, girasol y maíz (Meins & Binns, 1977; Henderson, 1954; Hawes *et al.*, 1985). Este término ha sido dado a todos aquellos cambios heredables relacionados a los requerimientos de nutrientes (en especial a los requerimientos de RCV) que surgen del sistema del cultivo *in vitro* de células. Por lo tanto, cuando un cultivo pierde su requerimiento original de auxinas o citocininas, nos referimos a cultivos “**habituados a la carencia de auxinas o citocininas**” (Meins, 1989). Inclusive en algunos casos los cultivos pueden llegar a “**habituarse**” a la carencia o ausencia de más de un compuesto (Butcher, 1973). Este fue el caso del cultivo *in vitro* de callos de manzanas, que perdieron sus requerimientos de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-bencilaminopurina (BAP) continuando su proliferación aún cuando se subcultivaron numerosas veces a medio de cultivo sin suplemento de hormonas.

Luego de diez subcultivos en MS + sacarosa 3%, se agregaron 5 mg L⁻¹ de cada RCV al medio basal. Los doce RCV ensayados fueron: a) ácido indolacético (AIA); b) ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico

(IBA), dos auxinas de síntesis; c) 2,4-D y picloram (Pic), dos auxinas que, según la concentración utilizada, pueden manifestar propiedades de herbicidas; d) cinetina (KIN), zeatina (ZEA) y N⁶-(2-isopentenil)adenina (2iP), tres citocininas naturales; e) BAP y tidiazurón (TDZ), dos citocininas de síntesis; f) ácido abscísico (ABA); y g) ácido giberélico (AG₃). También se analizó el posible efecto de dos RCV combinados en MC.

Luego de 30 días de cultivo, se cosecharon los callos en activo crecimiento, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta ser utilizados para la obtención de los extractos. Todos los reactivos utilizados fueron de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Se realizaron tres repeticiones independientes de cada tratamiento con regulador, para cada enzima y extracto enzimático (ver más adelante) en estudio.

3.3.2. Determinación de actividades enzimáticas

Cada extracto de las GHPs fue obtenido a partir de 0,5 g de muestras de callo. El tejido de callo fue molido en mortero frío, con el agregado de 1 mL de agua destilada estéril, a la cual se le adicionó polivinilpolipirrolidona 1,5% (p/v). La suspensión obtenida fue homogeneizada y centrifugada a 10000 g durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante recuperado se denominó "fracción soluble en agua" (FSA). Se repitió este procedimiento tres veces y en cada sobrenadante se determinó la presencia de actividad enzimática.

Posteriormente se resuspendió el precipitado en 1 mL de solución reguladora ácido acético / acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5, conteniendo NaCl 1,4 M. Luego de 30 minutos a 4°C, la suspensión se centrifugó a 10000 g

durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante recuperado se denominó “fracción iónica” (FI).

Se midió la actividad de α -Araf, β -Glu, α -Xil, β -Xil, α -Gal y β -Gal utilizando los *p*-nitrofenil glicósidos correspondientes como sustratos, a saber: *p*-nitrofenil α -L-arabinofuranósido, *p*-nitrofenil β -D-glucósido, *p*-nitrofenil α y β -D-xilósido y *p*-nitrofenil α y β -D-galactósido respectivamente.

La mezcla de reacción estaba compuesta por: 100 μ L de extracto enzimático (o dilución apropiada), 100 μ L del sustrato *p*-nitrofenil glicósido 13 mM correspondiente a cada enzima, 125 μ L de solución reguladora ácido cítrico / citrato de sodio 100 mM, pH 4,5, y 100 μ L de albúmina de suero bovino (BSA) 0,1% (p/v). Luego de 1 hora de incubación a 37 °C, se detuvo la reacción con el agregado de 425 μ L de carbonato de sodio 0,13 M. Los blancos para cada enzima (tiempo 0) se prepararon con el agregado de Na₂CO₃ previo a la adición del sustrato. Las absorbancias se midieron a 400 nm y se utilizó como estándar *p*-nitrofenol libre. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μ g de *p*-nitrofenol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. Los cálculos de actividad enzimática se basaron en diluciones que dieran un incremento lineal de *p*-nitrofenol libre luego de un periodo de incubación de 2 horas. Se realizaron tres mediciones independientes por cada enzima y cada tratamiento de RCV.

Se determinó la concentración de proteínas mediante el método de tinción con Coomassie Blue G utilizando los reactivos de Bio Rad (Bio Rad, Richmond, CA, USA) y BSA como estándar.

3.3.3. Parámetros analizados y análisis estadístico

Se preparó y se midió la actividad de tres repeticiones independientes de cada tratamiento de RCV por cada glicosidasa y los resultados se muestran como media \pm el desvío estándar de esas tres repeticiones. Se determinaron las diferencias significativas por ANOVA utilizando el paquete estadístico PC-SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Se comprobaron los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad del modelo propuesto, mediante el test de Levene y el test de Shapiro-Wilk respectivamente. Cuando estos supuestos no se cumplieron, los datos fueron transformados a rangos (Conover & Iman, 1981) para su posterior análisis. Cuando el valor de F resultó significativo, se compararon las medias de los tratamientos mediante la prueba de Tukey ($P < 0,05$). (Anexos Tablas A .2 y A.3)

3.4. Resultados y Discusión

3.4.1. Actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas de α -Araf, α - y β -Xil y β -Glu fueron detectadas principalmente en la FI (Figuras III.1, III.3 y III.4 b).

En muchas publicaciones se describe la separación de las "proteínas de pared celular" por medio de una homogeneización inicial del tejido en una solución reguladora de baja fuerza iónica o en agua (FSA), seguida de varios y sucesivos lavados del pellet para remover las proteínas solubles, previo a la extracción con una solución reguladora con una alta concentración de sales (FI). Sin embargo, algunas proteínas cargadas positivamente pueden permanecer unidas iónicamente a la pared celular

aun cuando la membrana haya sido destruida, ya que los ácidos poligalacturónicos que componen las pectinas podrían actuar como una matriz polianiónica. En este trabajo, se asume que la mayor parte de la actividad enzimática obtenida por la homogeneización del tejido en una solución salina con fuerte capacidad reguladora (FI) proviene de proteínas de la pared celular, considerando que la clasificación final de estas glicosidasas depende de la verificación de su localización subcelular utilizando métodos tales como la inmunolocalización.

En callos MS-10 se observó una disminución de un 43% en la **actividad de α -Araf** en la FI (Figura III.1 b) respecto a MS1 y un 50% respecto a MC. El suplemento de AIA, ANA e IBA (auxinas de síntesis), ABA y AG₃ **al medio de cultivo incrementaron la actividad α -Araf** en la FI respecto a MS-10, un 93%, 51%, 131%, 127% y 186% respectivamente. En cambio, la adición de Pic, y en menor medida de 2,4-D disminuyeron la actividad de esta enzima en esta fracción (Figura III.1 b). **La actividad de α -Araf** en la FI proveniente de callos tratados con AG₃ fue aproximadamente **5135% más elevada que aquella proveniente de callos tratados con Pic**. α -Araf fue la única de las enzimas estudiadas en la cual la actividad manifestó el mismo comportamiento en los diferentes tratamientos, cuando comparamos la FSA y la FI, independientemente del valor absoluto de dicha actividad (Figura III.1).

La actividad de α -Araf en la FSA proveniente de callos tratados con AIA, ABA o AG₃ fue más elevada que aquella proveniente de callos suplementados con Pic (Figura III.1 a). Itai *et al.* (2003) sugirieron que el gen **LeARF1** proveniente de frutos de tomate es negativamente regulado por etileno, mientras que Sozzi *et al.* (2002) encontraron tres α -Araf, cuya

actividad era diferencialmente modulada por auxinas de síntesis, ácido giberélico o etileno, sosteniendo la idea de que la actividad total de α -Araf en tomate es proveniente de una familia de enzimas cuyos integrantes responden a diferentes controles endógenos durante el crecimiento y maduración del fruto.

Se ha descrito que la actividad de α -Araf aumenta en manzanas maduras (Dick *et al.*, 1990; Goulao *et al.*, 2007; Yoshioka *et al.*, 1995), mientras que los contenidos de arabinosa disminuye durante la sobremadurez (Peña & Carpita, 2004). Más aun, la actividad de α -Araf fue detectada no sólo en frutos en desarrollo sino también en estadios tempranos del desarrollo del fruto, tanto en manzana (Goulao *et al.*, 2007) como en pera asiática (Tateishi *et al.*, 1996).

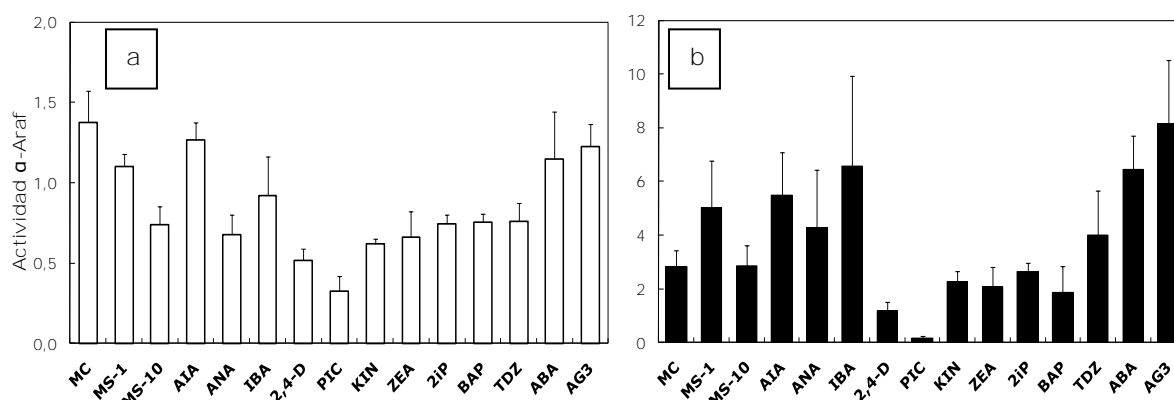


FIG III.1: Actividad específica (unidades enzimáticas) de α -L-arabinofuranosidasa en (a): la fracción soluble en agua y en (b) la fracción iónica, provenientes del cultivo *in vitro* de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal.

Interesantemente, el perfil de actividad de α -Araf es consecuente con el patrón de expresión de MdAF1 (Goulao et al., 2008) el cual muestra una alta similitud con el clon PpARF2 proveniente de pera asiática (Tateishi et al., 2005). En callos, la actividad de α -Araf puede estar asociada a la existencia de restos arabinosilos en las cadenas laterales de las pectinas, influyendo sobre la adhesión "célula - célula".

β -Glu también está ampliamente distribuida en frutas (Sozzi, 2004) incluyendo en manzanas donde sólo se detectó una baja actividad utilizando 4-metilumbeliferil-4- β -D-glucósido (Dick *et al.*, 1990). La actividad β -Glu en la FSA fue apenas detectable en la mayoría de los tratamientos y ausente en callos tratados con ABA (Figura III.4 a). Sin embargo, la actividad β -Glu en la FSA detectada en extractos provenientes de callos tratados con Pic, fue 28 veces mayor en comparación con el tratamiento MS-10. Sumado a esto, β -Glu fue la única de las enzimas estudiadas cuya actividad en la FI se incrementó 4,2 veces luego de 10 subcultivos (MS-10 vs MS-1 Figura III.1 b), comportamiento que se repitió con la adición de Pic al medio de cultivo. Así, la modulación positiva de β -Glu podría asociarse con ciertas condiciones de estrés, como la presencia de Pic y/o la ausencia de RCV (MS-10). De hecho, un gen homólogo a β -Glu se expresa en manzanas exclusivamente durante el proceso de infección de frutas por *Penicillium expansum* (Sánchez-Torres & González-Candelas, 2003). β -Glu ha sido detectada en suspensiones celulares en un amplio rango de especies, incluyendo zanahoria (Konno *et al.*, 1996). En cerezas, la liberación de glucosa proveniente de la pared celular por acción de β -Glu sugiere que esta enzima puede cumplir un rol en el metabolismo de pared celular (Gerardi *et al.*, 2001).

En manzanas y en otras especies, β -Glu también estaría involucrada en la hidrólisis enzimática de glicoconjugados de frutas que tienen un papel importante como precursores del sabor (Kramer *et al.*, 1991; Schwab & Schreier, 1988). Muchos metabolitos componentes del sabor (por ejemplo derivados del ácido shikímico, y compuestos terpénicos) son típicamente **conjugados de glucosa como β -D-glucopiranosidos sin aroma**, o formas más complejas de diglicósidos con glucosa formando nuevos conjugados con una segunda unidad de azúcar (por ejemplo α -arabinofuranosa, β -D-xilopiranososa, etc.).

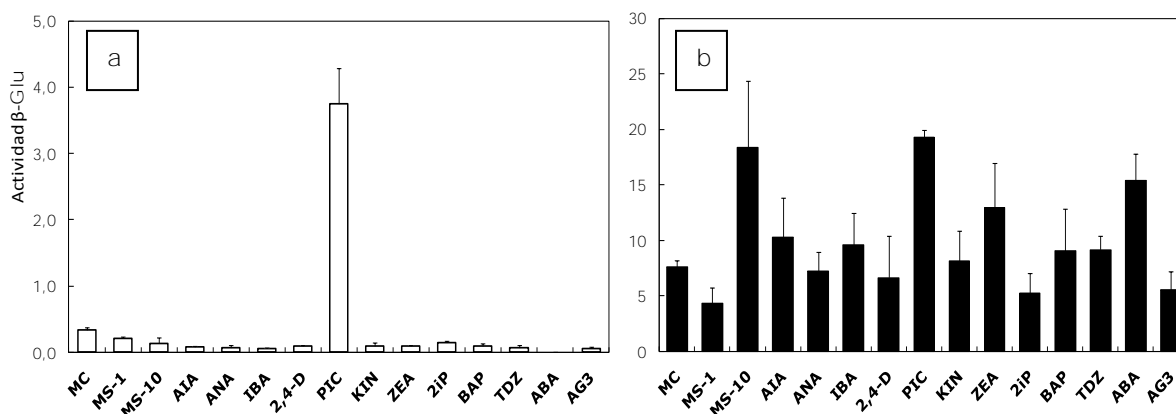


FIG III.2: Actividad específica (unidades enzimáticas) de β -D-glucosidasa en (a): la fracción soluble en agua y en (b) la fracción iónica, provenientes del cultivo *in vitro* de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal.

En nuestros experimentos la actividad de α -Xil en la FSA no fue afectado por los sucesivos subcultivos de los callos (actividad en MS-10 vs MS-1) (Figura III.2 a) ni por la adición de la mayoría de los RCV (AIA, auxinas de síntesis, KIN, BAP y AG₃). En la FSA, la actividad de α -Xil disminuyó en extractos provenientes de callos tratados con 2,4-D, Zea, TDZ, y ABA, y fue totalmente inhibida en aquellos tratados con Pic. Por otro

lado, la actividad de α -Xil en la FI fue notablemente incrementada por el subcultivo de los callos (MS-10 vs MS-1) (Figura III.2 b), y solamente en el tratamiento con Pic se observó niveles de actividad de α -Xil similares a los obtenidos en MS-1. En la FI la actividad de α -Xil se incrementó 5,4 veces respecto a MS-1 en callos cultivados con 2,4-D. Interessantemente, se encontró que la α -Xil de epicótilos de arveja tratados con 2,4-D clivan específicamente una de las uniones α -xilósídicas de sustratos oligosacáridos del xiloglucano (O'Neill *et al.*, 1989).

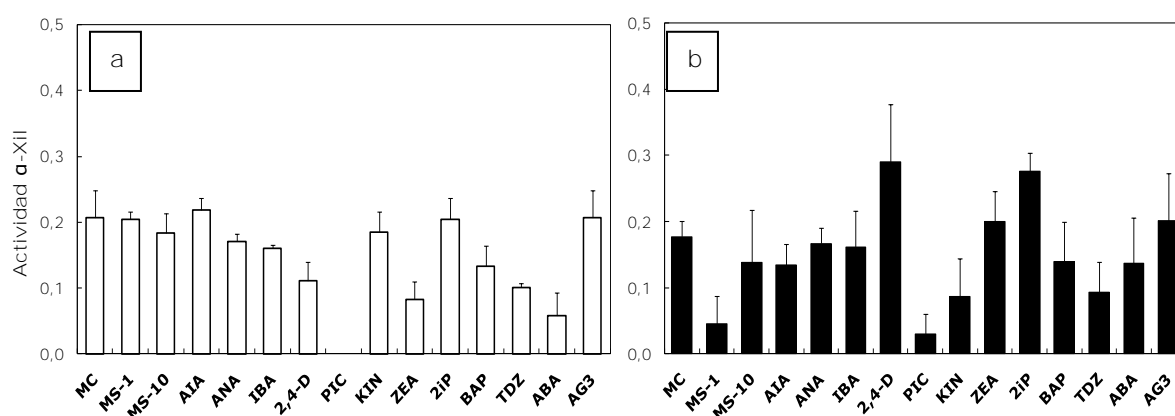


FIG III.3: Actividad específica (unidades enzimáticas) de α -D-xilosidasa en (a): la fracción soluble en agua y en (b) la fracción iónica provenientes del cultivo *in vitro* de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal.

La actividad α -Xil podría también ser crítica por el hecho de que los oligosacáridos carentes de restos xilosilos en el extremo no reductor son probablemente incapaces de actuar como aceptores de la enzima xiloglucano endotransglicosilasa (EC 2.4.1.207; Lorences & Fry, 1993). De esta manera, la actividad de α -Xil podría disminuir la presencia de

oligosacáridos vacantes para la transglicosilación durante el desarrollo de los callos.

La existencia de β -Xil fue verificada en un amplio rango de especies frutales (Sozzi, 2004) pero no fue detectada en manzana utilizando 4-metilumbeliferil-4- β -D-xilósido como sustrato (Dick *et al.*, 1990). Los subcultivos realizados en medios de cultivo sin suplemento de RCV no afectó los niveles de actividad de β -Xil ni en la FSA ni en la FI (MS-10 vs MS-1) (Figura III.3 a y b). Los callos tratados con 2iP, AIA y AG₃ presentaron niveles mayores de actividad β -Xil que aquellos tratados con Pic, por cuyo agregado no se detectó actividad β -Xil en esta fracción (Figura III.3 a). En contraste, la actividad β -Xil en la FI en callos tratados con AG₃ se incrementó aproximadamente un 188% mientras que aquellos tratamientos con auxinas con actividad herbicida (Pic, 2,4-D) o citocininas naturales disminuyeron la actividad β -Xil en esta fracción respecto a MS-10 (Figura III.3 b).

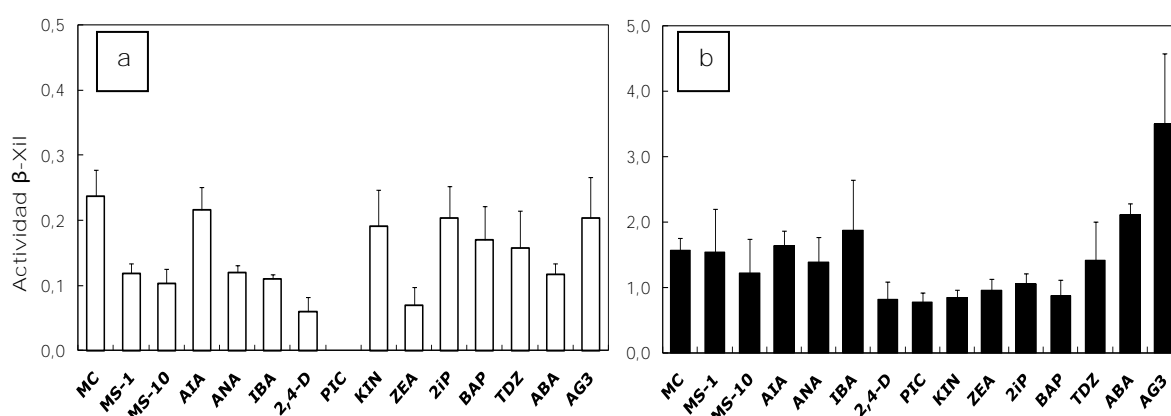


FIG III.4: Actividad específica (unidades enzimáticas) de β -D-xilosidasa en (a): la fracción soluble en agua y en (b) la fracción iónica, provenientes del cultivo *in vitro* de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal.

El transcripto de *PpAz152*, que revela gran homología con β -Xil de plantas, se induce en durazno por la maduración del fruto, la senescencia foliar y la presencia de heridas, pero también fue detectado en estadios tempranos del desarrollo de los frutos, y en todos los estadios del desarrollo de las flores (Ruperti *et al.*, 2002). Este transcripto no fue afectado por la inhibición de la percepción de etileno. Por el contrario, el 1-metilciclopropeno neutralizó parcialmente el incremento de la actividad de β -Xil durante la maduración de la pera europea (Trincherio *et al.*, 2004), lo que sugiere que esta enzima podría estar involucrada en un amplio rango de procesos fisiológicos, modulada por factores del desarrollo y hormonales que varían según tejidos y especies.

En la FSA, la actividad α -Gal disminuyó aproximadamente a la mitad luego de 10 subcultivos respecto a MS-1, recuperando parcialmente este nivel de actividad en los tratamientos con ABA y AG₃. Sin embargo, el suplemento de los RCV no modificó significativamente la actividad de esta enzima respecto a MS-10 en esta fracción (Figura III.5 a). En la FI, no se observaron diferencias en la actividad α -Gal entre MS-1 y MS-10. Sin embargo, el tratamiento con Pic redujo la actividad de esta enzima en un 81% respecto a la observada en el tratamiento MS-1. Las citocininas ensayadas y el ABA disminuyeron la actividad α -Gal entre 50 y 15% sin encontrarse diferencias significativas respecto a MS-1. El AG₃ moduló positivamente la actividad α -Gal con un aumento de 1,75 veces respecto a MS-1 (Figura III.5 b).

Aunque el rol específico que tiene α -Gal en el ablandamiento de frutos es aun impreciso, hay componentes de la pared celular que pueden ser blancos potenciales de esta enzima. α -Gal tiene la capacidad de clivar

restos α -1,4-galactosilos que son constituyentes del ramnogalacturonano II Kim *et al.* (2002) describen que una α -galactosidasa de arroz actúa sobre restos α -galactosilos terminales y de cadenas laterales de los oligosacáridos del galactomanano. Sin embargo, las **funciones de α -Gal** pueden diferir entre isoformas y tejidos.

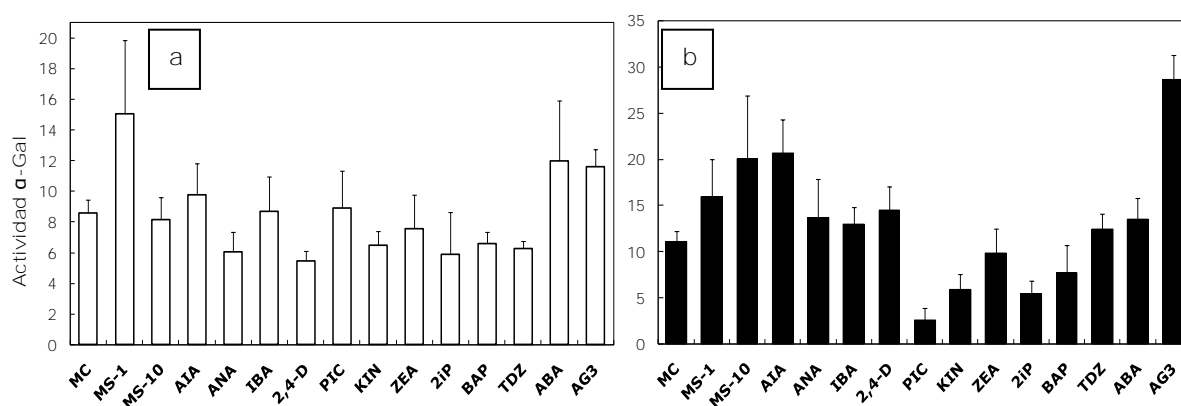


FIG III.5: Actividad específica (unidades enzimáticas) de α -D-galactosidasa en (a): la fracción soluble en agua y en (b) la fracción iónica, provenientes del cultivo *in vitro* de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal.

Se observó una disminución significativa en la actividad β -Gal en la FSA de MS-10, que fue 2,9 veces menor a la detectada en MS-1. El suplemento con auxinas, citocininas y AG₃ no modularon significativamente la actividad de esta enzima en esta fracción. Sin embargo, al igual que lo observado para β -Glu, se detectó un importante efecto del Pic en la actividad β -Gal (Figura III.6 a). La actividad β -Gal en la FSA fue 394% más elevada con el suplemento de Pic respecto a la encontrada en MS-10.

No se encontraron diferencias en la actividad de β -Gal en la FI entre MS-1 y MS-10. Entre las auxinas que pueden tener acción herbicida, Pic disminuyó la actividad de β -Gal en la FI 3,3 veces respecto a 2,4-D, tratamiento que no presentó diferencias significativas con MS-10 en esta fracción (Figura III.6 b). La acción del AG₃ difirió de todos los otros RCV, ya que moduló positivamente la actividad de β -Gal en la FI, con un incremento de 9,2 veces comparada con KIN. Esta respuesta coincide con lo encontrado por Sozzi *et al.* (2002) donde el AG₃ moduló positivamente la actividad de dos isoformas de β -Gal.

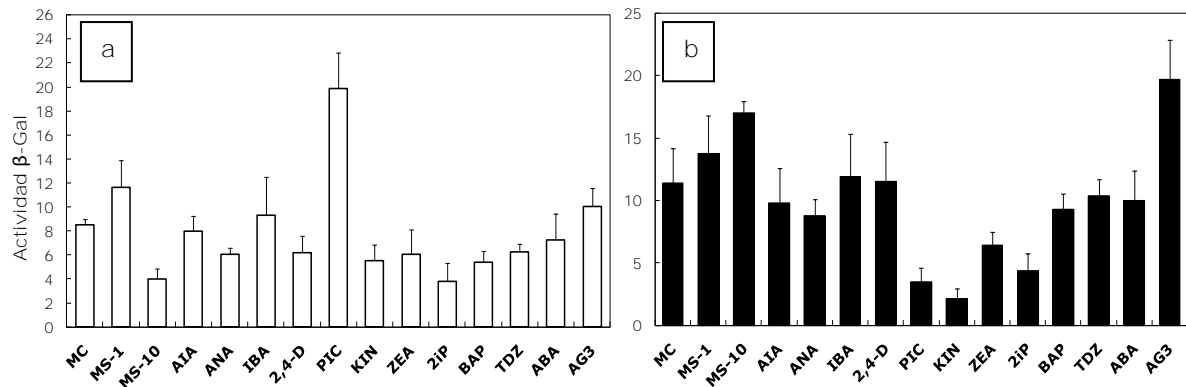


FIG III.6: Actividad específica (unidades enzimáticas) de β -D-galactosidasa en (a): la fracción soluble en agua y en (b) la fracción iónica provenientes del cultivo *in vitro* de callos de pulpa de manzana, tratados o no con diferentes reguladores del crecimiento vegetal.

Es ampliamente conocido que las giberelinas están involucradas en muchos procesos fisiológicos, incluidos la estimulación de la división celular y el incremento de la expansión celular. La presencia de galactanos asociados con la inducción de la elongación en cultivos celulares de zanahoria, muestran que los galactanos de pectinas podrían coadyuvar a la extensibilidad de la pared (Willats *et al.*, 1999). Los galactanos de pectinas

parecen estar asociados con determinados aspectos de las propiedades mecánicas de la pared celular, incluyendo la extensibilidad, la firmeza, la adhesión entre células y el control de la porosidad de la pared celular. Por lo tanto, la acción de las β -galactosidasas en la degradación de galactanos de pectinas podría influir en las propiedades de los tejidos, y en tejidos en crecimiento podría resultar en cambios de la extensibilidad (O'Donoghue *et al.*, 2009).

Debido a los diferentes perfiles de actividades en la FSA y en la FI en respuesta al suplemento de los cultivos de callos con varios RCV, no debería descartarse la existencia de isoformas cuyos genes/actividades estuviesen gobernados por diferentes mecanismos de regulación. Por otro lado, las actividades de α -Araf, β -Glu y β -Xil estarían principalmente asociadas con la pared celular.

Las actividades de las GHPs analizadas son diferencialmente moduladas por auxinas, citocininas, ácido abscísico y ácido giberélico. Así, el suplemento de diferentes RCV podría tener un rol en el metabolismo de pared celular de los callos cultivados y podría ofrecer una nueva oportunidad para definir la composición y calidad de la pared celular en tejidos vegetales.

El aprovechamiento del denominado fenómeno de "habitación" (callos que continúan su proliferación aún cuando han sido transferidos a un medio de cultivo sin RCV) podría ser una importante herramienta para entender la regulación de una plétora de genes y enzimas secretadas a la pared celular.

3.4.2. Aspecto exo-morfológico y crecimiento de los callos

Pasados los 30 días de incubación, se realizó una caracterización exomorfológica de los callos sometidos a los diferentes tratamientos hormonales. Se observó que los callos obtenidos variaron en consistencia y color (Figura III.7).

MC: callos semi-friables de color blanco. Muy buen crecimiento.

MS-1: callos de color amarillo claro, semi-compactos, muy buen crecimiento.

MS-10: callos de color beige oscuro, con formaciones blancas compactas, poco friables. Escaso crecimiento.

AIA: callos poco friables, con formaciones blancas compactas. Bajo crecimiento.

ANA: callos amarillos, friables, con algunas formaciones blancas compactas. Buen crecimiento.

IBA: callos heterogéneos, con zonas amarillas friables, blancas translúcidas y zonas blancas compactas. Buen crecimiento.

2,4-D: callos con zonas blancas friables y amarillas semi-compactas. Buen crecimiento.

PIC: callos homogéneos, blancos translúcidos, con textura "espumosa". Muy buen crecimiento.

KIN: callos amarillos semi-compactos con formaciones blancas compactas. Buen crecimiento.

ZEA: callos amarillos con formaciones blancas compactas. Muy buen crecimiento.

2iP: callos amarillos, friables con algunas formaciones blancas. Muy buen crecimiento.

BAP: callos homogéneos amarillos, compactos, poco friables. Buen crecimiento.

TDZ: callos de color beige, de textura blanda pero no friables, "corchosos". Muy buen crecimiento.

ABA: callos poco friables de color amarillo, con formaciones blancas. Buen crecimiento.

AG3: callos compactos, de color beige con formaciones blancas. Poco crecimiento.

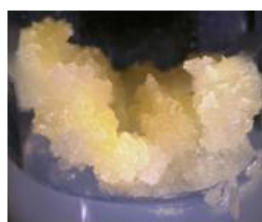
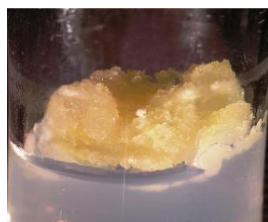
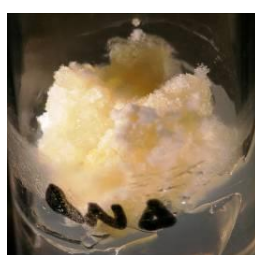
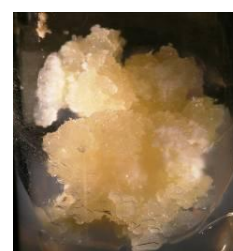
**MC****MS 1****MS 10****AIA****ANA****IBA****2,4-D****PIC****KIN****ZEA****2iP****BAP****TDZ****ABA****AG₃**

FIG III.7: Aspecto exomorfológicos de callos sometidos a los efectos de diferentes tratamientos hormonales.

Siguiendo una escala visual se midió el crecimiento de los callos sometidos a los diferentes tratamientos hormonales (Tabla III.1). Los callos MC, MS-1 y aquellos suplementados con Pic y TDZ alcanzaron mayor crecimiento, en tanto que aquellos sometidos a diez subcultivos (MS-10) y aquellos suplementados con AIA son los que evidenciaron un crecimiento menor.

Tabla III. 1: Crecimiento callos con tratamientos hormonas luego de 30 días de incubación.

Escala 1 a 5:

- 1 (muy bajo) los callos crecieron 2 veces el tamaño inicial.
- 2 (bajo) los callos crecieron 3 veces el tamaño inicial.
- 3 (moderado) los callos crecieron 4 veces el tamaño inicial.
- 4 (alto) los callos crecieron 5 veces el tamaño inicial.
- 5 (muy alto) los callos crecieron más de 5 veces el tamaño inicial.

Tratamiento	Crecimiento de los callos (escala 1-5)
MC	4.95 ± 0.60
MS-1	4.90 ± 0.31
MS-10	1.85 ± 0.67
AIA	2.05 ± 0.69
ANA	3.05 ± 0.60
IBA	2.90 ± 0.72
2,4-D	2.95 ± 0.69
PIC	4.80 ± 0.41
KIN	2.95 ± 0.69
ZEA	3.90 ± 0.79
2iP	4.20 ± 0.77
BAP	3.10 ± 0.64
TDZ	4.80 ± 0.41
ABA	3.80 ± 0.70
AG ₃	2.30 ± 0.80

Cada valor representa la media ± el desvío estándar de 20 muestras independientes.

CAPÍTULO 4

Efecto de diferentes
concentraciones de sacarosa en
la modulación *in vitro* de
glicosidasas asociadas a pared
celular

4.1. Introducción

Durante la vida de las plantas, los hidratos de carbono juegan un rol importante en varias funciones fisiológicas. Los azúcares no son sólo una fuente crucial de carbono y de energía, sino que también actúan como moléculas de señalización, adquiriendo importantes funciones regulatorias al principio de la evolución de las plantas, tanto en el metabolismo general, en los mecanismos de resistencia al estrés, en el crecimiento y en el desarrollo. Ese papel de los azúcares como moléculas de señalización y sus profundos efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas resultó cada vez más evidente (Koch, 2004).

La sacarosa (SAC) es el hidrato de carbono más ampliamente utilizado como fuente carbonada en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Murashige & Skoog, 1962; Thorpe, 1982). Esto se debe probablemente a que la SAC es el hidrato de carbono que se encuentra presente en la savia elaborada de la mayoría de las especies vegetales. Está claro que la hidrólisis y el transporte de la SAC en plantas tiene un rol regulatorio en la distribución del carbono y en la generación de señales (Rolland *et al.*, 2006). Sin embargo, la regulación por azúcares en las plantas es un mecanismo sumamente complejo. Las plantas, como organismos autotróficos, tienen tejidos y órganos exportadores de azúcares (fuente) e importadores de azúcares (destino), y las señales por azúcares son generadas en fuentes variadas y, por tanto, en diferentes sitios de las plantas. Además, la fotosíntesis, el metabolismo del carbono y su distribución, están sujetos a una rigurosa regulación por retroalimentación (feed-back). Además de la fotosíntesis y de la descomposición de la SAC y

del almidón, es probable que la hidrólisis de polisacáridos de pared celular también constituya un mecanismo de generación de señales. A esto se suma que una parte esencial de la señalización mediada por azúcares en plantas presenta intrincadas interacciones con hormonas vegetales.

Se han realizado importantes progresos en las investigaciones acerca de la percepción de un azúcar, pero los avances en la identificación de hidratos de carbono que modulen la actividad de glicosido hidrolasas en tejidos vegetales fueron escasos. En *Arabidopsis thaliana*, la expresión de algunos genes de glicosido hidrolasas que se asumen codificantes de enzimas que liberan restos glicosilos de la pared celular, aumentan en respuesta a condiciones de estrés como oscuridad, deficiencia de azúcares, senescencia e infecciones (Contento *et al.*, 2004; Fujiki *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004).

Sin embargo, la realización de estudios acerca de condiciones de disminución o abundancia de azúcar en plantas enteras es difícil de llevar adelante debido a la complejidad de las interacciones fuente-destino, a las respuestas ante diferentes señales por azúcares, y a la cerrada integración de una compleja red de interacciones de señales gobernado por hormonas vegetales, nutrientes y condiciones ambientales (Rolland *et al.*, 2006). De hecho, diferentes problemas dificultan la investigación en esta área ya que, como se describió en el capítulo 3, la entrada y distribución de reguladores del crecimiento y de azúcares en órganos completos de plantas es incierta.

Para disminuir los efectos de interferencia que pudieran existir en plantas enteras u órganos, este estudio se realizó utilizando el cultivo de tejidos de callos de manzana, que es un sistema biológico artificial que provee una fuente de material de estudio fácil de manipular, que puede ser

rápidamente regenerado (Liu *et al.*, 2006) y a partir del cual se pueden obtener enzimas de pared celular sin dificultades, como se verificara en los estudios correspondientes al capítulo 3 de esta Tesis.

4.2. Objetivos

El objetivo de este trabajo fue dilucidar si la actividad de seis glicósido hidrolasas: α -L-arabinofuranosidasa [α -Araf; EC 3.2.1.55], β -D-glucosidasa [β -Glu; EC 3.2.1.21], α y β -D-xilosidasa [α -Xil y β -Xil; EC 3.2.1.- y EC 3.2.1.37, respectivamente] y α y β -D-galactosidasa [α -Gal y β -Gal; EC 3.2.1.22 y EC 3.2.1.23, respectivamente] de callos de manzana resulta afectada por la concentración de SAC, con o sin el suplemento de reguladores del crecimiento vegetal (RCV).

4.3. Materiales y Métodos

El material vegetal y la introducción del mismo por cultivo *in vitro* se realizó siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 2.

Los callos fueron subcultivados 3 veces en medio de cultivo con y sin suplemento de RCV, utilizando SAC 3% como fuente carbonada.

El experimento consistió en subcultivar los callos en el MS y en MC, suplementados con tres concentraciones decrecientes de SAC: 0,09 M; 0,045 M y 0 M. Luego de 30 días de cultivo los callos fueron cosechados, congelados con N₂ líquido y conservados a -70 °C hasta su análisis.

Se prepararon y midieron las actividades específicas de tres muestras independientes por cada tratamiento y por cada glicosidasa siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 3. Una unidad de actividad enzimática se

definió como $1 \mu\text{g}$ de p-nitrofenol liberado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. Los resultados se presentan como media \pm desvío estándar de las tres repeticiones. Las diferencias significativas se determinaron por ANOVA de dos vías utilizando el paquete estadístico PC-SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Se comprobaron los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad del modelo propuesto, mediante la prueba de Levene y la prueba de Shapiro-Wilk respectivamente. Cuando estos supuestos no se cumplieron, los datos fueron transformados a rangos (Conover & Iman, 1981) para su posterior análisis. Cuando el valor de F resultó significativo, se compararon las medias de los tratamientos mediante la prueba de Tukey ($P < 0,05$) (Anexos Tabla A.4).

4.4. Resultados y Discusión

Con el objetivo de investigar el posible efecto de la concentración de SAC en la modulación de la actividad enzimática de seis glicosil hidrolasas, no se agregó SAC (control) o se adicionó SAC 0,045 M o 0,09 M al medio de cultivo, con o sin el suplemento de RCV. Las enzimas α -Araf, β -Glu, β -Xil y β -Gal fueron principalmente detectadas en la FI (Figuras IV.1, IV.2, IV.4 y IV.6) por lo que se asume son proteínas relacionadas a la pared celular, ya que fueron obtenidas luego de la homogeneización con una solución reguladora salina luego de sucesivos lavados del pellet con agua para remover las proteínas citosólicas. Sin embargo, las actividades α -Xil y α -Gal fueron muy evidentes tanto en la FSA como en la FI de callos de manzana (Figuras IV.3 y IV.5).

Cuando se analizaron los efectos de la presencia o ausencia de RCV, se encontró que en la FSA las únicas enzimas que presentaron diferencias significativas en sus actividades ante la adición de RCV fueron α -Xil y β -Xil (Anexo Tabla A.4). Las actividades β -Glu, α -Xil, β -Xil, α -Gal y β -Gal de la FI fueron mayores ($p < 0,05$) en MS que en MC, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la actividad α -Araf en esta fracción. Esto concuerda con los resultados anteriormente descritos en los que las actividades α -Araf, β -Glu, β -Xil, α -Gal y β -Gal no se incrementan ante la adición de 2,4-D o BAP respecto a MS (Capítulo 3).

Cuando se analiza la concentración de SAC, la actividad α -Araf proveniente de FSA de callos (Figura IV.1 a) cultivados en MS suplementado con SAC 0,045 M, fue más elevada que con SAC 0,09 M y 0 M (2,36 y 2,81 veces respectivamente).

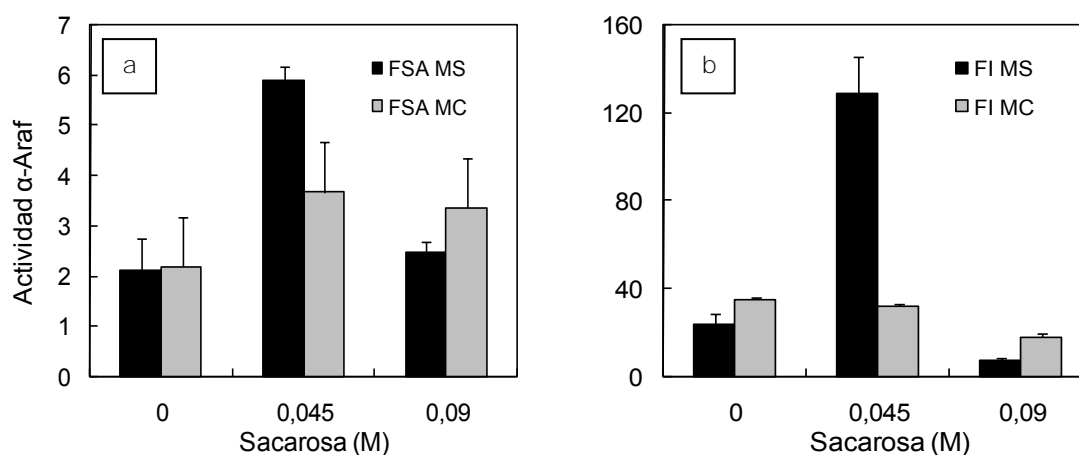


FIG IV.1: Actividad específica (unidades enzimáticas) de α -L-arabinofuranosidasa (a): en la fracción soluble en agua (FSA) y (b): en la fracción iónica (FI), provenientes del cultivo *in vitro* de callos de pulpa de manzana, tratados (barras grises) o no (barras negras) con diferentes reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con tres concentraciones de sacarosa.

La actividad α -Araf de la FI mostró una tendencia similar, siendo aproximadamente 1660% y 440% más elevada en callos cultivados en MS suplementados con SAC 0,045 M que aquellos que fueron suplementados con SAC 0,09 M y 0 M respectivamente (Figura IV.1 b).

La actividad β -Glu se incrementó en condiciones de carencia de SAC y la adición de SAC disminuyó la actividad β -Glu tanto en la FSA como en la FI, independientemente de la concentración aplicada y del suplemento de RCV (Figura IV.2 a y b). La actividad β -Glu en la FSA se incrementó 4,69 (MS) y 8,14 (MC) veces sin SAC respecto al tratamiento con SAC 0,09 M. Esta diferencia puede atribuirse a la ausencia de SAC, ya que no se encontraron diferencias significativas por el suplemento o no de RCV en esta fracción (Anexo Tabla A.4). El comportamiento de la actividad β -Glu fue similar en la FI (Figura IV.2 b), donde la ausencia de SAC incremento 2,41 veces la actividad β -Glu respecto al tratamiento con SAC 0,09 M sin suplemento de RCV y 8,11 veces en MC. En los tratamientos con 0,045 M y 0,09 M de la FI, la tendencia en la actividad β -Glu fue similar a la encontrada en la FSA, aunque en esta fracción se hallaron diferencias significativas por el suplemento de RCV (Anexo Tabla A.4).

Nuestros resultados coinciden con los informados por Lee *et al.* (2007) quienes encontraron que la expresión del gen codificante de β -Glu (At3g60140) en *Arabidopsis* se producía luego de 12 horas de privación de SAC. Además, la expresión de este gen (también llamado gen 2 inducible por la oscuridad) que putativamente codifica para una proteína β -Glu vinculada a la pared celular, es regulada en respuesta a la oscuridad o senescencia de las hojas (Fujiki *et al.*, 2001) sugiriendo una relación con condiciones de estrés. En callos la actividad β -Glu también fue modulada

positivamente bajo condiciones de carencia de RCV o adición de Pic (Capítulo 3) y podría estar involucrada en la utilización de β -glucósidos conjugados como fuente carbonada. Esto puede ocurrir también bajo otras condiciones de estrés, como senescencia de hojas o inhibición de la fotosíntesis (Fujiki *et al.*, 2001; Mohapatra *et al.*, 2010).

La β -Glu se encuentra ampliamente difundida en especies procarionas y eucariotas catalizando la hidrólisis de uniones β -D-glicosídicas en una variedad de conjugados naturales de β -glicosidos (Poulton, 1990).

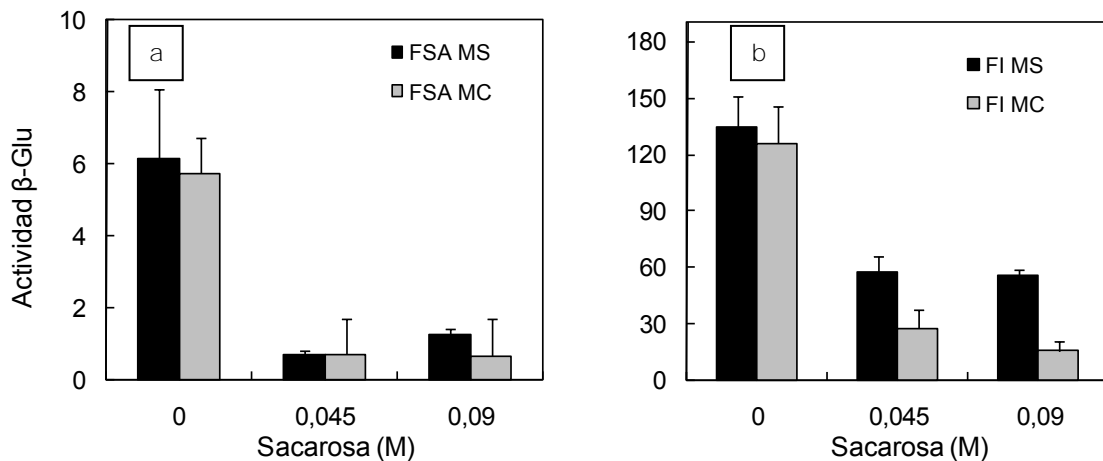


FIG IV.2: Actividad específica (unidades enzimáticas) de β -D-glucosidasa (a): en la fracción soluble en agua (FSA) y (b): en la fracción iónica (FI) provenientes del cultivo *in vitro* de callos de pulpa de manzana, tratados (barras grises) o no (barras negras) con diferentes reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con tres concentraciones de sacarosa.

La actividad α -Xil en la FSA fue en aumento a medida que se incrementó la concentración de SAC independientemente del suplemento de RCV (Figura IV.3 a). La actividad α -Xil aumentó 200% en MS y 300 % en MC cuando la SAC se incrementó de 0 a 0,09 M ($p < 0,05$). El comportamiento fue similar en la FI de MC, siendo la actividad α -Xil 13

veces más elevada en la concentración 0,045 M respecto a 0 M (Figura IV.3 a).

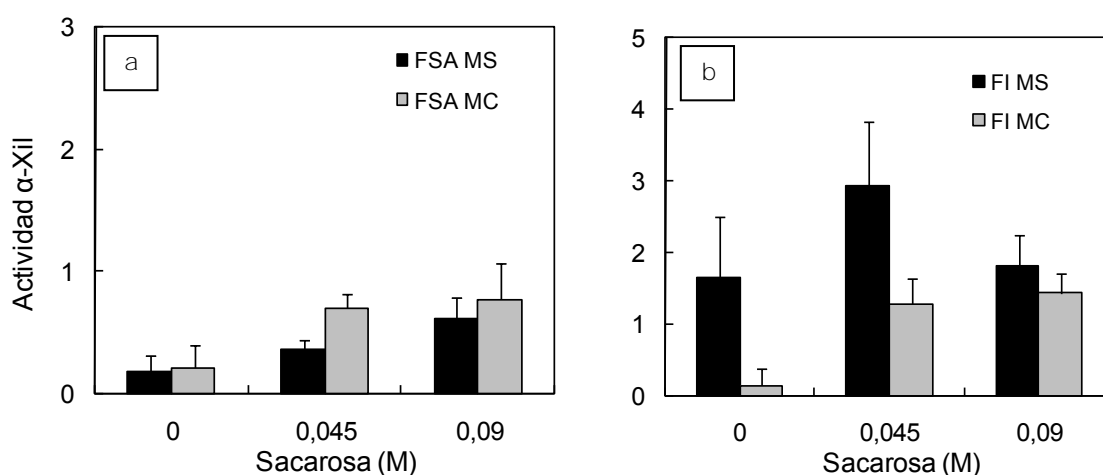


FIG IV.3: Actividad específica (unidades enzimáticas) de α -D-xilosidasa (a): en la fracción soluble en agua (FSA) y (b): en la fracción iónica (FI) provenientes del cultivo *in vitro* de callos de pulpa de manzana, tratados (barras grises) o no (barras negras) con diferentes reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con tres concentraciones de sacarosa.

La actividad β -Xil de la FSA de MS con SAC 0,045M fue 2 veces mayor que la observada en el tratamiento de MS sin SAC (Figura IV.4 a).

En la FI la actividad β -Xil se incrementó 4,52 veces en callos cultivados en MS tratados con SAC 0,045 M, en comparación con aquellos desprovistos de SAC. En cambio, la actividad β -Xil de la FI disminuyó 97% en callos cultivados en MS suplementados con SAC 0,09M en comparación con aquellos suplementados con SAC 0,045M (Figura IV.5 b).

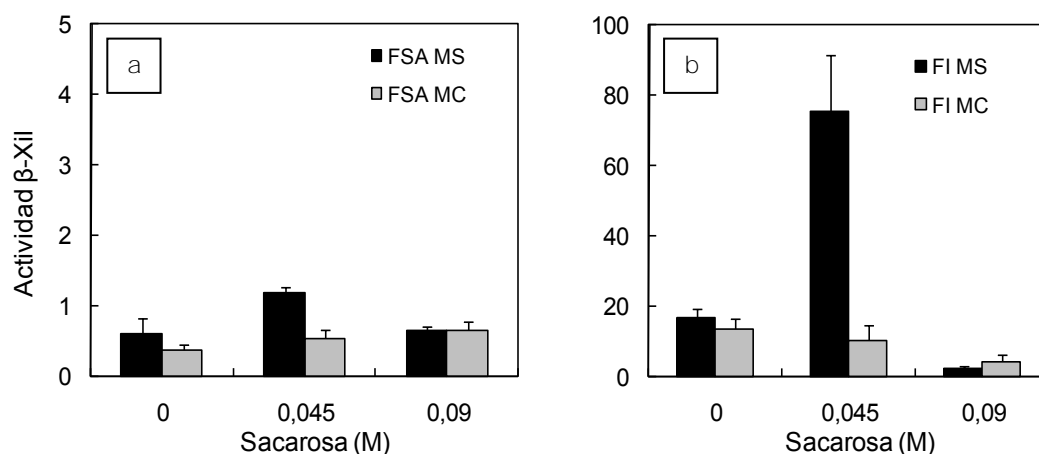


FIG IV.4: Actividad específica (unidades enzimáticas) de β -D-xilosidasa (a): en la fracción soluble en agua (FSA) y (b): en la fracción iónica (FI) provenientes del cultivo in vitro de callos de pulpa de manzana, tratados (barras grises) o no (barras negras) con diferentes reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con tres concentraciones de sacarosa.

La actividad α -Gal en la FSA alcanzó el máximo cuando los callos se suplementaron con SAC 0,045M ($p < 0,05$) pero no disminuyó significativamente cuando la concentración de SAC fue elevada a 0,09 M, independientemente de la presencia de RCV (Figura IV.5 a). La actividad α -Gal máxima en la FI se verificó en los medios de cultivo suplementados con SAC 0,045 – 0,09M (Figura IV.5 b).

Como sucede con otras glicosidasas, la presencia de SAC modula positivamente la actividad α -Gal en callos, cuyo comportamiento puede diferir de otros sistemas en plantas. Chrost *et al.* (2004) encontraron que dos genes codificantes de isoenzimas de α -Gal en hojas primarias de cebada son inducidas por la senescencia causada por el sombreado de las mismas.

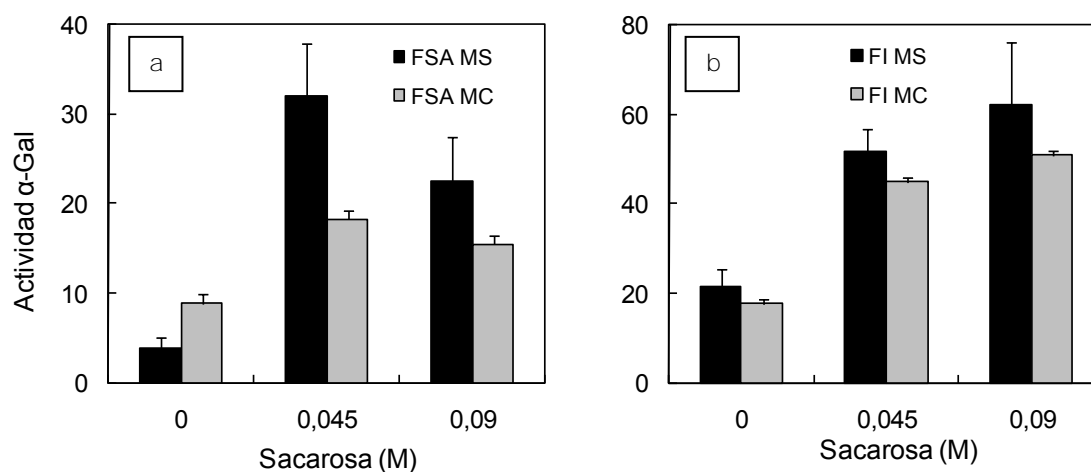


FIG IV.5: Actividad específica (unidades enzimáticas) de α -D-galactosidasa (a): en la fracción soluble en agua (FSA) y (b): en la fracción iónica (FI) provenientes del cultivo in vitro de callos de pulpa de manzana, tratados (barras grises) o no (barras negras) con diferentes reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con tres concentraciones de sacarosa.

La β -Gal en pared celular cataliza la hidrólisis terminal de residuos β -D-galactopiranosidos de varios polisacáridos pécticos (galactanos y arabinogalactanos, típicas cadenas laterales de ramnogalacturonanos) y hemicelulósicos (galactomananos y galactoglucomananos, etc). En manzanas, se probó que la expresión génica de β -Gal no es específica de un tejido (Goulao *et al.*, 2008). La actividad β -Gal en la FSA no presentó diferencias entre tratamientos, independientemente del suplemento de RCV (Figura IV.6 a). En MS la actividad β -Gal en la FI se incrementó aproximadamente 4,9 y 4 veces en cultivos suplementados con SAC 0,045 M en comparación con aquellos sin SAC o con SAC 0,09M respectivamente (Figura IV.6 b).

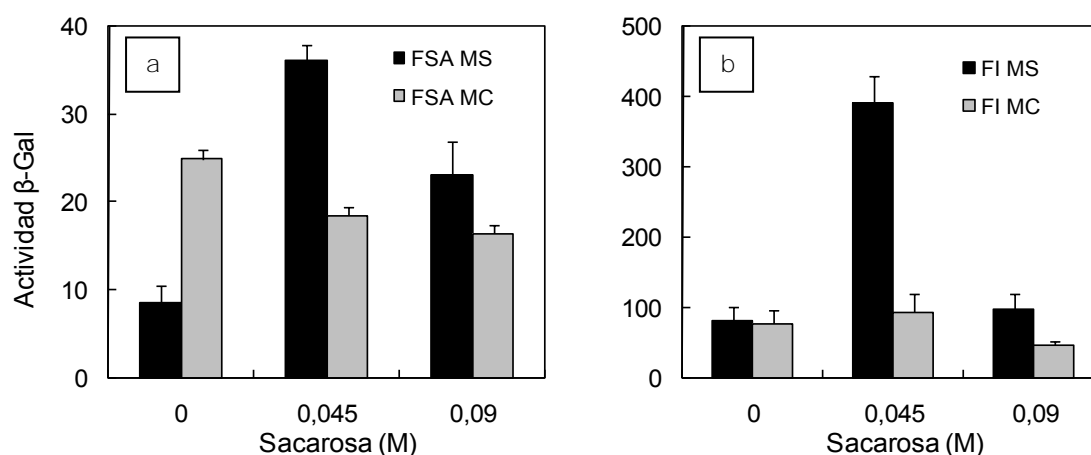


FIG IV.6: Actividad específica (unidades enzimáticas) de β -D-galactosidasa (a): en la fracción soluble en agua (FSA) y (b): en la fracción iónica (FI) provenientes del cultivo *in vitro* de callos de pulpa de manzana, tratados (barras grises) o no (barras negras) con diferentes reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con tres concentraciones de sacarosa.

Ante la adición de diferentes concentraciones de SAC, las actividades α -Araf, β -Xil y β -Gal de de la FI provenientes de callos cultivados en MS manifestaron un comportamiento similar. No resulta extraño encontrar una asociación en los cambios de los niveles de actividad α -Araf y β -Xil, lo que se reitera en otros ensayos de esta tesis (ver más adelante), siendo que existen glicosidasas vegetales bifuncionales que presentan ambas actividades *in vitro* (Tateishi *et al.*, 2005; Di Santo *et al.*, 2009)

Se identificaron tres clases de enzimas en plantas que degradan arabinosilanos: endoxilanasas (EC 3.2.1.8), β -Xil y α -Araf. Las endoxilanasas y las β -Xil serían responsables del clivaje de la cadena principal de los xilanos, de forma endógena o en su unidad terminal respectivamente, mientras que las α -Araf podrían remover cadenas laterales de arabinosa de xilanos u oligoxilanos (Minic & Jouanin, 2006; Minic, 2008).

La modulación de β -Gal y de β -Xil por la adición de SAC pareciera diferir según la especie y el sistema utilizado. En *Arabidopsis*, Lee *et al.* (2007) examinaron la expresión de genes putativos codificantes de enzimas β -Gal y β -Xil las cuales podrían intervenir en modificaciones de polímeros de la pared celular. La inducción de estos genes fue reprimida en suspensiones celulares cultivadas en MS con SAC 3%, y se encontró acumulación de proteínas β -Gal durante la privación de SAC.

Por el contrario, la actividad β -Glu se incrementó en condiciones de carencia de SAC y la adición de SAC disminuyó la actividad β -Glu tanto en la FSA como en la FI, independientemente de la concentración aplicada y del suplemento de RCV.

Las diferencias encontradas entre nuestras experiencias y las realizadas por Lee *et al.* (2007) podrían atribuirse a las especies y los sistemas utilizados. Sin embargo el aumento de actividad enzimática en sustratos deficitarios en SAC refuerza la hipótesis de que estas hidrolasas asociadas a la pared celular podrían estar moduladas por la deficiencia de hidratos de carbono. Las diferencias a menudo notables en los comportamientos de todas las enzimas estudiadas al comparar los resultados obtenidos en la FI y en la FSA sugiere la presencia de isoformas citosólicas y asociadas a la pared celular. Por otra parte, los resultados obtenidos sugieren que las paredes celulares no sólo proveen de soporte físico a las células de las plantas, sino que también operarían como reservorio de hidratos de carbono ante situaciones deficitarias.

CAPÍTULO 5

Efecto de diferentes hidratos de carbono en la modulación *in vitro* de glicosidasas asociadas a pared celular

5.1. Introducción

Los polisacáridos de pared celular son los compuestos orgánicos más abundantes encontrados en la naturaleza y un gran número de proteínas identificadas por análisis proteómicos de la pared celular actúan sobre hidratos de carbono. Numerosas enzimas y proteínas están involucradas en la estructura y regulación metabólicas de polímeros diversos de la pared celular (Showalter, 1993). Esto incluye a las GHPs (EC 3.2.1.) las cuales detentan numerosas funciones de gran importancia en el metabolismo de la pared celular, en la defensa de las plantas, en los mecanismos de señalización, en la movilización de reservas almacenadas y en la reorganización de glicanos (Henrissat *et al.*, 2001; Minic *et al.*, 2007; Minic, 2008). A pesar de los importantes progresos realizados para aclarar las múltiples funciones de las GHPs, una cantidad de aspectos permanecen aún desconocidos. Las funciones asignadas a las GHPs son provisorias debido a sus sustratos *in vivo*, las consecuencias de sus funciones biológicas *in muro* y la potencial entrada de azúcares provenientes de pared celular en rutas metabólicas intracelulares no ha sido aún totalmente dilucidado (Jamet *et al.*, 2006).

Numerosas GHPs están unidas a la pared celular donde podrían potencialmente clivar restos glicosilos terminales no reducidos de homo y heteropolisacáridos de pectinas y hemicelulosas, como así también de diferentes glicoconjugados (Rose *et al.*, 2003; Sozzi, 2004). La complejidad estructural de los polisacáridos de la pared celular torna difícil la determinación de los sitios específicos en donde estas enzimas pueden producir cambios funcionales significativos en la pared celular. Por otro

lado, hay otras GHPs que no están unidas a la pared celular y que pueden reconocer uniones localizadas en diferentes moléculas (por ejemplo, citosólicas) pero sus sustratos específicos y funciones están aún en estudio. A esto se suma que, aparentemente, algunas GHPs serían enzimas multifuncionales, con dominios catalíticos pertenecientes a diferentes “familias” de enzimas.

Es indiscutible la participación de los hidratos de carbono cumplimentando diversas funciones fisiológicas durante la vida de las plantas, siendo no sólo fuentes cruciales de carbono y de energía, sino también moléculas de señalización que han adquirido una importante función regulatoria controlando el metabolismo, resistencia al estrés, crecimiento y desarrollo.

En algunos casos los genes/enzimas de las plantas están directamente modulados por hidratos de carbono y aparecen como parte de un sistema básico que responde a la disponibilidad de nutrientes. A pesar de las exhaustivas revisiones publicadas sobre varios aspectos de la regulación por azúcares en plantas (Koch, 1996, 2004; Rolland *et al.*, 2006; Smeekens, 2000), quedan por dilucidar los mecanismos exactos involucrados en la función de los azúcares como moléculas de señalización y su ámbito de acción. No resulta sorprendente que intrincadas interacciones regulatorias con hormonas vegetales constituyan una parte esencial de la red de percepción y señalización en la que intervienen los azúcares.

Los azúcares por sí mismos pueden señalar modificaciones en la expresión génica y en la actividad enzimática de forma similar a las hormonas. Mientras que las hormonas son moléculas funcionales dentro de un rango de concentraciones que varía entre los nano a micromolar, los

azúcares participan en metabolismos intermediarios en rangos de concentración de milimolares. La percepción de un azúcar (“sugar sensing”) puede ser definido como la interacción entre una molécula de azúcar y una proteína sensor de forma tal que se genere una señal. Esta señal inicia luego una cascada de transducción de señales que resulta en respuestas celulares, tales como alteraciones de la expresión génica y de la actividad enzimática (Smeekens, 2000).

La utilización del cultivo *in vitro* como sistema controlado nos ofrece una herramienta adecuada para abordar estudios fisiológicos de la actividad de GHPs en callos de manzanas ante la adición de diferentes hidratos de carbono.

5.2. Objetivos

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la modulación de la actividad de seis glicosil hidrolasas: α -L-arabinofuranosidasa [α -Araf; EC 3.2.1.55], β -D-glucosidasa [β -Glu; EC 3.2.1.21], α y β -D-xilosidasa [α -Xil y β -Xil; EC 3.2.1.- y EC 3.2.1.37, respectivamente] y α y β -D-galactosidasa [α -Gal y β -Gal; EC 3.2.1.22 y EC 3.2.1.23, respectivamente] provenientes de callos de manzana por la adición de nueve hidratos de carbono diferentes con o sin el suplemento de reguladores del crecimiento vegetal (RCV).

5.3. Materiales y Métodos

El material vegetal y la introducción del mismo por cultivo *in vitro* se realizó siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 2.

Previamente a los tratamientos, los callos fueron subcultivados 5 veces en el medio basal (MS) y en el medio de cultivo de inducción (MC) suplementados con sacarosa 3% como fuente carbonada.

Para analizar el efecto de diferentes hidratos de carbono se suplementó al MS y al MC con los siguientes azúcares:

- a) tres monosacáridos: glucosa (GLU), fructosa (FRU) y galactosa (GAL);
- b) tres disacáridos: sacarosa (SAC), maltosa (MAL) y lactosa (LAC);
- c) un trisacárido: rafinosa (RAF)
- d) dos azúcares-alcohol: sorbitol (SOR) y manitol (MAN).

Luego de 30 días de cultivo se midió el crecimiento de los callos por medio de la siguiente escala visual:

- 1: muy poco crecimiento, los callos crecieron 2 veces el tamaño inicial;
- 2: poco crecimiento, los callos crecieron 3 veces el tamaño inicial;
- 3: crecimiento moderado, los callos crecieron 4 veces el tamaño inicial;
- 4: buen crecimiento, los callos crecieron 5 veces el tamaño inicial.

Por tratamiento se evaluaron 20 réplicas independientes (tubos). Luego los callos se cosecharon, se congelaron con N₂ líquido y se mantuvieron a -70°C hasta su análisis.

Se prepararon y midieron las actividades específicas de tres muestras independientes por cada tratamiento y por cada glicosidasa siguiendo el

protocolo descrito en el Capítulo 3. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 μg de p-nitrofenol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. Los resultados se presentan como media \pm desvío estándar de las tres repeticiones.

Las diferencias significativas se determinaron por ANOVA de dos vías, considerando las variables "azúcar" y "RCV", utilizando el paquete estadístico PC-SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Se comprobaron los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad del modelo propuesto, mediante la prueba de Levene y la prueba de Shapiro-Wilk, respectivamente. Cuando estos supuestos no se cumplieron, los datos fueron transformados a rangos (Conover & Iman, 1981) para su posterior análisis. Cuando el valor de F resultó significativo, se compararon las medias de los tratamientos mediante la prueba de Tukey ($P < 0,05$) (Anexos Tablas A.5; A.6 y A.7).

5.4. Resultados y Discusión

Diferentes análisis genéticos revelaron extensas interacciones entre azúcares y la señalización por hormonas vegetales (Rolland, 2006). Para valorar si los efectos observados en el capítulo 4 son SAC-específicos, se analizaron otros azúcares con y sin suplemento de RCV.

Las actividades de las GHPs en cultivos de callos mostraron diferentes comportamientos cuando fueron cultivados en MS o en MC. Aunque no se establecieron patrones generales de actividad cuando los cultivos fueron suplementados con azúcares y RCV simultáneamente, los callos que fueron cultivados en MS y suplementados con la mayoría de los azúcares mostraron actividades α -Araf, β -Glu, β -Xil y β -Gal en la FI más elevadas que aquellos que crecieron en MC (Figuras V.1, V.2, V.4 y V.6 b). Por el

contrario las actividades α -Xil y α -Gal de la FI fueron prácticamente iguales o más elevadas en MC, exceptuando el caso de adición de manitol (Figuras V.3 y V.5 b). En la FSA β -Glu, α -Gal y β -Gal presentaron diferencias significativas atribuidas al suplemento o no de RCV, mientras que en la FI estas diferencias fueron detectadas para todas las GHPs (Anexos Tablas A.5 y A.6).

La **actividad de β -Glu** de la FI fue siempre mayor en callos que crecieron en ausencia de RCV, y el alcance del incremento en comparación con aquellos que crecieron con el suplemento de RCV fue ampliamente dependiente del azúcar adicionado al medio: GLU (26%), RAF (49%), SAC (74%), SOR (84%), LAC (85%), GAL (115%), MAL (116%), MAN (120%) y FRU (450%).

En la mayoría de los casos, el tipo de azúcar suplementado al medio modifica la actividad de las glicosidasas y esto se vuelve más notable en la FI debido a los altos niveles de actividad de las GHPs encontrados en esta fase.

Algunos monosacáridos (FRU en particular) fueron mejores **inductores de actividad de α -Araf, β -Xil y β -Gal** de la FI que los disacáridos (SAC, MAL y LAC) o trisacáridos (RAF) y tan buenos inductores como azúcares-alcoholes (MAN y SOR) (Figuras V.1, .V4 y V.6 b). FRU y MAN **fueron más efectivos ($p < 0,05$) para elevar la actividad de α -Araf** de la FI que SAC, MAL, LAC y RAF, mientras que GLU y SOR fueron más efectivos que SAC y MAL (Figura V.1 b). Los callos provenientes de medios de cultivo suplementados con FRU, GLU y MAN alcanzaron **una mayor actividad β -Gal** de la FI que aquellos suplementados con SAC, MAL o LAC (Figura V.6 b).

También la actividad de β -Xil de la FI fue más elevada en callos cuyos medios de cultivo fueron suplementados con MAN, GLU, FRU o SOR que aquellos suplementados con SAC, MAL, RAF o LAC (Figura V.4 b y Anexo Tabla A.7).

Por consiguiente, los resultados obtenidos en callos de manzana son contrarios a aquellos encontrados en otras especies y sistemas. Lee *et al.* (2007) encontraron en *Arabidopsis* que la expresión de β -Gal (At5g56870) y β -Xil (At5g49360) son reprimidas en suspensiones celulares que crecieron en medios de cultivo suplementados con GLU, GAL y FRU, y un efecto similar se encontró con la utilización de SAC. Nuestros experimentos con callos de manzanas muestran que algunos de estos monosacáridos pueden inducir actividades más elevadas que SAC para β -Xil y β -Gal de la FI.

MAN indujo actividades β -Glu en la FI más elevadas ($p < 0,05$) que SAC, GLU, GAL, MAL, LAC, RAF y SOR y, asimismo, actividades β -Glu en la FSA más altas que ningún otro hidrato de carbono ensayado (Figuras V.2 a y b). En suspensiones celulares de *Arabidopsis*, el gen de β -Glu (At3g60140) es reprimido por GLU, FRU Y GAL pero no por MAN (Lee *et al.*, 2007).

A pesar de que la SAC es el principal producto de la fotosíntesis y el azúcar de transporte en plantas por antonomasia, muchos efectos de señalización durante el crecimiento y metabolismo pueden ser atribuidos a la acción de las hexosas producidas por la hidrólisis de la SAC -GLU y FRU- o a metabolitos derivados (Rolland, 2006). Si bien la SAC es la fuente de energía carbonada más ampliamente utilizada en el cultivo *in vitro* de plantas, en nuestros experimentos la SAC -al igual que los otros dos disacáridos evaluados- no indujeron las mayores actividades de las GHPs,

excepto para α -Gal y α -Xil de la FI. Si algunas GHPs promueven el desmantelamiento de polisacáridos de la pared celular y contribuyen a cambios en la arquitectura de la misma, algunos monosacáridos como GLU y FRU podrían estar involucrados en mecanismos que modulan el metabolismo de las GHPs en callos de manzana.

Los disacáridos como SAC, MAL y LAC, consisten en dos monosacáridos unidos covalentemente por una unión O-glicosídica, que se forma cuando el grupo hidroxilo de un azúcar reacciona con el carbono anomérico de otro. Las diferencias encontradas en las actividades α -Araf, β -Xil y β -Gal de la FI (Figuras V.1, V.4 y V.6 b), en callos tratados con una concentración equimolar de monosacáridos y disacáridos, sugieren la incapacidad de las células de los callos de metabolizar completamente los disacáridos, probablemente debido a la pérdida de capacidad para escindirlos.

La RAF es considerada un hidrato de carbono de transporte y reserva en muchas especies vegetales (constituyente de la serie de oligosacáridos de RAF) y también puede cumplir roles de protección durante la maduración y sequía, y de crioprotección en plantas resistentes a las heladas (Bachmann & Keller, 1995). En nuestros experimentos en los callos tratados con RAF, los niveles de actividad de las GHPs fueron estadísticamente comparables con los obtenidos a partir de callos tratados con SAC. Resulta interesante que, tanto los tratamientos con SAC como con RAF, mostraron niveles relativamente altos de actividad α -Gal en la FI (Figura V.5b). Es probable que los niveles de α -Gal detectados en callos tratados con RAF sean debido a la liberación de SAC, considerando que la mayoría de la α -Gal aislada a partir de órganos de plantas tienen una alta afinidad por RAF y es

capaz de hidrolizarla en GAL y SAC (Keller & Pharr, 1996; Carmi *et al.*, 2003).

MAN y SOR son dos azúcares-alcoholes ampliamente distribuidos en las plantas, juegan un rol clave en su metabolismo y son productos primarios de la fotosíntesis que están involucrados en las respuestas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Moing, 2000). Considerando que varias GHPs de pared celular son positivamente reguladas bajo condiciones de estrés como oscuridad, falta de azúcares, senescencia o infección (Contento *et al.*, 2004; Fujiki *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004) podríamos esperar una respuesta al suplemento de estos alditoles.

Es bien conocida la incidencia del SOR en la familia de las Rosáceas. Sin embargo el MAN causó respuestas más profundas en las GHPs estudiadas, **particularmente en la β -Glu**, tanto en la FSA como en la FI (Figura V.2 a y b). Metabólicamente hablando, el MAN es considerado prácticamente inerte en cultivos de tejidos, debido a su baja tasa de consumo y de catabolismo. Por ello el aumento de los niveles de actividad de diferentes GHPs **de pared celular (α -Araf y β -Xil de la FI y β -Glu de la FSA y FI)**, en callos cultivados en medios suplementados con MAN, podrían también ser atribuidos a los potenciales de soluto celulares. Dado que otros azúcares como la GLU son rápida y altamente metabolizados en los cultivos de tejidos (lo cual no sucede con el MAN), las diferencias en la actividad de glicosidasas de la pared celular podrían estar relacionadas con la actividad celular y/o con la presión osmótica del medio de cultivo a través de los 30 días de duración del experimento.

La modulación positiva **de la actividad β -Glu** por la adición de MAN a los callos fue drástica: **en callos tratados con MAN, la actividad β -Glu de la**

FSA fue de 4,2 (MS) y 11 (MC) veces más elevada en comparación con aquellos tratados con SAC, mientras que la actividad β -Glu de la FI fueron 3,14 (MS) y 2,5 (MC) veces más elevada respectivamente (Figuras V.2 a y b). La actividad β -Glu podría estar positivamente asociada con ciertas condiciones de estrés como la presencia de Picloram y/o la deficiencia de RCV (tratado en el Capítulo 3). Se encontró en manzana que un gen homólogo a β -Glu se expresa exclusivamente durante el proceso de infección de la frutas por *Penicillium expansum* (Sánchez-Torres *et al.*, 2003). A pesar de que el MAN está usualmente asociado con respuestas de estrés, también se lo vinculó con la regeneración de paredes celulares de protoplastos (Blaschek *et al.*, 1981; Ochatt *et al.*, 1988) sugiriendo que tal vez β -Glu tenga un rol en el metabolismo de la pared celular modulado por MAN. De cualquier manera, la modulación por MAN es específico para cada GHP, ya que los callos tratados con MAN mostraron una disminución de actividad α -Xil (Figura V.3 b) y α -Gal (Figura V.5 b) de la FI en comparación con callos tratados con SAC.

Aunque el crecimiento de los callos fue menor en los medios de cultivos sin reguladores del crecimiento vegetal (MS) (Tabla V.1), las actividades α -Araf, β -Glu, β -Xil y β -Gal de la FI, es decir, vinculadas a la pared celular fueron mayores en este medio de proliferación que en aquellos suplementados con reguladores del crecimiento. Además, los callos que crecieron en medios de cultivo suplementados con MAN crecieron muy poco (Tabla V.1) y en ellos también se detectó una alta actividad α -Araf, β -Glu, β -Xil y β -Gal de la FI. Esto podría abonar la hipótesis de que el crecimiento de los callos está inversamente correlacionado con la actividad de estas enzimas de pared. Sin embargo, no se ha encontrado una

correlación inversa definitiva entre el crecimiento de los callos y la actividad de estas glicosidasas de pared para todos los diferentes azúcares ensayados. Por ejemplo, los callos que crecieron en medios de cultivo suplementados con SOR fueron mas grandes que aquellos que crecieron en medios suplementados con MAN (Tabla V.1) y sin embargo no se encontraron **diferencias significativas en la actividad β -Gal** de la FI entre estos azúcares (Figuras V.6.b). Los callos suplementados con SAC o SOR mostraron crecimientos similares (Tabla V.1) pero los niveles de actividad **α -Araf (Figura V.1.b), β -Xil (Figura V.4.b) y α -Gal (Figura V.5.b)** de la FI fueron significativamente diferentes. El crecimiento observado en callos por el suplemento de SAC y GLU fue similar (Tabla V.1), **pero α -Araf (Figura V.1.b), β -Xil (Figura V.4.b), α -Gal (Figura V.5.b) y β -Gal (Figura V.6.b)** de la FI fueron diferentes. Si la actividad de estas glicosidasas de pared celular tiene más relación con la calidad de la pared celular que con la proliferación de los callos es una hipótesis que merece mayores investigaciones.

No resulta sorprendente encontrar que **β -Xil** de la FI presentó un **comportamiento similar a α -Araf** de esa misma fracción (Figuras V.4 b y V.1 b). Esta similitud en el comportamiento de **β -Xil** y **α -Araf** también se detectó respecto a la concentración de SAC (Capítulo 4 - Figuras IV.4 y IV.1b). En muchas plantas los **genes de α -Araf/ β -Xil** codifican proteínas bifuncionales **que manifiestan actividades α -Araf y β -Xil *in vitro*** (Tateishi et al., 2005; Di Santo *et al.*, 2010) pero que en polisacáridos naturales de pared celular sólo son capaces de catalizar la liberación de arabinosa (Tateishi *et al.*, 2005).

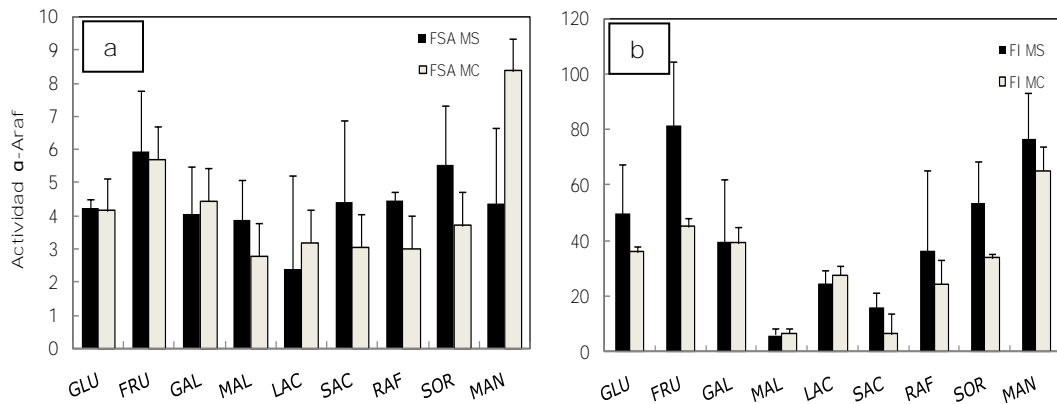


FIG V.1: Actividad específica (unidades enzimáticas) de α -L-arabinofuranosidasa (a): en la fracción soluble en agua (FSA) y (b): en la fracción iónica (FI) provenientes del cultivo *in vitro* de callos de pulpa de manzana, tratados (barras grises) o no (barras negras) con reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con diferentes fuentes carbonadas

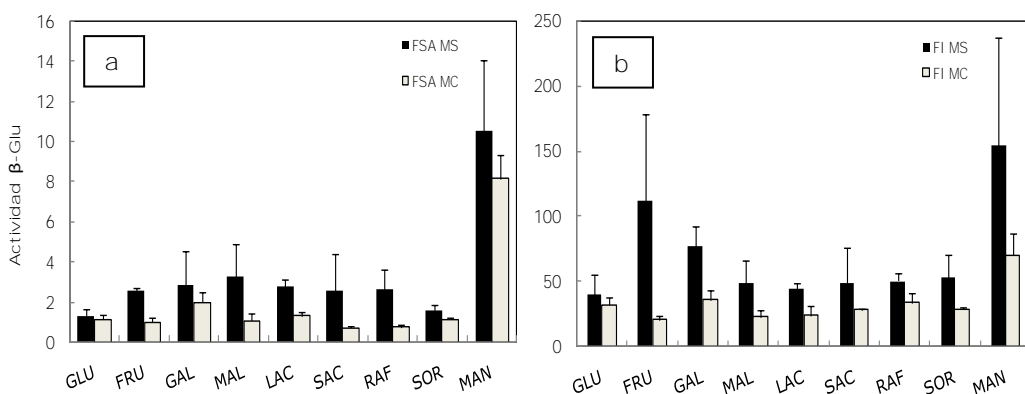


FIG V.2: Actividad específica (unidades enzimáticas) de β -D-glucosidasa (a) en la fracción soluble en agua (FSA) y (b): en la fracción iónica (FI) provenientes del cultivo *in vitro* de callos de pulpa de manzana, tratados (barras grises) o no (barras negras) con reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con diferentes fuentes carbonadas

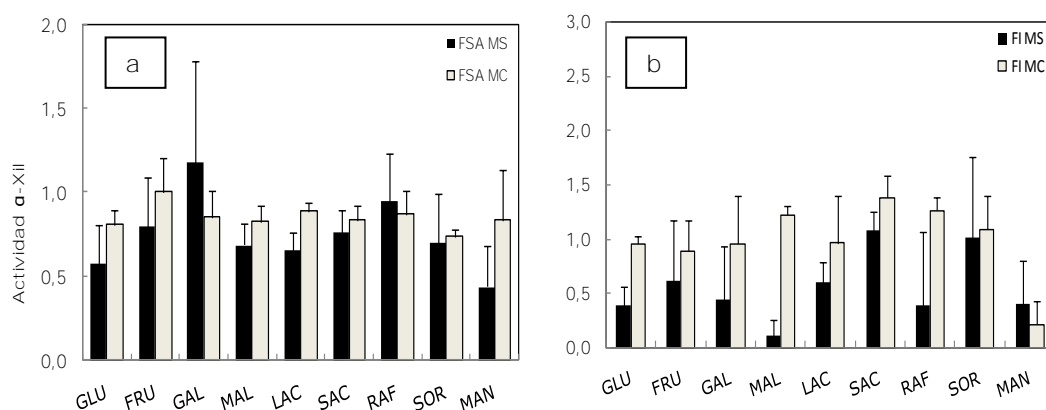


FIG V.3: Actividad específica (unidades enzimáticas) de α -D-xilosidasa (a): en la fracción soluble en agua (FSA) y (b): en la fracción iónica (FI) provenientes del cultivo in vitro de callos de pulpa de manzana, tratados (barras grises) o no (barras negras) con reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con diferentes fuentes carbonadas.

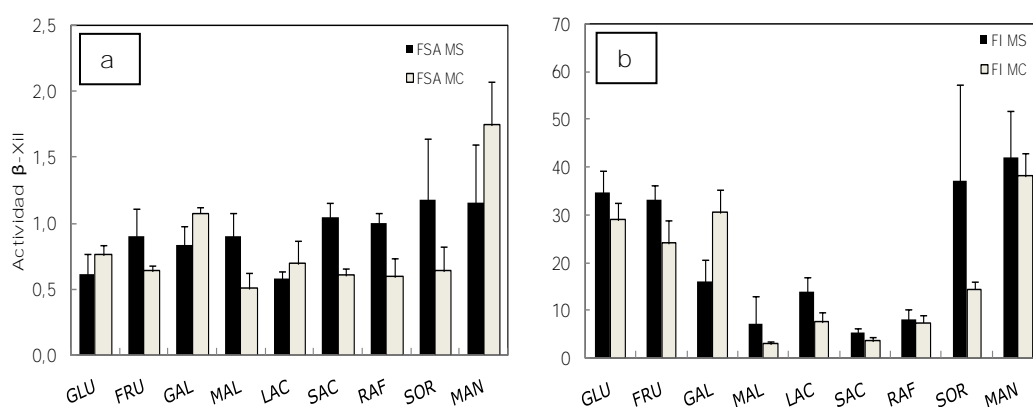


FIG V.4: Actividad específica (unidades enzimáticas) de β -D-xilosidasa (a) en la fracción soluble en agua (FSA) y (b): en la fracción iónica (FI) provenientes del cultivo in vitro de callos de pulpa de manzana, tratados (barras grises) o no (barras negras) con reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con diferentes fuentes carbonadas.

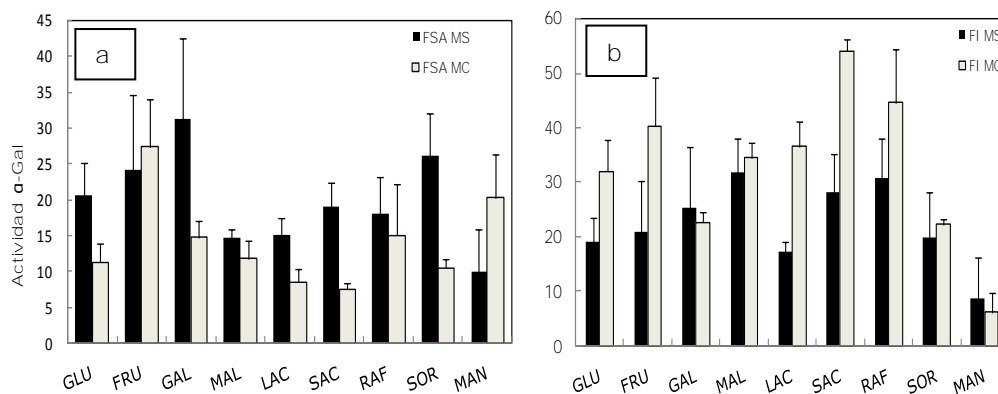


FIG V.5: Actividad específica (unidades enzimáticas) de α -D-galactosidasa (a): en la fracción soluble en agua (FSA) y (b): en la fracción iónica (FI) provenientes del cultivo in vitro de callos de pulpa de manzana, tratados (barras grises) o no (barras negras) con reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con diferentes fuentes carbonadas.

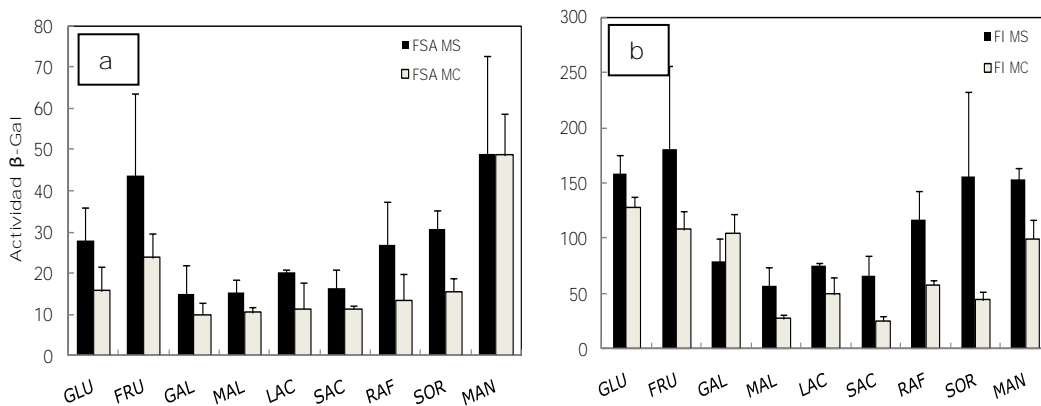


FIG V.6: Actividad específica (unidades enzimáticas) de β -D-galactosidasa (a): en la fracción soluble en agua (FSA) y (b): en la fracción iónica (FI) provenientes del cultivo in vitro de callos de pulpa de manzana, tratados (barras grises) o no (barras negras) con reguladores del crecimiento vegetal y suplementados con diferentes fuentes carbonadas.

TABLA V.1: Efecto de diferentes hidratos de carbono en el crecimiento de los callos.

Los callos de manzana fueron cultivados en medio de cultivo suplementados con 1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0,1 mg L⁻¹ BAP (MC) y sin reguladores del crecimiento vegetal (MS) en combinación con los siguientes azúcares en concentración 0,09 M: sacarosa (SAC); glucosa (GLU); fructosa (FRU); galactosa (GAL); maltosa (MAL); lactosa (LAC); rafinosa (RAF); sorbitol (SOR) y manitol (MAN). Luego de 30 días de cultivados se evaluó el crecimiento de los callos siguiendo la siguiente escala: 1, muy poco crecimiento, (los callos crecieron 2 veces el tamaño inicial); 2, poco crecimiento, (los callos crecieron 3 veces el tamaño inicial); 3, crecimiento moderado, (los callos crecieron 4 veces el tamaño inicial); 4, buen crecimiento, (los callos crecieron 5 veces el tamaño inicial). Cada valor representa la media ± el desvío estándar de 20 repeticiones independientes.

Azúcar	Crecimiento de los callos	
	MS	MC
SAC	3,05 ± 0,60	3,85 ± 0,37
GLU	3,15 ± 0,67	3,90 ± 0,31
FRU	2,15 ± 0,67	3,90 ± 0,31
GAL	2,00 ± 0,65	2,95 ± 0,60
MAL	2,10 ± 0,64	3,85 ± 0,37
LAC	2,05 ± 0,69	2,05 ± 0,6
RAF	3,10 ± 0,55	3,15 ± 0,59
SOR	3,00 ± 0,65	3,85 ± 0,37
MAN	1,25 ± 0,44	1,15 ± 0,37

CAPÍTULO 6

Cambios en la composición de la pared celular de callos de manzana dependientes de su exposición a diferentes reguladores del crecimiento

6.1. Introducción

La pared primaria de las células es una estructura dinámica involucrada en roles esenciales a lo largo de la vida de las plantas, incluyendo crecimiento y desarrollo de la célula vegetal. Sin embargo, no todas las funciones de la pared celular son estructurales, sino que algunas moléculas pueden participar en procesos de reconocimiento celular, reacciones metabólicas de síntesis y degradación, respuestas a factores ambientales o aspectos relacionados a la defensa de las plantas (Carpita & Gibeaut, 1993).

A pesar de que los componentes que forman las paredes celulares, principalmente polisacáridos y proteínas son comunes a diferentes especies, las cantidades, composición y disposición de los mismos difieren entre tipos de células, e incluso pueden diferir dentro de microdominios de la pared de una misma célula (Freshour *et al.*, 1996; Willats *et al.*, 2001).

La pared celular se encuentra expuesta a continuas modificaciones durante el crecimiento y diferenciación celular y puede sufrir alteraciones acorde a necesidades específicas de los diferentes tipos de células. Los cambios que ocurren en los tejidos y en la morfología de órganos durante el desarrollo de la plantas, se atribuyen a modificaciones y reorganizaciones de los componentes de la pared celular y a la síntesis y deposición de nuevos materiales en paredes celulares preexistentes (Meijer & Murria, 2001). También las cantidades y componentes de la pared celular pueden sufrir cambios durante el crecimiento celular (Derbyshire *et al.*, 2007) y en respuesta a distintos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos (Vorwerk *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2007).

Entre las modificaciones que suceden en la pared celular, son ampliamente reconocidas las que ocurren durante la maduración de los frutos. Estudios bioquímicos indican que los cambios estructurales y reordenamientos de la pared celular durante la maduración de frutos ocurre tanto en pectinas como en glicanos de matriz, como resultado, al menos en parte, de la actividad de enzimas y proteínas de pared celular provenientes de algunas familias que promueven el crecimiento y extensión de los tejidos. Numerosas enzimas y proteínas están involucradas en la disposición y regulación metabólicas de los diversos polímeros de la pared celular (Showalter, 1993) y es probable que el desensamblaje de la compleja red que compone esta estructura involucre la acción sinérgica de diferentes enzimas, donde una familia de enzimas que modifican la pared celular pueden mediar la actividad de otra (Goulao, *et al.* 2008).

Por lo tanto, las plantas deben involucrar mecanismos regulatorios que controlen la biosíntesis de los componentes que forman la pared de los diferentes tipos de células, la síntesis de las cantidades exactas de los componentes y el ensamblaje de los mismos en la ubicación correcta, para alcanzar la heterogeneidad observada en los diferentes tipos de células. Entre los factores que están implicados en la regulación de la biosíntesis y modificaciones de la pared celular se citan a los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) (Fry, 1989; Catalá *et al.*, 1997; Hutchison *et al.*, 1999; Yeo *et al.*, 2004). Más aún, se ha determinado que los RCV tienen efectos regulatorios sobre seis glicósido hidrolasas asociadas a la pared celular (Capítulo 3) y que interactúan de forma diferente con distintos azúcares en la modulación de la actividad de esas enzimas (Capítulo 4), por lo que se

podría sospechar la existencia de modificaciones en la pared celular moduladas por RCV y mediadas por estas enzimas.

Si bien la influencia de los RCV sobre la composición y características de la pared celular se ha estudiado en diversos órganos vegetativos en elongación, ha sido muy poco estudiada en callos de tejidos vegetales en general y de frutos en particular.

6.2. Objetivos

El objetivo de este trabajo fue verificar la posibilidad de inducir modificaciones en los polisacáridos que componen la pared celular de células indiferenciadas de callos de manzana por exposición en cultivo *in vitro* al suplemento de RCV.

6.3. Materiales y Métodos

6.3.1. Material vegetal y tratamientos

El material vegetal y la introducción del mismo por cultivo *in vitro* se realizó siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 2.

Previo a la realización de los tratamientos, los callos provenientes del cultivo de inducción compuesto por las sales minerales y vitaminas de Murashige & Skoog (1962) (en adelante denominado MS o "control") suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 1 mg L⁻¹ y 6-bencilaminopurina (BAP) 0,1 mg L⁻¹ más sacarosa 3% (en adelante denominado MC), se subcultivaron 5 veces en MS sin el suplemento de RCV. Los tratamientos consistieron en el cultivo de callos en MS suplementado con picloram (Pic), ácido abscísico (ABA) o ácido giberélico (AG₃), en todos

los casos en una concentración de 5 mg L⁻¹. Esos tratamientos se contrastaron con MS sin el suplemento de RCV (control) y con MC (cultivo de inducción inicial), todos suplementados con sacarosa 3% como fuente carbonada.

Luego de 30 días de cultivo los callos se cosecharon, se congelaron con N₂ líquido y se mantuvieron a -70°C hasta su análisis.

6.3.2. Obtención y fraccionamiento de la pared celular

La obtención y el fraccionamiento de la pared celular se efectuó de acuerdo con protocolos previos, detallados por Sozzi *et al.* (2002 b) y Brummell *et al.* (2004 a) con algunas modificaciones. Se homogeneizaron 20 g de callos en mortero utilizando 4 volúmenes de etanol 80% frío (4 °C), y la mezcla se llevó a ebullición durante 30 min; luego se enfrió y filtró a través de papel Whatman GF/C. El material insoluble retenido se lavó con abundante etanol 95% y se resuspendió en 3 volúmenes (60 mL) de cloroformo:metanol (1:1); posteriormente se agitó durante 15 minutos y se filtró. El material retenido se lavó con 2 volúmenes adicionales (40 mL) de la misma mezcla de solventes, y finalmente se lavó con acetona hasta su decoloración, obteniéndose el extracto crudo de pared celular (residuo insoluble en alcohol, RIA). El RIA se secó bajo campana a temperatura ambiente y luego fue pesado.

Se tomaron 3 g de RIA y se agitaron en 300 mL de solución de timerosal 0,02% [p/v]. Se eliminó al sobrenadante; luego, el pellet se extrajo secuencialmente con CDTA 0,05 M en NaOAc 0,05 M, pH 6, y timerosal 0,02% [p/v] durante 24 h, y con Na₂CO₃ 0,1 M en NaBH₄ 0,1 mM durante 24 h, obteniéndose los extractos enriquecidos en pectinas unidas

por uniones iónicas y covalentes, respectivamente. Posteriormente, se trató el residuo de pared celular despectinado con KOH 4% en NaBH₄ 0,1% (p/v) durante 24 h y luego con KOH 24% en NaBH₄ 0,1% (p/v) durante igual período de tiempo, obteniéndose las fracciones de glicanos de matriz unidos a la celulosa de forma más laxa o más estrecha, respectivamente. Dichas extracciones dieron lugar a las fracciones solubles en KOH 4% y en KOH 24%, respectivamente. En el caso de las fracciones solubles en KOH, se ajustó el pH a 5 con ácido acético glacial. Se dializaron todas las fracciones exhaustivamente durante 2 días contra agua corriente y otros 2 días a 4 °C, contra agua destilada y posteriormente se liofilizaron.

6.3.3. Determinación de azúcares totales

Se empleó el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico utilizando glucosa como estándar (Dubois *et al.*, 1956). A 0,5 mL de solución conteniendo hasta 80 µg mL⁻¹ de hidratos de carbono se le adicionaron 0,5 mL de fenol 5% (p/v) y se mezclaron. Luego se agregaron 2,5 mL de ácido sulfúrico (98%, grado analítico) directamente sobre la superficie de la solución a fin de asegurar un calentamiento máximo y se dejaron reposar 10 min. Transcurrido este tiempo, los tubos se agitaron en un vórtex y se mantuvieron 20 min a temperatura ambiente. En forma paralela se preparó un blanco con agua destilada. Finalmente se determinó la absorbancia a 490 nm (longitud de onda correspondiente a la absorción máxima para glucosa), y se cuantificó el contenido de hidratos de carbono totales. El resultado se expresó como porcentaje de azúcar anhidro (x162/180). La proporción de azúcares neutros fue determinada luego de descontar el contenido de ácidos urónicos del de azúcares totales. Para esto, la reacción

de fenol-ácido sulfúrico se llevó a cabo con ácido galacturónico como estándar, el cual mostró una relación de absorbancia de 0,28 contra la misma masa de glucosa (Ponce *et al.*, 2010).

6.3.4. Determinación de ácidos urónicos

La cuantificación de ácidos urónicos se realizó de acuerdo al método del *m*-hidroxidifenilo (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991) usando ácido galacturónico como estándar, expresándose como unidades anhidro. Se tomaron alícuotas de la solución de la muestra de polisacárido conteniendo hasta 200 nmol de ácido hexurónico y se diluyeron con agua hasta 0,4 mL. Posteriormente se agregaron 40 μ L de solución de ácido sulfámico/sulfamato de potasio 4 M (pH 1,6) a cada tubo y se agitaron en un vórtex. Sobre los tubos colocados en baño de hielo se adicionaron 2,5 mL de solución de tetraborato de sodio 0,0125 M en ácido sulfúrico concentrado, grado analítico. Nuevamente se agitaron los tubos, y se llevaron a un baño de agua a 100 °C durante 30 min. Luego se colocaron en un baño de hielo para alcanzar la temperatura ambiente rápidamente y se les agregaron 80 μ L de solución de *m*-hidroxidifenilo 0,15% en hidróxido de sodio 0,5%. Finalmente se agitaron los tubos, se dejaron reposar 5 a 10 minutos y se leyó la absorbancia a 525 nm. Esta mezcla permanece estable durante 1 hora. Se preparó un blanco con agua destilada y se utilizó ácido galacturónico de concentración 80 μ g mL⁻¹ como patrón. Se realizaron tres repeticiones de cada determinación y los resultados se muestran como media \pm el desvío estándar de esas repeticiones.

6.3.5. Cromatografía de exclusión

A los fines de analizar la distribución del tamaño de los polisacáridos, se examinaron las fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión por geles. Se disolvieron 3 mg de las fracciones solubles en CDTA y en Na₂CO₃ en 0,8 mL con imidazol 0,4 mg mL⁻¹ y el agregado de 0,2 mL de NH₄AcO 1M (pH 5). Las muestras fueron centrifugadas y cromatografiadas a baja presión empleando una columna de Sepharose® CL-2B (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (30 cm x 0,9 cm) eluída a temperatura ambiente con NH₄AcO 0,2 M, pH 5 (Brummell *et al.*, 2004 a). En el caso de las fracciones solubles en KOH 4% y en KOH 24%, éstas fueron disueltas en NaOH 0,1M, cambiándose la fase por Sepharose® CL-6B (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y eluyéndose a temperatura ambiente con NaOH 0,1 M. Las fracciones fueron colectadas y sobre cada alícuota se determinaron los azúcares totales siguiendo el protocolo detallado en 6.3.3.

6.3.6. Determinación de los azúcares neutros

La determinación de los azúcares neutros se realizó analizando por cromatografía gaseosa los derivados correspondientes de los polisacáridos hidrolizados. Los azúcares componentes determinados fueron: ramnosa (Ram), fucosa (Fuc), arabinosa (Ara), xilosa (Xil), manosa (Man), galactosa (Gal) y glucosa (Glu).

6.3.6.1. Hidrólisis reductiva

El agar es un polímero de la agarobiosa, un disacárido compuesto de D-Gal y 3,6-anhidro-L-galactosa. En condiciones de hidrólisis ácida, la unidad de 3,6-anhidrogalactosa se degrada para generar un derivado del

furfural. Para evitar esta degradación se han desarrollado metodologías que combinan reacciones para hidrolizar el residuo 3,6-anhidrogalactosídico y modificarlo rápidamente *in situ*. De esta manera se cuantifica la 3,6-anhidrogalactosa, que se utilizará para evaluar la interferencia que pudiera aparecer por el uso del agar como agente gelificante de los medios de cultivo de los callos. Por medio de cromatografía gas-líquido del agar utilizado en los experimentos se estableció que la relación Gal/3,6-anhidrogalactosa fue 1:0,89.

Se utilizó el método de Stevenson & Furneaux (1991), modificando el segundo período de hidrólisis a 2 h.

A 2 mg de polisacárido contenidos en un vial se les agregaron 0,4 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 3 M y 0,1 mL de una solución conteniendo 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 4-metilmorfolina borano (MMB). Se cerró el vial y se llevó a 80 °C durante 30 min. Luego se dejó enfriar y se agregaron nuevamente 0,1 mL de MMB. La solución resultante se llevó a estufa a 121 °C durante 2 h.

Una vez enfriado el vial se volvieron a añadir 0,2 mL de MMB, para luego evaporar el solvente bajo corriente de aire seco a 50 °C. El producto de hidrólisis se dejó en desecador al vacío durante al menos 2 h.

Los alditos generados se acetilaron con anhídrido acético (0,2 mL) y TFA (0,2 mL) a 55-60 °C. Luego se colocaron en estufa a 60°C por 10 min más. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, las soluciones se extrajeron con 1 mL de la mezcla cloroformo-agua (1:1). Los extractos clorofórmicos recuperados se lavaron tres veces con 1 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio y dos veces con 1 mL de agua destilada. Finalmente los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporaron a sequedad. El residuo obtenido se disolvió en 20 μL de

cloroformo inmediatamente antes de ser inyectado en el cromatógrafo de gases.

6.3.6.2. Cromatografía Gas-Líquido

Se utilizó una columna capilar SP-2330. El flujo del gas portador fue de 1 mL min^{-1} y la presión en cabeza de columna fue de 15 psi (= 1,02 atm). Se realizó una corrida isotérmica a $220 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y las temperaturas del inyector y detector fueron de $240 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las cromatografías gas-líquido se realizaron en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 A equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP 3395. Se utilizó nitrógeno como gas portador y las corridas se efectuaron con una relación de split 80:1. Se utilizó una columna capilar SP-2330 (Supelco), de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y $0,20 \text{ }\mu\text{m}$ de espesor de la fase líquida. Se descontó la Gal que provenía del agar (6.3.6.1).

6.4. Resultados y Discusión

6.4.1. Ácidos urónicos y azúcares neutros

Con el objetivo de analizar el posible efecto de los RCV sobre la composición de los polisacáridos de la pared celular de callos de manzana, éstos fueron expuestos en cultivo *in vitro* a medios de cultivo suplementados con Pic, ABA, y AG_3 , evaluándose además MS como control y MC.

El tratamiento del RIA con CDTA y Na_2CO_3 provee fracciones ricas en pectinas, con altos contenidos en ácidos urónicos (Figura VI.1 a y b). En la

fracción soluble en CDTA, el contenido de ácidos urónicos de las paredes celulares de los callos control se redujo ~57% respecto del nivel observado en los callos MC, mientras que en la fracción soluble en Na_2CO_3 , el nivel de ácidos urónicos del control se incrementó ~48% respecto de los callos MC. En estas fracciones, el contenido de ácidos urónicos en callos tratados con Pic fue 128% y 22% más elevado que el control, respectivamente. En la fracción soluble en CDTA, solamente los callos tratados con Pic alcanzaron niveles de ácidos urónicos similares a los de los callos MC, en tanto que los restantes tratamientos mostraron valores similares a los del control. En la fracción soluble en Na_2CO_3 , el tratamiento con ABA aumentó los niveles de ácidos urónicos en ~45% y el AG_3 disminuyó los niveles en ~18% respecto del control (Figura VI.1 a y b).

El contenido de ácidos urónicos en callos tratados con Pic, ABA y AG_3 en la fracción soluble en KOH 4%, rica en glicanos de matriz, fue 36%, 26% y 22% menor respectivamente, que en el control, que a su vez fue 30% menor que en MC (Figura VI.1 c). En la fracción soluble en KOH 24%, todos los tratamientos presentaron menores contenidos de ácidos urónicos que el control, que además superó a MC (Figura VI.1 d). Los niveles de ácidos urónicos registrados en las paredes celulares de callos son más elevados a los encontrados en paredes celulares de frutos como ciruela japonesa (Ponce *et al.*, 2010), o melón (Rose *et al.*, 1998), independientemente de su estado de madurez. Las fracciones solubles en KOH 4% y 24% correspondientes a callos tratados con Pic mostraron los niveles más bajos de ácidos urónicos de todos los tratamientos (8,23 y 7,06 mg g^{-1} RIA, respectivamente), presentando valores próximos a los observados en frutos. Sin embargo, los diferentes contenidos de ácidos urónicos tanto en

fracciones pécticas como en fracciones de glicanos de matriz ante el suplemento de RCV de nuestros experimentos difieren a los señalados por Yeo *et al.* (2004), quienes no encontraron diferencias en el contenido de ácidos urónicos en paredes celulares de *Phaseolus vulgaris* cultivadas *in vitro* con o sin la presencia de RCV.

Los valores de azúcares neutros (Figura VI.1 e-h) provienen de un cálculo complejo en el que, de la medición de azúcares totales, se restó aquella de ácidos urónicos. Los callos tratados con Pic mostraron el mayor contenido de azúcares neutros en la fracción soluble en CDTA, pero presentaron un contenido similar de azúcares neutros al de MC y al del control en la fracción soluble en Na₂CO₃ (Figura VI.1 e y f). El tratamiento con ABA dio lugar a los niveles más bajos de azúcares neutros en las fracciones pécticas (3,5 mg g⁻¹ en la fracción soluble en CDTA y 4 mg g⁻¹ en la fracción soluble en Na₂CO₃). En cambio, los callos tratados con AG₃ tuvieron niveles relativamente bajos de azúcares neutros en la fracción péctica soluble en CDTA (8 mg g⁻¹) aunque más elevados en la fracción soluble en Na₂CO₃ (14 mg g⁻¹). Tanimoto & Huber (1997) detectaron niveles más bajos de azúcares neutros en la pared celular de 4 zonas de raíces de poroto en activo crecimiento tratadas con AG₃ respecto del control sin ese regulador.

Por otra parte, los niveles de azúcares neutros en la fracción soluble en KOH 4% fueron similares en los callos tratados con Pic, ABA y AG₃, superiores a MC e inferiores al control (Fig. VI.1 g), en tanto que los callos tratados con AG₃ mostraron niveles inferiores de azúcares neutros a todos los demás tratamientos en la fracción soluble en KOH 24% (Fig. VI.1 h). En suspensiones celulares de *Phaseolus vulgaris*, Yeo *et al.* (2004) encontraron

diferencias en el contenido de azúcares totales en pectinas de bajo peso molecular, mientras que no se detectaron diferencias en pectinas de alto peso molecular o en las fracciones de glicanos de matriz con o sin suplemento de 2,4-D y cinetina.

Las pectinas unidas iónicamente a la pared celular (fracción soluble en CDTA) o por uniones covalentes (fracción soluble en Na_2CO_3) resultaron ricas en Ara y Gal y en menor medida en Ram, probablemente integrantes del ramnogalacturonano I (RG I), mientras que otros azúcares neutros como Xil, Fuc, Man y Glu tuvieron una pobre representación en estas fracciones (Figura VI.2). Excepción de ello fueron los niveles alcanzados por Xil y Glu en la fracción soluble en CDTA de los callos control, que superaron los niveles de Ram. Ara y Gal fueron, por mucho, los azúcares neutros de mayor importancia en estas fracciones, y los que registraron mayores variaciones entre tratamientos en la fracción soluble en CDTA (Figura VI.2). En esta fracción rica en pectinas unidas iónicamente a la pared, el contenido relativo de Ara de los callos control disminuyó 54% respecto de los callos MC, mientras que el de Gal aumentó 74%. La Glu y la Xil también aumentaron 6,8 y 2,2 veces en el control respecto de MC. En la fracción soluble en Na_2CO_3 , no se observaron variaciones drásticas entre tratamientos para Ara, Gal y Ram aunque, en extractos provenientes de callos cultivados en el medio de inducción (MC), las concentraciones de Ara fueron mayores y las de Gal menores que en las de callos subcultivados en MS y suplementados o no con RCV (Figura VI.2). Algunos informes previos indican la existencia de altos contenidos de arabinanos y bajos de galactanos en zonas meristemáticas de ápices radicales de zanahoria con elevada densidad celular, y en suspensiones celulares cultivadas en medios

con suplemento de 2,4-D (Willats *et al.*, 1999). En cambio, bajos niveles de (1,4)- β -galactano se localizaron en paredes celulares de células en proliferación, aunque se observó su rápida acumulación en paredes celulares inducidas para elongación, donde el (1,5)- α -arabinano se encontró casi ausente. Esto indica la regulación que podrían desempeñar las cadenas laterales de polisacáridos pécticos en RGI en relación a la proliferación y diferenciación de células de plantas. La relación Ara/Gal se considera indicadora de la importancia relativa de las cadenas laterales de Ara y Gal en las pectinas (ramificaciones de arabinanos, galactanos o arabinogalactanos), mientras que la relación (Ara+Gal)/Ram estima la importancia relativa del total de azúcares neutros componentes de las cadenas laterales de RG I. Resulta de interés señalar que la relación Ara/Gal fue similar en todas las fracciones provenientes de callos cultivados en medio de inducción MC (Figura VI.3 a). En las fracciones pécticas, los callos subcultivados en MS (control), y los tratados con Pic, ABA y AG₃ mostraron menores niveles de Ara, mayores niveles de Gal (Figura VI.2) y relaciones Ara/Gal menores que los callos obtenidos del medio de inducción MC (Figura VI.3). Interesantemente MC fue el único de estos medios de cultivo en donde los callos fueron semi-friables, ya que los demás tratamientos generaron callos de apariencia compacta o semi-compacta (Capítulo 3, Figura III.7). La disminución de la relación Ara/Gal ante el agregado de AG₃ se observó en otros sistemas, tales como las zonas maduras o en elongación de raíces de poroto, en las que el AG₃ modula las paredes celulares conformando poliuronidos con bajo contenido de Ara y alto de Gal, aunque la proporción de Ara y de Gal difiere significativamente entre las diferentes secciones morfogénicas (Tanimoto & Huber, 1997). Asimismo,

Kikuchi *et al.* (1996) encontraron que las cadenas laterales de las pectinas de callos de zanahoria se modificaban durante el cambio de un estado embriogénico a otro no-embriogénico, observando que la relación Ara/Gal correlacionaba con el tamaño de los grupos de células. Por otra parte, se observó una relación Ara/Gal muy baja en callos "nolac" ('non-organogenic callus with loosely attached cells') de tabaco, caracterizados por la poca adhesión entre sus células (Iwai *et al.*, 2001) y la ausencia de cadenas laterales de Ara en RG I. Esto no ocurre en ninguno de los tratamientos de los callos de manzana (Figura VI.5) y sugiere una vez más la importancia de la presencia de arabinanos para la cementación de las células de los callos.

Además de su contenido en Glu, los glicanos de matriz unidos en forma laxa presentaron una riqueza considerable en Ara y, en mucha menor medida, en Gal y Xil (Figura VI.2). Los niveles de Glu, mucho más elevados que los de Xil, implican que en esta fracción podrían predominar los glucanos o xiloglucanos más que los xilanos. Tanto los niveles de Ara como de Glu mostraron cambios importantes entre tratamientos. En la fracción soluble en KOH 4%, el contenido de Ara de los extractos de callos tratados con Pic, ABA y AG₃ superó al del extracto del tratamiento control en aproximadamente en 2, 1,9 y 1,5 veces respectivamente. El control mostró los niveles más elevados de Glu (52,6 mol %) y los más bajos de Ara (19,8 mol %), en tanto que se detectaron los niveles más altos de Ara (41,3 mol %) y más bajos de Glu (31,9 mol %) en los extractos obtenidos de callos tratados con Pic. Cabe mencionar que también los niveles de Ara de los extractos pécticos solubles en CDTA y en Na₂CO₃ provenientes de callos tratados con Pic fueron relativamente elevados (36,5 y 48,7 mol %), sólo superados por los del control (Fig. VI.2). Esto puede vincularse a la casi

nula actividad de la enzima α -L-arabinofuranosidasa asociada a pared celular en callos tratados con Pic, puesta de manifiesto en el capítulo 3 de esta tesis (Figura. III.1. b). Los tratamientos con ABA y AG₃ dieron lugar a niveles más elevados de actividad α -L-arabinofuranosidasa (Figura III.1. b) y niveles menores de Ara, tanto en las fracciones pécticas como en la fracción soluble en KOH 4%.

Respecto de los restantes azúcares neutros, se destacó la participación mayor de Xil en las fracciones solubles en KOH 4% y KOH 24% provenientes de callos cultivados en medio de inducción MC, y una disminución relativa de 40% y 42%, respectivamente, en las provenientes del control. La aplicación de Pic, ABA o AG₃ no restauró los niveles relativos de Xil alcanzados en MC.

En la fracción soluble en KOH 24%, tanto los contenidos relativos de Glu como los de Ara no resultaron muy disímiles entre tratamientos. Para Glu se verificó el menor valor en extractos de callos cultivados en MC (20,4 mol %) y el máximo en el control (27,6 mol %), en tanto que para Ara se registró el mínimo relativo en el tratamiento con Pic (27 % mol) y el máximo en el tratamiento con ABA (33,2 % mol). Las mayores diferencias relativas entre tratamientos se registraron para la Xil, con el valor mínimo registrado para el control (15,5 % mol) y el máximo para MC (26,4 % mol).

La presencia de porcentajes pequeños de Man y Fuc en las fracciones ricas en glicanos de matriz (mayor presencia relativa de Man en la fracción extraída con KOH 4%, y de Fuc en la fracción extraída con KOH 24%) está típicamente asociada a la existencia de mananos, galactomananos, galactoglucomananos y a xiloglucanos fucosilados, componentes habituales de las fracciones hemicelulósicas.

La detección de Ara y de Gal en abundancia en los glicanos de matriz en general, y en la fracción soluble en KOH 4% unida a la celulosa en forma más laxa en particular, sugiere la presencia de RG I con diferentes grados de ramificaciones laterales de Ara o de Ara y Gal, según el tratamiento aplicado a los callos. Asimismo, se observó una mayor disparidad entre tratamientos en la relación Ara/Gal que en la relación (Ara + Gal)/Ram, tanto en la fracción soluble en KOH 4% como en la soluble en KOH 24% (Figura VI.3). Se detectaron valores mayores para el índice (Ara + Gal)/Ram en los extractos de KOH 4%, independientemente del tratamiento, sugiriendo la presencia de RG I más ramificado. En los extractos de Na₂CO₃ y en los de KOH 24% provenientes de los callos tratados con ABA, el índice (Ara + Gal)/Ram mostró valores mayores que en los restantes tratamientos como Pic, sugiriendo que el ABA induciría la presencia de un RG I más ramificado, tanto en la fracción péctica Na₂CO₃ como en la hemicelulósica extraída con KOH 24%.

Resulta interesante remarcar que la variación en los niveles de Ara entre tratamientos fue mucho más marcada en las fracciones solubles en CDTA y KOH 4%, intermedia en la fracción soluble en Na₂CO₃ y muy escasa en la fracción extractable con KOH 24%. Esto podría indicar la existencia de diferentes poblaciones de Ara presentes en locaciones variadas dentro de la pared celular (Ponce *et al.*, 2010). La población de Ara existente en la fracción soluble en KOH 24% podría ser menos susceptible a la degradación enzimática y sus niveles de Ara permanecerían relativamente estables entre tratamientos. Redgwell *et al.* (1997) encontraron arabinogalactanos pécticos de alto peso molecular muy fuertemente asociados a la celulosa en frutos de distintas especies. Ponce *et al.* (2010) detectaron una situación

similar en ciruela japonesa, mientras que Brummell *et al.* (2004 b) hallaron cantidades sustanciales de compuestos pécticos en extractos alcalinos de durazno. La riqueza en arabinogalactanos parece dependiente del sistema y del regulador utilizado. Por ejemplo, la aplicación de ácido indolacético estimuló la disminución del contenido en arabinosa y galactosa en epicótilis de *Vigna angularis* en consonancia con la inducción del crecimiento (Nishitani & Masuda, 1981).

6.4.2. Efecto de los reguladores del crecimiento vegetal sobre la masa molecular de los polisacáridos pécticos

La cromatografía de exclusión por tamaño selecciona los componentes de una muestra de acuerdo con su tamaño molecular, según su capacidad para atravesar el entramado de los geles que constituyen la fase estacionaria. En las fracciones de CDTA se observó en los diferentes tratamientos un pico marcado correspondiente a moléculas de tamaño intermedio (fracciones 15-16), siendo definido y de mayor magnitud en el control y levemente más ancho y de menor magnitud en los callos inducidos en MC y en los tratados con Pic (Figura VI.4 a-c). La curva correspondiente al extracto de CDTA proveniente de callos tratados con ABA mostró un corrimiento del pico hacia fracciones de mayor peso molecular (fracciones 13-14; Figura VI.4. d), en tanto que la curva correspondiente a AG₃ mostró una polidispersión más marcada, con presencia sustancial de polímeros de alto y de bajo tamaño no observable en los otros tratamientos (Figura VI.4 e). Los polímeros pécticos de raíces tratadas con AG₃ también mostraron especies de una masa molecular mayor no observables en raíces no tratadas, tanto en la zona de elongación como en la zona basal de

maduración (Tanimoto & Huber, 1997). Sin embargo, los RIA obtenidos de callos tratados con diferentes RCV no registraron en general una alta presencia de poliuronidos de alto peso molecular en esta fracción, a semejanza de lo encontrado por Ponce *et al.* (2010) para estadios inmaduros de frutos de ciruela japonesa, pero a diferencia de lo hallado en pimiento (Harpster *et al.*, 2002), tomate (Brummell & Labavitch, 1997), durazno (Brummell *et al.*, 2004 b) y palta (Huber & O'Donoghue, 1993), cuyos frutos inmaduros presentan poliuronidos de alto peso molecular en esta fracción.

La extracción con Na_2CO_3 libera por desesterificación las pectinas unidas a la pared mediante enlaces covalentes. Este tratamiento también puede romper uniones éster entre moléculas de pectinas solubilizadas, resultando en pectinas extractables de peso molecular relativamente bajo. En esta fracción las paredes celulares de los callos obtenidos en el medio de inducción (MC) y de los callos control y tratados con AG_3 presentaron un pico de polímeros de tamaño molecular intermedio, aunque en este último caso ligeramente desplazado hacia especies de mayor tamaño molecular (Figura VI.4 f, g, j). En los extractos derivados de callos cultivados con ABA se observó un pico de mucha mayor magnitud, aunque constituido por moléculas de similar tamaño, acompañado de porcentajes menores de moléculas de tamaños elevados y bajos (Figura VI.4 i). Diferente fue el perfil de exclusión de los extractos derivados de callos tratados con Pic que presentó dos picos, uno de moléculas de alto peso molecular y otro integrado por especies de menor peso molecular que las observadas en los restantes tratamientos (Figura VI.4 h).

6.4.3. Efecto de los reguladores del crecimiento vegetal sobre la masa molecular de los glicanos de matriz

En las fracciones ricas en glicanos de matriz solubles en KOH 4%, los perfiles cromatográficos presentaron dos picos en todos los tratamientos, uno muy agudo de alto peso molecular, prácticamente coincidente con el volumen de exclusión (V_0), y otro más ancho y de menor peso molecular (Figura VI.5 a-e). Esta distribución se asemeja a la observada en otros sistemas, como los estadios inmaduros de ciruela japonesa (Ponce *et al.*, 2010). En callos de manzana, la diferencia entre tratamientos se aprecia a través de la magnitud de los picos. El pico correspondiente a pesos moleculares elevados mostró magnitudes decrecientes siguiendo el siguiente orden: ABA > control > Pic > MC > AG₃. El pico correspondiente a los extractos de callos tratados con ABA alcanzó una magnitud 66% mayor que el de los extractos tratados con AG₃. Por otra parte, el pico correspondiente a pesos moleculares más bajos mostró magnitudes decrecientes siguiendo el siguiente orden: control > AG₃ > MC ~ ABA > Pic, siendo la magnitud del pico correspondiente a los callos control 50% mayor que la del pico de callos tratados con Pic.

El primer pico de polímeros de alto peso molecular observado en la fracción KOH 4% en todos los tratamientos coincide con el encontrado para la misma fracción en melón (Rose *et al.*, 1998) y en arveja (Talbot & Ray, 1992 a). En estos sistemas, la composición del pico de alto peso molecular involucra altos contenidos de Ara y Gal y en menor proporción Ram, los cuales podrían atribuirse a la presencia de grandes moléculas de arabinogalactanos, posiblemente compuestos por subunidades de arabinanos y galactanos unidas glicosidicamente. También se ha informado

la presencia de patrones similares en el fraccionamiento de las hemicelulosas extraídas de tejidos vegetativos con bajas concentraciones de álcali Nishitani & Masuda, 1983; Lorences & Zarra, 1987; Lorences *et al*, 1987).

Algunos modelos de la pared celular primaria proponen la presencia de macromoléculas unidas covalentemente a polisacáridos no celulósicos: xiloglucanos a arabinogalactanos, arabinogalactanos a pectinas y pectinas a proteínas estructurales. Se ha señalado que muchos de los componentes poliurónidos de la pared celular pueden ser químicamente extractables bajo condiciones relativamente suaves, sin la concomitante liberación de xiloglucanos, arabinogalactanos y otras hemicelulosas. Sin embargo no debería excluirse la posibilidad de uniones covalentes entre un pequeño subconjunto de pectinas, arabinogalactanos y poblaciones de xiloglucanos. La coelución inusual de una masa de alto peso molecular de xiloglucanos con polímeros ricos en Gal y Ara y pequeñas cantidades de Ram por una extracción química con álcali suave, de la que se espera rompa uniones lábiles de glicanos de matriz, podría sugerir uniones covalentes entre polímeros de arabinogalactanos y xiloglucanos. Es probable que el segundo pico de polisacáridos de menor peso molecular corresponda a xiloglucanos.

Al relacionar la distribución de los perfiles de exclusión (Figura VI.5) con los análisis de composición de azúcares neutros correspondientes a la fracción soluble en KOH 4% (Figura VI. 2), se detectó que los tratamientos con Pic y ABA mostraron contenidos de Ara (41,3 y 36,9 mol% respectivamente) y de Ram (4,4 y 4 mol %) más elevados que el tratamiento con AG₃ (28,3 mol% de Ara y 3,8 mol% de Ram), y que por el contrario este último tratamiento dio lugar a un mayor contenido de Glu que

los tratamientos con Pic y ABA (43; 31,9 y 34,4 mol%). Estos resultados sugieren un mayor contenido de arabinanos en los tratamientos de Pic y ABA, que eluirían con el pico de polisacáridos de mayor peso molecular (Figura VI.4 c y d) y, por otra parte, un mayor contenido de xiloglucanos en el tratamiento con AG₃, que eluirían en el pico correspondiente a polisacáridos de menor peso molecular (Figura VI.5 e).

En los glicanos de matriz fuertemente unidos a la celulosa y solubles en KOH 24%, los perfiles cromatográficos no cambiaron sustancialmente entre tratamientos (Figura VI.5 f-j), mostrando en todos los casos un pico amplio de polímeros de tamaño molecular medio, con un pequeño hombro que eluyó aproximadamente en la fracción 6, éste último más marcado en el tratamiento con ABA. Sin embargo, las magnitudes de los picos fueron mucho mayores para los extractos obtenidos de callos tratados con ABA y Pic que con AG₃, resultando intermedias para el control y MC.

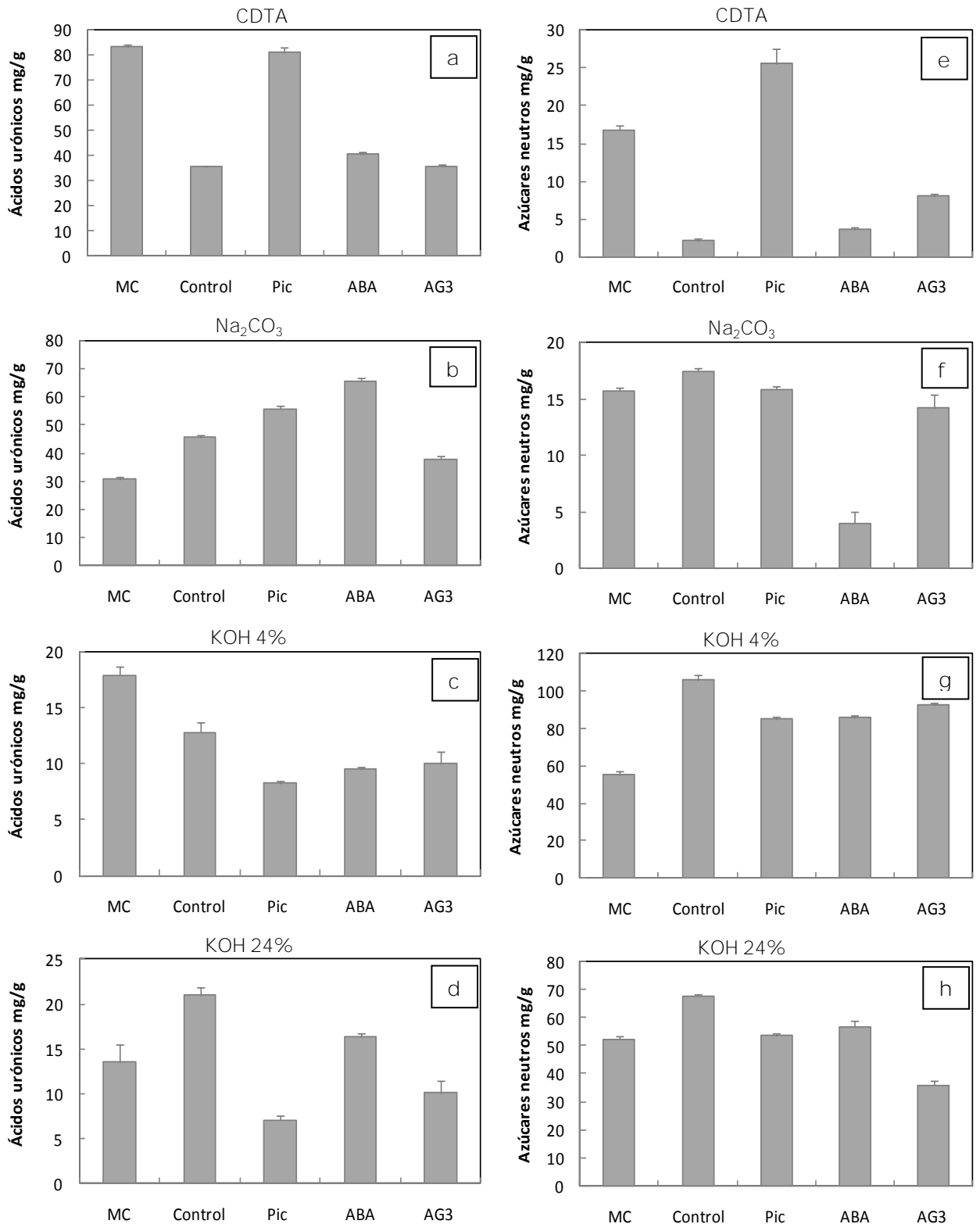


FIG VI.1: Contenido de ácidos urónicos ($\text{mg g}^{-1}\text{RIA}$) (a-d) y contenido de azúcares neutros ($\text{mg g}^{-1}\text{RIA}$) (e-h) en diferentes fracciones de la pared celular de callos provenientes del cultivo *in vitro* de pulpa de manzana tratadas con diferentes reguladores del crecimiento vegetal.

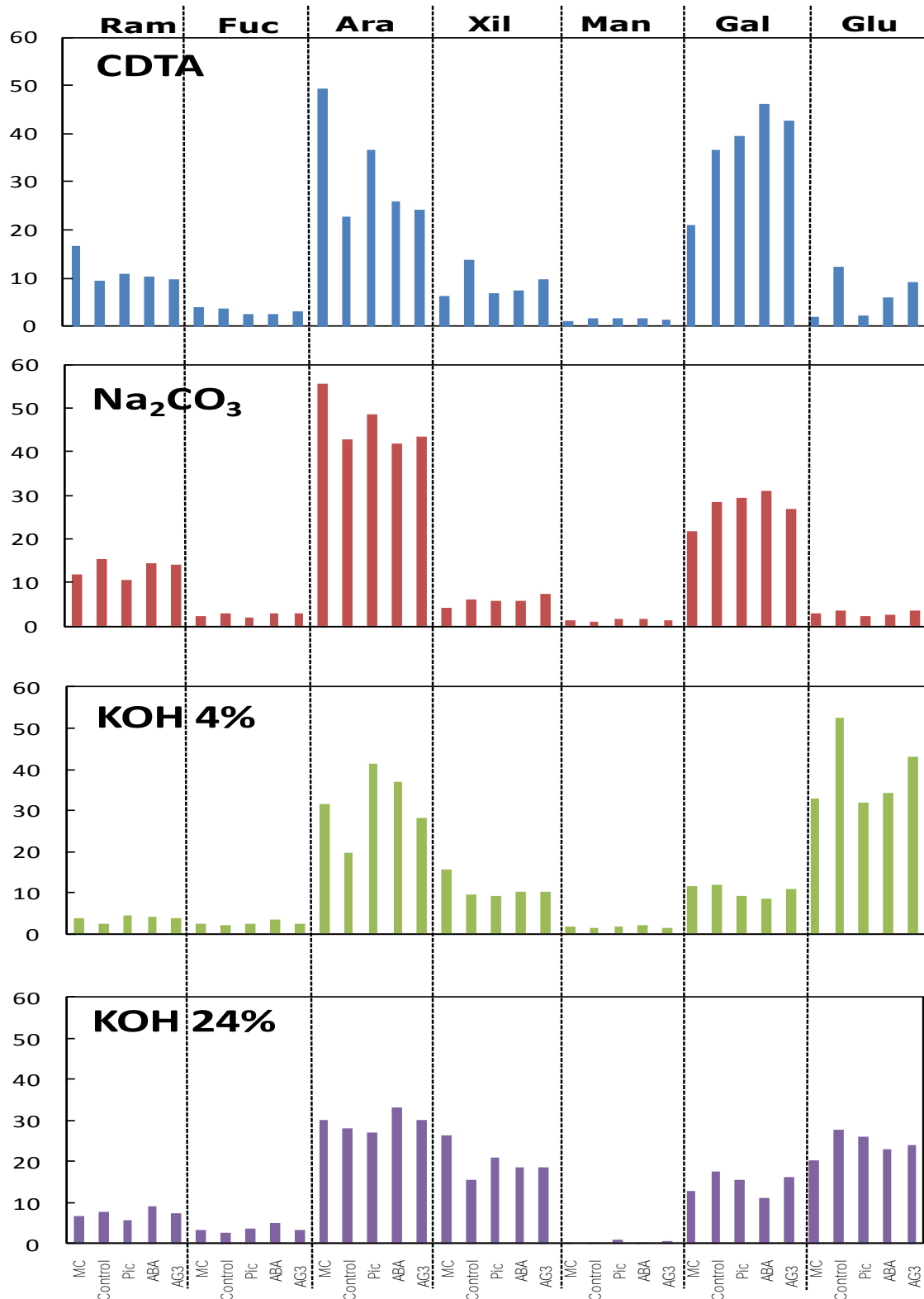


FIG VI. 2: Composición de azúcares neutros ($\text{mol} \times 100 \text{ mol}^{-1}$) de fracciones de pared celular de pectinas y glicanos de matriz de callos provenientes del cultivo *in vitro* de pulpa de manzana tratadas con diferentes reguladores del crecimiento vegetal.

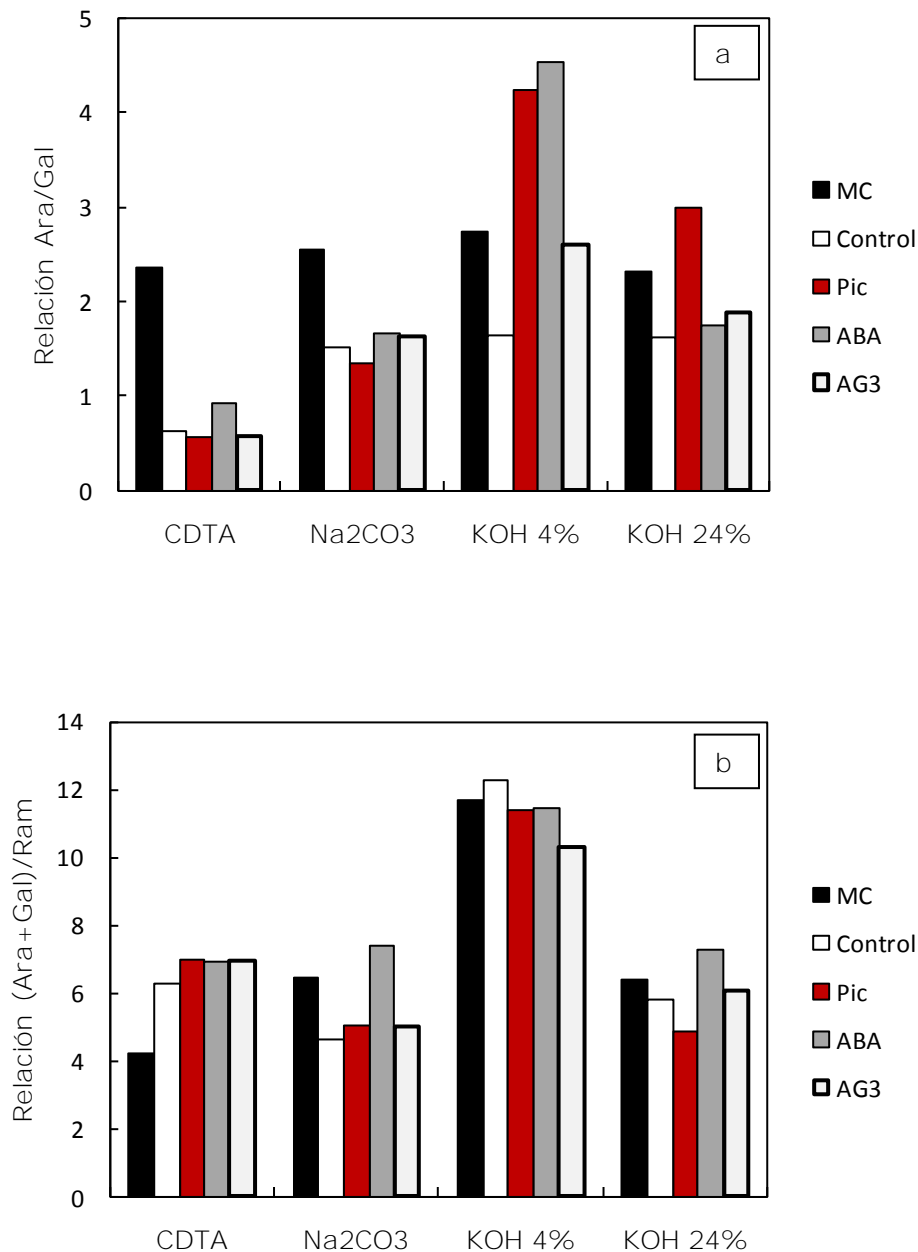


FIG VI.3: Relaciones (a): Ara/Gal y (b): (Ara+Gal)/Ram de pectinas y glicanos de matriz de las paredes celulares de callos provenientes del cultivo *in vitro* de pulpa de manzana. Las barras contiguas representan los diferentes tratamientos, de izquierda a derecha: control, MC, Pic, ABA y AG₃

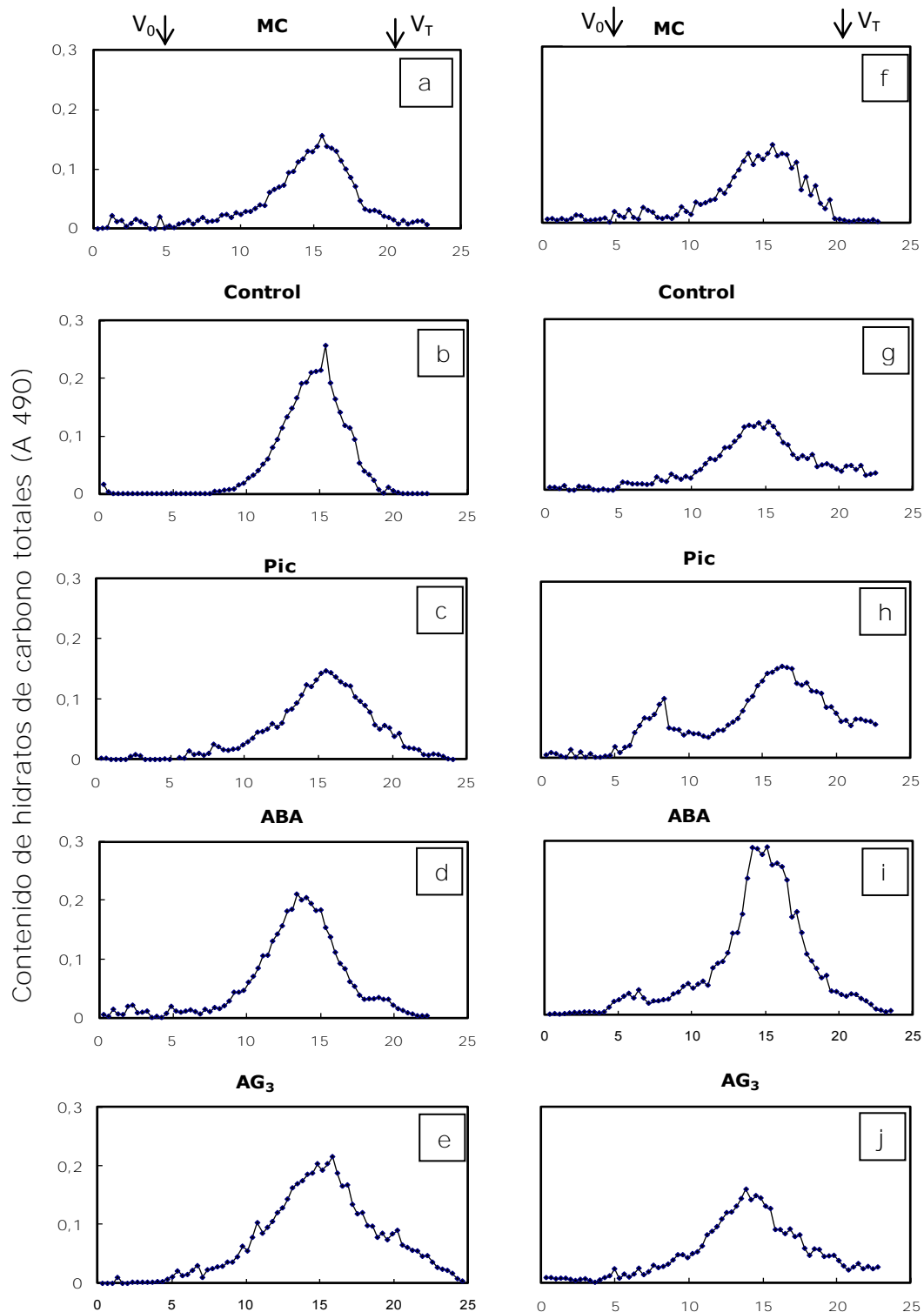


FIG VI.4: Perfiles de cromatografía de exclusión de callos provenientes del cultivo *in vitro* de pulpa de manzana tratadas con diferentes reguladores del crecimiento vegetal. Fracción soluble en CDTA (a-e) y fracción soluble en Na_2CO_3 (f-j) correspondientes al control (a, f), MC (b, g), Pic (c, h), ABA (d, i) y AG_3 (e, j).

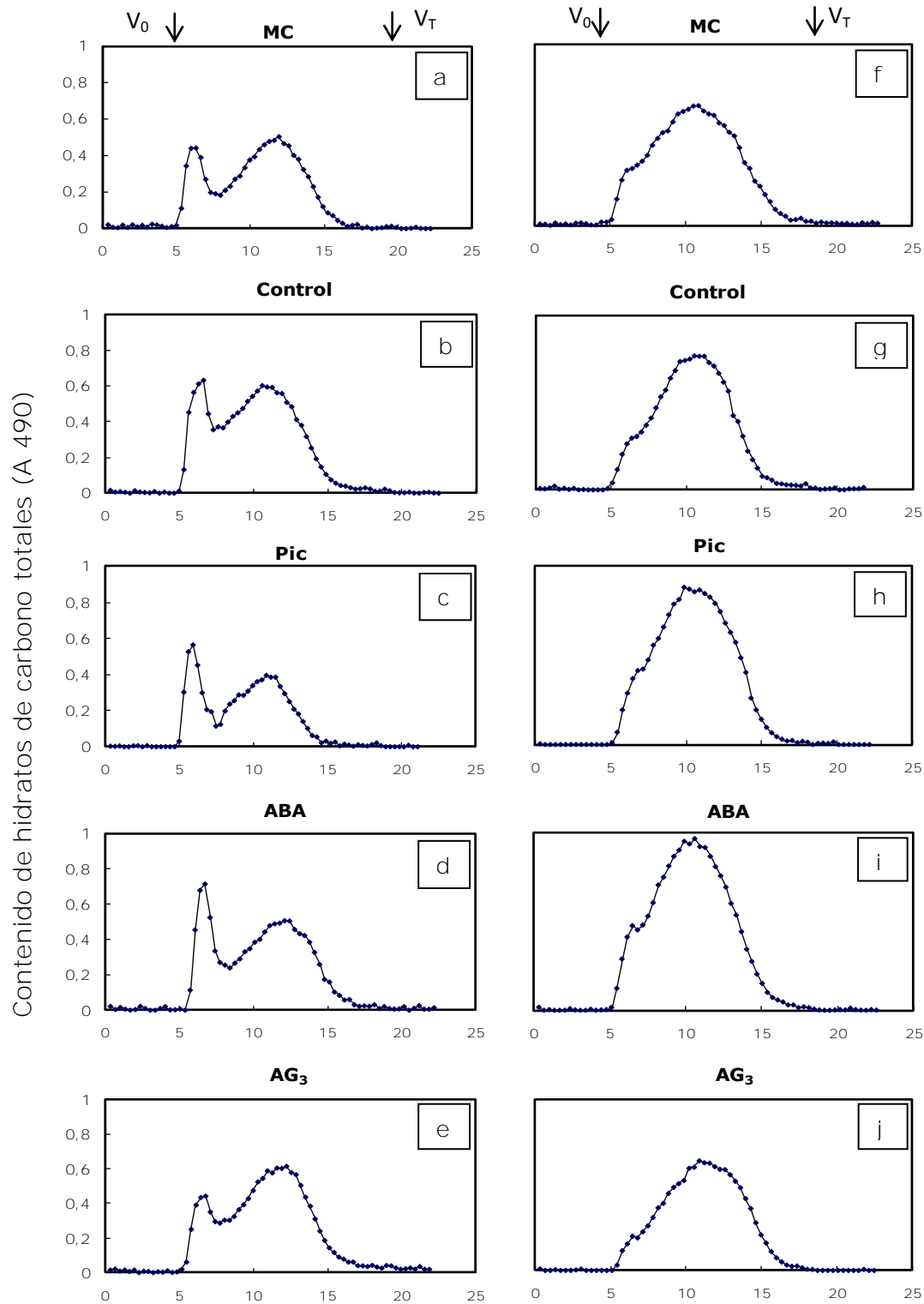


FIG VI.5: Perfiles de cromatografía de exclusión de callos provenientes del cultivo *in vitro* de pulpa de manzana tratadas con diferentes reguladores del crecimiento vegetal. Fracción soluble en KOH 4% (a-e) y fracción soluble en KOH 24% (f-j), correspondientes al control (a, f), MC (b, g), Pic (c, h), ABA (d, i) y AG_3 (e, j).

CAPÍTULO 7

Conclusiones

Conclusiones

Las paredes celulares proveen a las plantas de resistencia y protección, y además representan la fuente más abundante de biomasa renovable. A pesar de la importancia que tienen, poco se conoce acerca de las posibles modulaciones que de las mismas pueden hacerse.

Esta Tesis permitió establecer un sistema de estudio (callos cultivados a partir de tejido de pulpa de manzana) bajo condiciones controladas, que posibilitan la obtención de material de análisis con relativa facilidad y rapidez, proponiendo un protocolo asequible para la obtención y proliferación de material constituido por células indiferenciadas.

Con excepción de ciertos trabajos inherentes a la maduración de frutos, dehiscencia de órganos, y expansión de la pared celular, los mecanismos que modulan la actividad de glicosido hidrolasas han sido muy poco estudiados. El suplemento de los medios de cultivo con doce reguladores del crecimiento vegetal (RCV) diferentes permitió demostrar, por primera vez en un sistema de cultivo de tejidos de frutos, la diversidad de efectos moduladores que tienen las hormonas vegetales sobre seis glicosidasas asociadas a la pared celular: α -L-arabinofuranosidasa, β -D-glucosidasa, α - y β -D-xilosidasa, y α - y β -D-galactosidasa.

La compleja modulación de la actividad de estas hidrolasas de pared en tejidos de plantas no se vincularía únicamente con los RCV. Los resultados de esta Tesis demuestran que la sacarosa (SAC) suplementada al medio de cultivo también puede modular la actividad de esas glicosidasas, siendo esta modulación dependiente de la concentración. Además, los resultados sugieren la existencia de interacciones regulatorias entre los RCV

y la SAC, como parte de una intrincada red de señales y percepción. El aumento de actividad enzimática de β -glucosidasa en sustratos deficitarios en SAC refuerza la hipótesis de que esta hidrolasa asociada a la pared celular podría estar modulada por la deficiencia de hidratos de carbono. Se sugiere que las paredes celulares no solo proveen de soporte físico a las células de las plantas sino que también operarían como reservorio de hidratos de carbono ante situaciones de estrés.

Se demostró que el suplemento de los medios de cultivo con distintas fuentes carbonadas induce diferentes efectos moduladores sobre las glicosidasas en estudio y, aunque no se detectaron patrones generales de actividad aplicables a todas las enzimas, se observaron diferencias cuando los cultivos de tejidos fueron suplementados con azúcares y RCV simultáneamente respecto a cultivos en ausencia de RCV, reforzando la hipótesis de la existencia de interacciones regulatorias entre los RCV y diferentes hidratos de carbono. La combinación de RCV y azúcares a aplicar debería tenerse en consideración a fin de optimizar la actividad de cada glicosidasa en futuras investigaciones enzimológicas. La diferencia entre el comportamiento de las enzimas en la fracción iónica y en la fracción soluble en agua sugiere la presencia de isoformas citosólicas y de pared celular; esto es particularmente notable **respecto a la α -L-arabinofuranosidasa, α -D-xilosidasa, β -D-xilosidasa, α -D-galactosidasa y β -D-galactosidasa**, aunque también se verifica en la β -D-glucosidasa.

Finalmente, esta Tesis probó que diferentes RCV son capaces de generar diferencias significativas en la composición de la pared celular, tanto en la proporción relativa de los restos glicosilos constitutivos de las paredes primarias, como además en el tipo de estructura y distribución

molecular de los polisacáridos que componen dicha pared. Es probable que esto se produzca, al menos en parte, por mediación de diferentes enzimas/proteínas, entre las que se encuentran algunas de las glicosidasas estudiadas. La profundización de este conocimiento hará posibles aplicaciones prácticas de importancia significativa, incluyendo el uso de la biotecnología para la obtención de biomasa cuya constitución esté diseñada a medida para usos específicos.

Referencias bibliográficas

- BACHMANN, M.; KELLER, F. (1995) Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. (Inter- and intracellular compartmentation). *Plant Physiology* 109: 991–998
- BARBA ÁLVAREZ, A. (1991) Cultivo de callos En: Cultivo de tejidos vegetales (Hurtado, D.V.; Merino, M.E., Eds.). Editorial Trillas, Méjico DF. Pp. 93-100
- BARON-EPEL, O.; GHARYAL, P.K.; SCHINDLER, M. 1988 Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* 175: 389–395
- BEECH, I.; GESSLER, C. (1986) Interaction between *Venturia inaequalis* and apple callus tissue cultures: an electron microscopic study. *Journal of Phytopathology* 116: 315–322
- BENNETT, A.B.; LABAVITCH, J.M. (2008) Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. *Plant Science* 175: 130–136
- BERGER, R.G.; DRAWERT, F.; KINZKOFER, A.; KUNZ, C.; RADOLA, B.J. (1985) Proteins and peroxidase in callus and suspension cultures of apple. *Plant Physiology* 77: 211–214
- BILES, C.L.; BRUTON, B.D.; RUSSO, V.; WALL, M.M. (1997) Characterisation of β -galactosidase isozymes of ripening peppers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75: 237-243.
- BLASCHEK, W.; HAASS, D.; KOEHLER, H.; FRANZ, G. (1981) Cell wall regeneration by *Nicotiana tabacum* protoplasts: chemical and biochemical aspects. *Plant Science Letters* 22: 47–57
- BODHI PADMA, K.; LEUNG, D.W.M. (2003) *In vitro* fruiting and seed set of *Capsicum annum* L. cv Sweet Banana. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 39: 536–539
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Review. *Plant Science* 161: 839–851
- BROOKS, R.M.; OLMO H. P. (1972) Register of new fruit and nut varieties Berkeley: University of California 7-12

- BRUMMELL, D.A. y LABAVITCH, J.M. (1997) Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and its fruit homogenates. *Plant Physiology* 115: 717–725
- BRUMMELL, D.A.; HARPSTER, M.H.; CIVELLO, P.M.; PALYS, J.M.; BENNETT, A.B.; DUNSMUIR, P. (1999) Modification of expansin protein abundance in tomato fruits alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *The Plant Cell* 11: 2203–2216
- BRUMMELL, D.A.; HARPSTER, M.H. (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47: 311–340
- BRUMMELL D.A., DAL CIN V., CRISOSTO C.H., LABAVITCH J.M. (2004 a). Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany* 55: 2029–2039
- BRUMMELL D. A., DAL CIN, V., LURIE, S., CRISOSTO, C. H. Y LABAVITCH, J.M. (2004 b) Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. *Journal of Experimental Botany* 55: 2041–2052
- BRUMMELL, D.A. (2006) Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* 33: 103–119
- BUTCHER, D.N. (1973) Plant tumor cells. En: *Plant tissue and cell culture*. Vol 11 (Street, H.E., Ed.). Blackwell Scientific Publishers, London, UK. Pp. 426–461
- CAMERON, R.G.; MANTHEY, J.A.; BAKER, R.A.; GROHMANN, K. (2001) Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Citrus sinensis* var. Valencia fruit tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4457–4462
- CARMI, N.; ZHANG, G.; PETREIKOV, M.; GAO, Z.; EYAL, Y.; GRANOT, D.; SCHAFFER, A.A. (2003) Cloning and functional expression of alkaline α -galactosidase from melon fruit: similarity to plant SIP proteins uncovers a novel family of plant glycosyl hydrolases. *The Plant Journal* 33: 97–106
- CARPITA, N.C.; GIBEAUT., D.M. (1993) Structural models of primary cell

- walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3: 1–30
- CARPITA, N.C.; McCANN, M. (2000) The cell wall. En: *Biochemistry and molecular biology of plants* (Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L., Eds.). American Society of Plant Physiologists. Maryland. USA. Pp. 52–108
- CATALA, C.; ROSE, J.K.C.; BENNETT, A.B. (1997) Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4-beta-D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *The Plant Journal* 12: 417–426
- CHENG, H.; CRINER, G.K.; KEZIS, A.S. (1996) The impact of consumer characteristics on preferences for selected apple varieties. *Journal of Food Production & Marketing* 3: 1–11
- CHENG, T.Y. (1978) Clonal propagation of woody plant species through tissue culture techniques. *Proceedings of the International Plant Propagators' Society* 28: 139–155.
- CHIA, T.F.A.; SEGEREM, M.I.; HEW, C.S. (1999) *In vitro* flowering of orchids. *Lindleyana* 14 (2): 60–76
- CHROST, B.; DANIEL, A.; KRUPINSKA, K. (2004) Regulation of α -galactosidase gene expression in primary foliage leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) during dark-induced senescence. *Planta* 218: 886–889
- CLIFF, M.A.; SANFORD, K.; JOHNSTON, E. (1999) Evaluation of hedonic scores and R-indices for visual, flavour and texture preferences of apple cultivars by British Columbian and Nova Scotian consumers. *Canadian Journal of Plant Science* 79: 395–399
- COHEN, J.D. (1996) *In vitro* tomato fruit cultures demonstrate a role for indole-3-acetic acid in regulating fruit ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121: 520–524
- CONOVER, W.J.; IMAN, R.L. (1981) Rank transformation as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *American Statistician* 35: 124–128

- CONTENTO, A.L.; KIM, S.J.; BASSHAM, D.C. (2004) Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to Suc starvation. *Plant Physiology* 135: 2330–2347
- COSGROVE, D.J. (1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 391-417.
- COSGROVE, D.J. (2003) Expansion of the plant cell wall. En: *The Plant Cell Wall* (Rose, J.K.C, Ed). Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido. Pp. 237-263
- DAVIES, G.J.; GLOSTER, T.M.; HENRISSAT, B. (2005) Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Current Opinion in Structural Biology* 15: 637–645
- DE KLERK, G.J.; KRIEKEN, W.; JONG, J.C. (1999) The formation of adventitious roots new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 35: 189–199
- DERBYSHIRE, P.; FINDLAY, K.; MCCANN, M.C.; ROBERTS, K. (2007) Cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls involves dynamic changes in cell wall thickness. *Journal of Experimental Botany* 58: 2079–89
- DI SANTO, M.C.; PAGANO, E.A.; SOZZI, G.O. (2009) Differential expression of α -L-arabinofuranosidase and α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase genes during peach growth and ripening. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 562–569
- DICK, A.J.; OPOKU-GYAMFUA, A.; DEMARCO, A.C. (1990) Glycosidases of apple fruit: A multi-functional β -galactosidase. *Physiologia Plantarum* 80: 250–256
- DICKENS, C.W.S. (1990) The *in vitro* flowering of *Kalanchoe blossfeldiana* Poellniz. II. The effects of growth regulator and gallic acid. *Plant Cell Physiology* 31: 757–762
- DOBLIN, M.S.; VERGARA, C.E.; READ, S.; NEWBIGIN, E.; BACIC, A. (2003) Plant cell wall biosynthesis: making the bricks. En: *The Plant Cell Wall* (Rose, J.K.C., Ed.) Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido. Pp. 183-222

- DOUGALL, D.K. (1980) Nutrition and metabolism. En: Plant tissue culture as a source of biochemicals. (Staba, E.J., Ed.) CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. Pp. 21-58
- DRURY, R.; HÖRTENSTEINER, S.; DONNISON, I.; BIRD, C.R.; SEYMOUR, G.B. (1999) Chlorophyll catabolism and gene expression in the peel of ripening banana fruits. *Physiologia Plantarum* 107: 32–38
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350–356
- EKLUND AXELSON, L.; AXELSON, J. (2000) Hypercompetition on horticultural markets. *Acta Horticulturae* 536: 485–492
- FANUTTI, C.; GIDLEY, M.J.; REID, J.S.G. (1991) A xyloglucan-oligosaccharide-specific α -D-xylosidase or exo-oligoxyloglucan- α -xylohydrolase from germinated nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seeds. Purification, properties and its interaction with a xyloglucan-specific endo-(1-4)- β -D-glucanase and other hydrolases during storage-xyloglucan mobilisation. *Planta* 184: 137-147.
- FARROKHI, N.; BURTON, R.A.; BROWNFIELD, L.; HRMOVA, M.; WILSON, S.M.; BACIC, A.; FINCHER, G.B. (2006) Plant cell biosynthesis: genetic, biochemical and functional genomics approaches to the identification of key genes. *Plant Biotechnology Journal* 4: 145–167
- FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C.; CARPITA, N.C. (1991) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197: 157–162
- FRANKLIN, G.; PIUS, P.K.; IGNACIMUTHU, S. (2000) Factors affecting *in vitro* flowering and fruiting of green pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica* 115: 65–73
- FRESHOUR, G.; CLAY, R.P.; FULLER, M.S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G.; HAHN, M.G. (1996) Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiology* 110: 1413–1429
- FRY, S.C. (1989) Cellulases, hemicelluloses and auxin stimulated growth: A possible relationship. *Physiologia Plantarum* 75: 532–536

- FUJIKI, Y.; YOSHIKAWA, Y.; SATO, T.; INADA, N.; ITO, M.; NISHIDA, I.; WATANABE, A. (2001) Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiologia Plantarum* 111: 345–352
- GAUTHERET, R.J. (1942) Hetero-auxines et cultures de tissues vegetaux. *Bulletin de la Societé Chimique* 24: 13-46
- GERARDI, C.; BLANDO, F.; SANTINO, A.; ZACHEO, G. (2001) Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Science* 160: 795–805
- GIOVANNONI, J.J. (2001) Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 725–749
- GOULAO, L.F.; SANTOS, J.; DE SOUZA, I.; OLIVEIRA, C.M. (2007) Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biology and Technology* 43: 307–318
- GOULAO, L.F.; COSGROVE, D.J.; OLIVEIRA, C.M. (2008) Cloning, characterisation and expression analyses of cDNA clones encoding cell wall-modifying enzymes isolated from ripe apples. *Postharvest Biology and Technology* 48: 37–51
- GOULAO, L.F.; OLIVEIRA, C.M. (2008) Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology* 19: 4–25
- GROSS, K.C.; SAMS, C.E. (1984) Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: A species survey. *Phytochemistry* 23: 2457–2461
- GUSSMAN, C.D.; GOFFREDA, J.C.; GIANFAGNA, T.J. (1993) Ethylene production and fruit softening rates in several apple fruit ripening variants. *HortScience* 28: 135–137
- HARPSTER, M.H.; BRUMMELL, D.A.; DUNSMUIR, P. (2002) Suppression of ripening-related endo-1-4- β -glucanase in transgenic pepper fruit does not prevent depolymerization of cell wall polysaccharides during ripening. *Plant Molecular Biology* 50: 345–355
- HARUTA, M.; MURATA, M.; KADOKURA, H.; HOMMA, S. (1999)

- Immunological and molecular comparison of polyphenol oxidase in Rosaceae fruit trees. *Phytochemistry* 50: 1021–1025
- HAWES, M.C.; SHARPE, D.Z.; PLATA, M.I.; PUEPPKE, S.G.; CHOUREY, P.S. (1985) Auxin-independent growth of maize tissue culture cells. *Plant Science* 40:197-202
- HENDERSON, J.H.M. (1954) The changing nutritional pattern from normal to habituated sunflower callus tissue *in vitro*. *Annee Biologique* 30: 329-348
- HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; DAVIES, G.J. (2001) A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 47:55–72
- HEREDIA, A.; GUILLÉN, R.; JIMÉNEZ, A.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. (1993) Activity of glycosidases during development and ripening of olive fruit. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung-A* 196: 147-151
- HIWASA, K.; KINUGASA, Y.; AMANO, S.; HASHIMOTO, A.; NAKANO, R.; INABA, A.; KUBO, Y. (2003) Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *Journal of Experimental Botany* 54: 771–779
- HOW, R.B. (1993) Marketing system for fresh produce in the United States. En: *Postharvest Handling: A Systems Approach* (Shewfelt, R.L.; Prussia, S.E., Eds.). Academic Press, San Diego, California, USA. Pp. 1–26
- HUBER, D.J. y O'DONOGHUE, E.M. (1993) Polyuronides in avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening. *Plant Physiology* 102: 473–480
- HUTCHISON, K.W.; SINGER, P.B.; DIAZ-SALA C.; GREENWOOD M.S. (1999) Expansins are conserved in conifers and expressed in response to exogenous auxin *Plant Physiology* 120: 827–832
- ISHIDA, B.K.; BALDWIN, E.A.; BUTTERY, R.G.; CHUI, S.H.; LING, L.C. (1993) Flavor volatiles, sugars and color development *in vitro*-cultured tomato fruit and calyx. *Physiologia Plantarum* 89: 861–867
- ITAI, A.; YOSHIDA, K.; TANABE, K.; TAMURA, F. (1999) A β -D-xylosidase-

- like gene is expressed during ripening in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Journal of Experimental Botany* 50: 877–878
- ITAI, A.; ISHIHARA, K.; BEWLEY, J.D. (2003) Characterization of expression, and cloning, of β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase in developing and ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Journal of Experimental Botany* 54: 2615–2622
- IWAI, H.; ISHII, T.; SATOH, S. (2001) Absence of arabinan in the side chains of the pectic polysaccharides strongly associated with cell walls of *Nicotiana plumbaginifolia* non-organogenic callus with loosely attached constituent cells. *Planta* 213: 907–915
- JAMET, E.; CANUT, H.; BOUDART, G.; PONT-LEZICA, R.F. (2006) Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in Plant Science* 11: 33–39
- JANICK, J.; CUMMINS, J.N.; BROWN, S.K.; HEMMAT, M. (1996) Apples. En: *Fruit Breed, Volume I: Tree and Tropical Fruits* (Janick, J.; Moore, J.N., Eds.) John Wiley & Sons, Inc. Pp. 1-77
- JIMÉNEZ-BERMÚDEZ, S.; REDONDO-NEVADO, J.; MUÑOZ-BLANCO, J.; CABALLERO, J.L.; LÓPEZ-ARANDA, J.M.; VALPUESTA, V.; PLLEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M.A.; MERCADO, J.A. (2002) Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiology* 128: 751–759
- KELLER, F.; PHARR, D.M. (1996) Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: galactosyl-sucrose oligosaccharides. En: *Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships* (Zamski, E.; Schaffer, A.A., Eds). Marcel Dekker, New York, USA. Pp. 115–184
- KIKUCHI, A.; EDASHIGE, Y.; ISHII, T.; FUJII, T.; SATOH, S. (1996) Variations in the structure of neutral sugar chains in the pectic polysaccharides of morphologically different carrot calli and correlations with the size of cell clusters. *Planta* 198: 634–639
- KIM, W.D.; KOBAYASHI, O.; KANEKO, S.; SAKAKIBARA, Y.; PARK, G.G.; KUSAKABE, I.; TANAKA, H.; KOBAYASHI, H. (2002) α -Galactosidase from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) cells. *Phytochemistry* 61: 621–630

- KNEE, M. (1993) Pome fruits, En: Biochemistry of Fruit Ripening (Seymour, G.B.; Taylor, J.E.; Tucker, G.A., Eds.). Chapman & Hall, London, Reino Unido. Pp. 325–343
- KOCH, K.E. (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 509–40
- KOCH, K.E. (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 235–246
- KONNO, H.; YAMASAKI, Y.; KATOH, K. (1996) A β -glucosidase associated with cell walls from cell suspension cultures of carrot. *Phytochemistry* 43: 1157–1161
- KRAMMER, G.; WINTERHALTER, P.; SCHWAB, M.; SCHREIER, P. (1991) Glycosidically bound aroma compounds in the fruits of *Prunus* species: apricot (*P. armeniaca*, L.), peach (*P. persica*, L.), yellow plum (*P. domestica*, L. ssp. *Syriaca*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 778–781
- KREBS-SMITH, S.; COOK, D.A.; SUBAR, A.F.; CLEVELAND, L.; FRIDAY, J.; KAHLE, L.L. (1996) Fruit and vegetable intake of children and adolescents in the United States. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 150: 81–86
- KUPFERMAN, E. (1997) Controlled atmosphere storage of apples. En: CA '97: **Seventh International Controlled Atmosphere Research Conference**. Proc. Vol. 2: Apples and Pears (Mitcham, E.J., Ed.). Department of Pomology, University of California, Davis, California, USA. Pp. 1–30
- LEE, E.J.; KOIZUMI, N.; SANO, H. (2004) Identification of genes that are up-regulated in concert during sugar depletion in *Arabidopsis*. *Plant Cell & Environment* 27: 337–345
- LEE, E. J.; MATSUMURA, Y.; SOGA, K.; HOSON, T.; KOISUMI, N. (2007) Glycosyl Hydrolases of Cell Wall are Induced by Sugar Starvation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 48: 405–413
- LETHAM, D.S. (1958) Cultivation of apple-fruit tissue *in vitro*. *Nature* 182: 473–474

- LIU, J.H.; NADA, K.; HONDA, C.; KITASHIBA, H.; WEN, X.P.; PANG, X.M.; MORIGUCHI, T. (2006) Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response. *Journal of Experimental Botany* 57: 2589–2599
- LORENCES, E.P.; SUAREZ, L.; ZARRA, I. (1987) Hypocotyl growth of *Pinus pinaster* seedlings: changes in the molecular weight distribution of hemicellulosic polysaccharides. *Physiologia Plantarum* 69: 466–471
- LORENCES, E.P.; ZARRA, I. (1987) Auxin-induced growth in hypocotyls segments of *Pinus pinaster* Aiton: changes in molecular weight distribution of hemicellulosic polysaccharides. *Journal of Experimental Botany* 38: 960–967
- LORENCES, E.P.; FRY, S.C. (1993) Xyloglucan oligosaccharides with at least two α -D-xylose residues act as acceptor substrates for xyloglucan endotransglycosylase and promote the depolymerisation of xyloglucan. *Physiologia Plantarum* 88: 105–112
- MARTÍNEZ, G.A.; CHAVES, A.R.; CIVELLO, P.M. (2004) β -Xylosidase activity and expression of a β -xylosidase gene during strawberry fruit ripening. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 89–96
- MARTÍNEZ, J.P.; SILVA, H.; LEDENT, J.F.; PINTO, M. (2007) Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy* 26: 30–38
- MEIJER, M.; MURRAY, J.A.H. (2001) Cell cycle controls and the development of plant form. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 44–49
- MEINS, F. Jr; BINNS, A. (1977) Epigenetic variation of cultured somatic cells. Evidence for gradual changes in requirements for factors promoting cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 74: 2928-2932
- MEINS, F. Jr. (1989) Habituation: heritable variation in the requirement of cultured plant cells for hormones. *Annual Review of Genetics* 23: 395-408.
- MINIC, Z.; JOUANIN, L. (2006) Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiology and Biochemistry* 44:

- 435–449
- MINIC, Z.; JAMET, E.; NÉGRONI, L.; DER GARABEDIAN, P.A.; ZIVY, M.; JOUANIN, L. (2007) A sub-proteome of *Arabidopsis thaliana* stems trapped on Concanavalin A is enriched in cell wall glycoside hydrolases. *Journal of Experimental Botany* 58: 2503–2512
- MINIC, Z. (2008) Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta* 227: 723–740
- MOCTEZUMA, E.; SMITH, D.L.; GROSS, K.C. (2003) Antisense suppression of a β -galactosidase gene (TBG6) in tomato increases fruit cracking. *Journal of Experimental Botany* 54: 2025–2033
- MOHAPATRA, P.K.; PATRO, L.; RAVAL, M.K.; RAMASWAMY, N.K.; BISWAL, U.C.; BISWAL, B. (2010) Senescence-induced loss in photosynthesis enhances cell wall β -glucosidase activity. *Physiologia Plantarum* 138: 346–355.
- MOING, A. (2000) Sugar alcohols as carbohydrate reserves in some higher plants. En: *Carbohydrate reserves in plants – Synthesis and regulation* (Gupta, A.K.; Kaur, N., Eds.). Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands. Pp. 337–357
- MOLASSIOTIS, A.N.; SOTIROPOULUS, T.; TANOU, G.; KOFIDIS, G.; DIAMANTIDIS, G.; THERIOS, I. (2006) Antioxidants and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. *Biologia Plantarum* 50: 61–68
- MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P.; FLASCHLAND, E. (2004) Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal* (Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L.A. Eds.). Ediciones INTA. Buenos Aires. Pp. 35–42
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497
- NEGM, F.B.; LOESCHER, W.H. (1979) Detection and Characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue. *Plant Physiology* 64: 69–73

- NICOLAS, J.J.; RICHARD-FORGET, F.C.; GOUPY, P.M.; AMIOT, M.J.; AUBERT, S.Y. (1994) Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science Nutrition* 34: 109–157
- NISHITANI, K.; MASUDA, Y. (1981) 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*. *Physiologia Plantarum* 52: 482–494
- NISHITANI, K.; MASUDA, Y. (1983) Auxin-induced changes in the cell wall xyloglucans: effects of auxin on the two different subfractions of xyloglucans in the epicotyl cell wall of *Vigna angularis*. *Plant Cell Physiology* 24: 345–355
- NITSCH, J.P., ASAHIRA T., ROSSINI M.E., NITSCH C. (1970) Bases physiologiques de la production de chair de pomme et de poire *in vitro*. *Bulletin de la Société Botanique de France* 117: 479–492.
- O'DONOGHUE, E.M.; SOMERWELD, S.D.; WATSON L.M.; BRUMMELL, D.A.; HUNTE, D.A. (2009) Galactose metabolism in cell walls of opening and senescing petunia petals. *Planta* 229: 709–721
- O'NEILL, R.A.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. (1989) Purification and characterization of a xyloglucan oligosaccharide-specific xylosidase from pea seedlings. *Journal of Biological Chemistry* 264 (34): 20430–20437
- O'NEILL, R.A.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. (1990) The pectic polysaccharides of primary cell walls. En: *Methods in Plant Biochemistry* 2 (Dey, P.M., Ed.). Academic Press, London, UK. Pp. 415–441
- OCHATT, S.J.; POWER, J.B. (1988) An alternative approach to plant regeneration from protoplasts of sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Plant Science* 56: 75–79
- PECH, J.C.; LATCHE, A.; AUSTRUY, M.; FALLOT, J. (1975) Croissance *in vitro* de tissus et de suspensions cellulaires de pomme. *Bulletin de la Société Botanique de France* 112: 183–194
- PEÑA, M.J.; CARPITA, N.C. (2004) Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apple. *Plant Physiology* 135:

1305–1313

- PERCY, A.E.; MELTON, L.D.; JAMESON, P.E. (1997) Xyloglucan and hemicelluloses in the cell wall during apple fruit development and ripening. *Plant Science* 125: 31–39
- PONCE, N.M.A.; ZIEGLER, V.H.; STORTZ, C.A.; SOZZI, G.O. (2010) Compositional changes in cell wall polysaccharides from Japanese plum (*Prunus salicina*) during growth and on-tree ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 2562–2570
- POULTON, J.E. (1990) Cyanogenesis in plants. *Plant Physiology* 94: 401–405
- PRABHA, T.N.; RAINA, P.L.; PATWARDHAN, M.V. (1988) Lipid profile of cultured cells of apple (*Malus sylvestris*) and apple tissue. *Journal of Biosciences* 13: 33–38
- PRABHA, T.N.; SALIMATH P.V.; PATWARDHAN, M.V. (2006) Primary metabolites and organic acid metabolism in apple (*Malus sylvestris*) fruit callus culture. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 51: 381–389
- PRICE, L.J.; HERBERT, D.; COLE, D.J.; HARWOOD, J.L. (2003) Use of plant cell cultures to study graminicide effects on lipid metabolism. *Phytochemistry* 63: 533–541
- PUTNAM, J.J.; ALLSHOUSE, J.E. (1991) Food consumption, Prices and Expenditures, 1968-89. USDA/ERS Statistical Bulletin 825. U.S. Govt. Printing Office, Washington, D.C., USA
- RASTOGI, R.; SAWHNEY, V.K. (1989) *In vitro* development of angiosperm floral buds and organs. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 16: 145–174
- REDGWELL, R.J.; FISCHER, M.; KENDAL, E.; MACRAE, E.A. (1997) Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* 203: 174–181
- REID, M.S. (2002) Maturation and maturity indices, En: *Postharvest Technology of Horticultural Crops* (Kader, A.A., Ed.). University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 3311. Pp. 55-62

- RICHARDS, T.J. (1999) Dynamic model of fresh fruit promotion: a household production approach. *American Journal of Agricultural Economics* 81: 195–211
- RICHARDS, T.J.; PATTERSON, P.M. (2000) New varieties and the returns to commodity promotion: the case of Fuji apples. *Agricultural Research & Economic Reviews* 29: 10–23
- ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (1993) Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En: *Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (Roca, W.M.; Mroginski, L.A., Eds.) Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. Pp. 1-17
- ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 675–709
- RONEN, R.; ZAUBERMAN, G.; AKERMAN, M.; WEKSLER, A.; ROT, I.; FUCHS, Y. (1991) Xylanase and xylosidase activities in avocado fruit. *Plant Physiology* 95: 961–964
- ROSE, J.K.C.; HADFIELD, K.A.; LABAVITCH, J.M.; BENNETT, A.B. (1998) Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiology* 117: 345–361
- ROSE, J.K.C.; BENNETT, A.B. (1999) Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science* 4: 176–183
- ROSE, J.K.C.; CATALÁ, C.; GONZALEZ-CARRANZA, Z.H.; ROBERTS, J.A. (2003) Cell wall disassembly, En: *The Plant Cell Wall*, Annual Plant Reviews, Volume 8 (Rose, J.K.C., Ed.). Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. Pp. 264–324
- ROSS, G.S.; WEGRZYN, T.; MACRAE, E.A.; REDGWELL, R.J. (1994) Apple β -galactosidase. Activity against cell wall polysaccharides and characterization of a related cDNA clone. *Plant Physiology* 106: 521–528
- RUPERTI, B.; CATTIVELLI, L.; PAGNI, S.; RAMINA, A. (2002) Ethylene-responsive genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*Prunus persica*). *Journal of*

- Experimental Botany 53: 429–437
- SAMPEDRO, J.; SIEIRO, C.; REVILLA, G.; GONZÁLEZ-VILLA, T.; ZARRA, I.; (2001) Cloning and expression pattern of a gene encoding an α -xylosidase against xyloglucan oligosaccharides from *Arabidopsis*. Plant Physiology 126: 910-920.
- SAMSON, J.A. (1991) Frutas tropicales de menor importancia. En: Fruticultura tropical. (Samson, J.A., Ed.) Editorial Limusa, Mexico D.F. Pp.321-382
- SÁNCHEZ-TORRES, P.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L. (2003) Isolation and characterization of genes differentially expressed during the interaction between apple fruit and *Penicillium expansum*. Molecular Plant Pathology 4: 447–457
- SCHWAB, W.; SCHREIER, P. (1988) Simultaneous enzyme catalysis extraction: a versatile technique for the study of flavor precursors. Journal of Agricultural and Food Chemistry 36: 1238–1242
- SCHWAB, W.; SCHREIER, P. (1990) Glycosidic conjugates of aliphatic alcohols from apple fruit (*Malus silvestris* Mill. cult. Jonathan). Journal of Agricultural and Food Chemistry 38: 757–763
- SCORZA, R. (1982) *In vitro* flowering, Horticultural Reviews 4: 106–127
- SHOWALTER, A.M. (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. The Plant Cell 5: 9–23
- SKIRVIN, R.M.; KOUIDER, M.; JOUNG, H.; KORBAN, S.S. (1986) Apple (*Malus x domestica* Borkh.). En: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 1: Trees I (Bajaj, Y.P.S., Ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp. 183–198
- SMEEKENS, S. (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51: 49–81
- SMITH, D.L.; GROSS, K.C. (2000) A family of at least seven β -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. Plant Physiology 123: 1173–1183
- SMITH, D.L.; ABBOTT, J.A.; GROSS, K.C. (2002) Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening. Plant Physiology 129: 1755–1762

- SMITH, L.G. (2001) Plant cell division: building walls in the right places. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 33–39
- SOZZI, G.O.; CAMPERI, S.A.; CASCONI, O.; FRASCHINA, A.A. (1998) Galactosidases in tomato fruit ontogeny: Decreased galactosidase activities in antisense ACC synthase fruit during ripening and reversal with exogenous ethylene. *Australian Journal of Plant Physiology* 25: 237–244
- SOZZI, G.O., TRINCHERO, G.D.; FRASCHINA, A.A. (2000) Ethylene and glycosidase promotion in breaker GA₃ and IAA-treated tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 359–368
- SOZZI, G.O.; FRASCHINA, A.A.; NAVARRO, A.A.; CASCONI, O.; GREVE, L.C.; LABAVITCH, J.M. (2002a) α -L-Arabinofuranosidase activity during development and ripening of normal and ACC synthase antisense tomato fruit. *HortScience* 37: 564–566
- SOZZI, G.O.; GREVE, L.C.; PRODY, G.A.; LABAVITCH, J.M. (2002b) **Gibberellic acid, synthetic auxins, and ethylene differentially modulate α -L-arabinofuranosidase activities in antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic synthase tomato pericarp discs.** *Plant Physiology* 129: 1330–1340
- SOZZI, G.O. (2004) Strategies for the regulation of postharvest fruit softening by changing cell wall enzyme activity. En: *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops, Volume 4: Postharvest Treatment and Technology* (Dris, R.; Jain, S. M., Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 135–172
- SOZZI, G.O.; CIVELLO, P.M. (2005) Fruit cell wall enzymes as targets for biotechnology. En: *Genetic Resources and Biotechnology, Vol 1* (Thangadurai, D.; Pullaiah, T.; Pinheiro de Carvalho, M.A., Eds.). Regency Publications, New Delhi. Pp. 214–249
- STEVENSON, T.; FURNEAUX, R. (1991) Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydrate Research* 210: 277–298

- TALBOTT, L.D.; RAY, P.M. (1992) Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix polysaccharides. Effect of auxin and turgor. *Plant Physiology* 98: 369–379
- TANIMOTO, E.; HUBER, D.J. (1997) Effect of GA₃ on the molecular mass of polyuronides in the cell walls of Alaska pea roots. *Plant & Cell Physiology* 38: 25-35
- TATEISHI, A.; KANAYAMA, Y.; YAMAKI, S. (1996) α -L-Arabinofuranosidase from cell walls of Japanese pear fruits. *Phytochemistry* 42: 295–299
- TATEISHI, A.; MORI, H.; WATARI, J.; NAGASHIMA, K.; YAMAKI, S.; INOUE, H. (2005) Isolation, characterization, and cloning of α -L-arabinofuranosidase expressed during fruit ripening of Japanese pear. *Plant Physiology* 138: 1653–1664
- THOMPSON, J.E.; FRY, S.C. (2000). Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* 211: 275-286.
- THORPE, T.A. (1982) Carbohydrate utilization and metabolism. En: *Tissue Culture in Forestry* (Bonga, J.M.; Durzan, D.J., Eds.). Martinus Nijhoff, The Hague. Pp. 325–368
- THORPE, T.A. (2007) History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 169–180
- TISSERAT, B.; GALLETTA, P.D. (1995) *In vitro* flowering and fruiting of *Capsicum frutescens* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 30: 130–132
- TONG, C.B.S.; GROSS, K.C. (1988). Glycosyl-linkage composition of tomato fruit cell wall hemicellulosic fractions during ripening. *Physiologia Plantarum* 74: 365-370.
- TRINCHERO, G.D.; SOZZI, G.O.; COVATTA, F.; FRASCHINA, A.A. (2004) Inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene extends postharvest life of 'Bartlett' pears. *Postharvest Biology and Technology* 32: 193–204.
- VENDRELL, M. (1988) Dual effect of 2,4-D on ethylene production and ripening of tomato fruit tissue. *Physiologia Plantarum* 64: 559–563

- VICENTE, A.R.; SALADIÉ, M.; ROSE, J.K.C.; LABAVITCH, J.M. (2007) The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 1435–1448
- VINCKEN, J.P.; YORK, W.S.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. (1997) Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. *Plant Physiology* 114: 9–13
- VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. (2004) The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science* 9: 203-209
- WALLNER, S.J. (1977) Apple fruit explant responses *in vitro* and textural characteristics of the derived tissue cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 102: 743–747
- WANSTREET, A. (1982) *In vitro* inoculation of tissue culture propagated *Malus* shoot tips with *Erwinia amylovora*. MS Thes, Ohio State Univ. Columbus.
- WILLATS, W.G.T.; STEELE-KING, C.G.; MARCUS, S.E.; KNOX, J.P. (1999) Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. *The Plant Journal* 20: 619–628
- WILLATS, W.G.T.; ORFILA, C.; LIMBERG, G.; BUCHHOLTI, H.C.; VAN ALEBEEK, G.W.M.; VORAGEN, A.G.J.; MARCUS, S.E.; CHRISTENSEN, T.M.I.; MIKKELSEN, J.D.; MURRAY, B.S.; KNOX, J.P. (2001) Modulation of the Degree and Pattern of Methyl-esterification of Pectic Homogalacturonan in Plant Cell Walls. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 19404–19413
- YEO, U.D.; PANDEY, D.M.; KIM, K.H. (2004) Long-term effects of growth regulators on growth and turnover of symplastic and apoplastic sugars in the suspension subculture of kidney bean. *Journal of Plant Biology* 47: 21-26.
- YOSHIOKA, H.; AOBA, K.; KASHIMURA, Y. (1992) Molecular weight and degree of methoxylation in cell wall polyuronide during softening in pear and apple fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117: 600–606

YOSHIOKA, H.; KASHIMURA, Y.; KANEKO, K. (1995) β -D-Galactosidase and α -L-arabinofuranosidase activities during the softening of apples. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 63: 871-87

Anexos

Tabla A.1) Análisis estadístico de diferentes tratamientos para la obtención de callos provenientes del cultivo *in vitro* de pulpa de manzanas. Cada valor representa la media \pm el desvío estándar de 3 repeticiones. Los valores que tienen la misma letra, no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

	Inmaduro CON frio	Inmaduro SIN frio	Maduro CON frio	Maduro SIN frio
MA MC1	97,33 \pm 6,93 bc	80,00 \pm 4,00 bc	65,28 \pm 6,36 bc	60,00 \pm 4,00 bc
MA MC2	85,33 \pm 4,62 a	66,67 \pm 4,62 a	68,00 \pm 4,00 c	44,00 \pm 4,00 a
MAa MC1	84,00 \pm 6,93 a	90,67 \pm 2,31 cd	51,39 \pm 4,81 a	76,00 \pm 4,00 d
MAa MC2	87,67 \pm 4,18 ab	73,33 \pm 8,33 ab	52,78 \pm 6,36 ab	55,56 \pm 3,70 b
MC1	100 \pm 0 c	100 \pm 0 c	85,33 \pm 2,31 d	68,00 \pm 4,00 cd
MC2	100 \pm 0 c	98,67 \pm 2,31 d	72,00 \pm 2,31 c	54,67 \pm 2,31 b

Tabla A.2) Análisis estadístico del efecto de diferentes reguladores del crecimiento vegetal sobre la actividad de seis glicosidasas medidas en la fracción soluble en agua (FSA): α -L-arabinofuranosidasa; β -D-glucosidasa; α -D-galactosidasa; β -D-galactosidasa; α -D-xilosidasa; y β -D-xilosidasa. Cada valor representa la media \pm el desvío estándar de 3 repeticiones. Los valores que tienen la misma letra, no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

	FSA					
	α - Araf	β - Glu	α - Gal	β - Ga	α - Xil	β - Xil
MC	1,37 \pm 0,20 d	0,34 \pm 0,04 a	8,56 \pm 0,91 ab	8,53 \pm 0,45 abc	0,21 \pm 0,04 cd	0,24 \pm 0,04 b
MS 1	1,10 \pm 0,07 bcd	0,21 \pm 0,02 a	15,07 \pm 4,78 b	11,66 \pm 2,25 c	0,20 \pm 0,01 cd	0,12 \pm 0,02 ab
MS 10	0,74 \pm 0,11 abcd	0,13 \pm 0,10 a	8,14 \pm 1,47 a	4,02 \pm 0,86 a	0,18 \pm 0,03 bcd	0,10 \pm 0,02 ab
AIA	1,27 \pm 0,11 cd	0,08 \pm 0,02 a	9,78 \pm 2,05 ab	7,98 \pm 1,27 abc	0,22 \pm 0,02 d	0,22 \pm 0,04 b
ANA	0,68 \pm 0,13 abcd	0,08 \pm 0,04 a	6,07 \pm 1,29 a	6,06 \pm 0,56 ab	0,17 \pm 0,01 bcd	0,12 \pm 0,01 ab
IBA	0,92 \pm 0,25 abcd	0,05 \pm 0,01 a	8,68 \pm 2,28 ab	9,30 \pm 3,21 bc	0,16 \pm 0,01 bcd	0,11 \pm 0,01 ab
2,4D	0,52 \pm 0,07 ab	0,10 \pm 0,01 a	5,48 \pm 0,64 a	6,22 \pm 1,34 ab	0,11 \pm 0,03 abcd	0,06 \pm 0,02 ab
PIC	0,33 \pm 0,09 a	3,75 \pm 0,53 b	8,92 \pm 2,43 ab	19,85 \pm 3,04 d	0,00 \pm 0,00 a	0,00 \pm 0,00 a
KIN	0,62 \pm 0,03 abc	0,10 \pm 0,05 a	6,50 \pm 0,90 a	5,54 \pm 1,34 ab	0,19 \pm 0,03 bcd	0,19 \pm 0,06 b
ZEA	0,66 \pm 0,16 abcd	0,09 \pm 0,01 a	7,56 \pm 2,22 a	6,08 \pm 2,04 ab	0,08 \pm 0,03 abc	0,07 \pm 0,03 ab
2iP	0,69 \pm 0,06 abcd	0,14 \pm 0,03 a	5,91 \pm 2,75 a	3,83 \pm 1,49 a	0,20 \pm 0,03 cd	0,20 \pm 0,05 b
BAP	0,76 \pm 0,05 abcd	0,10 \pm 0,03 a	6,57 \pm 0,77 a	5,41 \pm 0,94 ab	0,13 \pm 0,03 bcd	0,17 \pm 0,05 ab
TDZ	0,76 \pm 0,12 abcd	0,07 \pm 0,04 a	6,29 \pm 0,46 a	6,25 \pm 0,64 ab	0,10 \pm 0,01 abcd	0,16 \pm 0,06 ab
ABA	1,15 \pm 0,30 bcd	0,00 \pm 0,00 a	11,96 \pm 3,95 ab	7,23 \pm 2,23 abc	0,06 \pm 0,04 ab	0,12 \pm 0,02 ab
AG3	1,23 \pm 0,14 bcd	0,06 \pm 0,02 a	11,63 \pm 1,13 ab	10,03 \pm 1,57 bc	0,21 \pm 0,04 cd	0,20 \pm 0,06 b

Tabla A.3) Análisis estadístico del efecto de diferentes reguladores del crecimiento vegetal sobre la actividad de seis glicosidasas medidas en la fracción iónica (FI): α -L-arabinofuranosidasa; β -D-glucosidasa; α -D-galactosidasa; β -D-galactosidasa; α -D-xilosidasa; y β -D-xilosidasa.

Cada valor representa la media \pm el desvío estándar de 3 repeticiones. Los valores que tienen la misma letra, no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

	FI					
	α - Araf	β - Glu	α - Gal	β - Gal	α - Xil	β - Xil
MC	2,82 \pm 0,60 ab	7,60 \pm 0,57 a	11,05 \pm 1,19 abcd	11,43 \pm 2,72 def	0,18 \pm 0,02 a	1,57 \pm 0,19 ab
MS 1	5,02 \pm 1,74 ab	4,37 \pm 1,41 a	15,91 \pm 4,08 cde	13,80 \pm 2,99 efg	0,05 \pm 0,04 a	1,53 \pm 0,67 ab
MS 10	2,85 \pm 0,76 ab	18,37 \pm 5,97 a	20,02 \pm 6,86 def	17,02 \pm 0,94 fg	0,14 \pm 0,08 a	1,21 \pm 0,52 ab
AIA	5,50 \pm 1,57 ab	10,33 \pm 3,48 a	20,66 \pm 3,68 ef	9,81 \pm 2,79 bcde	0,13 \pm 0,03 a	1,63 \pm 0,24 ab
ANA	4,29 \pm 2,14 ab	7,21 \pm 1,76 a	13,65 \pm 4,17 bcde	8,76 \pm 1,36 bcde	0,17 \pm 0,02 a	1,39 \pm 0,38 ab
IBA	6,57 \pm 3,36 ab	9,60 \pm 2,89 a	12,98 \pm 1,86 bcde	11,92 \pm 3,42 def	0,16 \pm 0,06 a	1,87 \pm 0,77 ab
2,4D	1,17 \pm 0,33 a	6,63 \pm 3,80 a	14,48 \pm 2,57 bcde	11,54 \pm 3,16 def	0,29 \pm 0,09 a	0,820 \pm ,27 a
PIC	0,16 \pm 0,08 ab	19,31 \pm 0,62 a	2,59 \pm 1,26 a	3,48 \pm 1,12 ab	0,03 \pm 0,03 a	0,77 \pm 0,14 a
KIN	2,26 \pm 0,38 ab	8,13 \pm 2,74 a	5,91 \pm 1,64 ab	2,15 \pm 0,81 a	0,09 \pm 0,06 a	0,85 \pm 0,11 a
ZEA	2,07 \pm 0,74 ab	12,95 \pm 4,03 a	9,85 \pm 2,64 abc	6,40 \pm 1,09 abcd	0,20 \pm 0,05 a	0,96 \pm 0,17 a
2iP	2,63 \pm 0,33 ab	5,28 \pm 1,78 a	5,41 \pm 1,47 ab	4,39 \pm 1,38 abc	0,28 \pm 0,03 a	1,05 \pm 0,17 a
BAP	1,88 \pm 0,97 ab	9,07 \pm 3,77 a	7,71 \pm 2,95 abc	9,30 \pm 1,22 bcde	0,14 \pm 0,06 a	0,88 \pm 0,24 a
TDZ	4,001,66 ab	9,16 \pm 1,26 a	12,43 \pm 1,69 bcde	10,37 \pm 1,29 cde	0,09 \pm 0,05 a	1,41 \pm 0,60 ab
ABA	6,45 \pm 1,26 ab	15,37 \pm 2,47 a	13,55 \pm 2,23 bcde	9,99 \pm 2,38 bcde	0,14 \pm 0,07 a	2,11 \pm 0,17 ab
AG3	8,16 \pm 2,35 b	5,53 \pm 1,63 a	28,61 \pm 2,67 f	19,73 \pm 3,14 g	0,20 \pm 0,07 a	3,50 \pm 1,07 b

Tabla A.4: Análisis estadístico de dos vías del efecto de diferentes concentraciones de sacarosa sobre la actividad de seis glicosidasas: α -L-arabinofuranosidasa; β -D-glucosidasa; α -D-galactosidasa; β -D-galactosidasa; α -D-xilosidasa; and β -D-xilosidasa. Las actividades enzimáticas fueron medidas en la fracción soluble en agua (FSA) y en la fracción iónica (FI). Cada valor representa la media \pm el desvío estándar de 3 repeticiones.

		SAC 0M		SAC 0,045M		SAC 0,09M	
		MS	MC	MS	MC	MS	MC
α - Araf	FSA	2.1 \pm 0.6 Aa	2.2 \pm 0.6 Aa	5.9 \pm 0.3 Ab	3.7 \pm 0.6 Ab	2.5 \pm 0.2 Aa	3.4 \pm 0.0 Aa
	FI	23.8 \pm 4.8 Aa	34.9 \pm 10.5 Aa	128.5 \pm 17 Ab	32.2 \pm 6.6 Ab	7.3 \pm 1.3 Aa	18.2 \pm 2.2 Aa
β - Glu	FSA	6.1 \pm 2 Ab	5.7 \pm 1.3 Ab	0.7 \pm 0.1 Aa	0.7 \pm 0.1 Aa	1.3 \pm 0.1 Aa	0.7 \pm 0.1 Aa
	FI	134.7 \pm 16 Bb	125.8 \pm 19 Ab	57.7 \pm 7.7 Ba	27.3 \pm 10.2 Aa	55.9 \pm 3 Ba	15.5 \pm 4.7 Aa
α - Gal	FSA	3.9 \pm 1.2 Aa	8.9 \pm 2.7 Aa	32 \pm 5.9 Ab	18.3 \pm 5.4 Ab	22.6 \pm 4.8 Ab	15.5 \pm 1 Ab
	FI	21.7 \pm 3.6 Ba	17.7 \pm 2.5 Aa	51.6 \pm 5.1 Bb	45 \pm 4.7 Ab	62.3 \pm 14 Bb	50.8 \pm 6.1 Ab
β - Gal	FSA	8.5 \pm 2 Aa	24.9 \pm 5.1 Aa	36 \pm 2 Aa	18.4 \pm 2.9 Aa	23.1 \pm 3.9 Aa	16.4 \pm 1.1 Aa
	FI	80.3 \pm 20.2 Ba	76.9 \pm 18.8 Aa	391.3 \pm 38 Bb	93 \pm 25 Ab	97.1 \pm 22.3 Ba	46.8 \pm 3.7 Aa
α - Xil	FSA	0.2 \pm 0.1 Aa	0.2 \pm 0.1 Ba	0.4 \pm 0.1 Ab	0.7 \pm 0.1 Bb	0.6 \pm 0.2 Ab	0.8 \pm 0.3 Bb
	FI	1.7 \pm 0.8 Ba	0.1 \pm 0.1 Aa	2.9 \pm 0.9 Bb	1.3 \pm 0.3 Ab	1.8 \pm 0.4 Bab	1.4 \pm 0.3 Aab
β - Xil	FSA	0.6 \pm 0.2 Ba	0.4 \pm 0.1 Aa	1.2 \pm 0.1 Bb	0.5 \pm 0.1 Ab	0.7 \pm 0 Bab	0.7 \pm 0.1 Aab
	FI	16.6 \pm 2.8 Bab	13.6 \pm 2.9 Aab	75.3 \pm 16.1 Bb	10.4 \pm 4.2 Ab	2.2 \pm 0.5 Ba	4.1 \pm 2.1 Aa

Las letras en minúscula representan diferencias significativas debido a la concentración de SAC. Letras mayúsculas indican diferencias debido al suplemento o no de RCV. Las medias en la misma fila que tienen la misma letra (mayúscula o minúscula) no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla A.5) Análisis estadístico del efecto de diferentes hidratos de carbono sobre la actividad de α -L-arabinofuranosidasa y β -D-glucosidasa. Las actividades enzimáticas fueron medidas en la fracción soluble en agua (FSA) y en la fracción iónica (FI). Cada valor representa la media \pm el desvío estándar de 3 repeticiones.

		α - Araf		β - Glu	
		FSA	FI	FSA	FI
SAC	MS	4.4 \pm 2.3 Aab	16.2 \pm 5.2 Ba	2.5 \pm 1.6 Ba	49 \pm 27 Ba
	MC	3 \pm 0.3 Aab	6.2 \pm 1.2 Aa	0.7 \pm 0.1 Aa	28.3 \pm 0.8 Aa
GLU	MS	4.2 \pm 1.4 Aab	49.8 \pm 17.6 Bbc	1.3 \pm 0.4 Ba	40.2 \pm 14.6 Ba
	MC	4.1 \pm 1.4 Aab	35.9 \pm 3.1 Abc	1.1 \pm 0.2 Aa	32.1 \pm 5.4 Aa
FRU	MS	6 \pm 2.8 Aab	81.3 \pm 23.5 Bcd	2.6 \pm 0.2 Ba	111 \pm 67 Bab
	MC	5.7 \pm 1.1 Aab	45 \pm 1.7 Acd	1 \pm 0.2 Aa	20.3 \pm 3.5 Aab
GAL	MS	4.1 \pm 2.5 Aab	39.8 \pm 22.2 Bbc	2.9 \pm 1.7 Ba	77 \pm 15.2 Ba
	MC	4.4 \pm 0.4 Aab	39.1 \pm 3.3 Abc	2 \pm 0.5 Aa	36 \pm 7.5 Aa
MAL	MS	3.9 \pm 1.8 Aab	11.3 \pm 6.1 Ba	3.3 \pm 1.6 Ba	48.9 \pm 16.7 Ba
	MC	2.8 \pm 0.2 Aab	6.5 \pm 2.3 Aa	1 \pm 0.4 Aa	22.6 \pm 5.5 Aa
LAC	MS	2.4 \pm 0.3 Aa	39.8 \pm 12.2 Bab	2.8 \pm 0.4 Ba	44.5 \pm 4.3 Ba
	MC	3.2 \pm 0.8 Aa	27.5 \pm 7.4 Aab	1.3 \pm 0.2 Aa	24 \pm 7.2 Aa
RAF	MS	4.5 \pm 1.2 Aab	36.3 \pm 27.1 Bab	2.6 \pm 1 Ba	50.5 \pm 5.8 Ba
	MC	3 \pm 0.4 Aab	24.4 \pm 5.7 Aab	0.8 \pm 0.1 Aa	33.9 \pm 7.6 Aa
SOR	MS	5.5 \pm 1.8 Aab	53.4 \pm 15.4 Bbc	1.5 \pm 0.3 Ba	53.1 \pm 17 Ba
	MC	3.7 \pm 0.7 Aab	33.9 \pm 8.7 Abc	1.1 \pm 0.1 Aa	28.9 \pm 0.9 Aa
MAN	MS	4.4 \pm 2.1 Ab	76.8 \pm 16.5 Bd	10.5 \pm 3.5 Bb	154 \pm 82 Bb
	MC	8.4 \pm 2.5 Ab	65.1 \pm 8.6 Ad	8.2 \pm 1.2 Ab	70 \pm 17 Ab

Las letras en minúscula representan diferencias significativas entre los diferentes hidratos de carbono. Las letras mayúsculas indican diferencias debidas al suplemento o no de RCV.

Las medias en la misma columna que tienen la misma letra (mayúscula o minúscula) no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla A.6) Análisis estadístico del efecto de diferentes hidratos de carbono sobre la actividad de α -D-galactosidasa y β -D-galactosidasa. Las actividades enzimáticas fueron medidas en la fracción soluble en agua (FSA) y en la fracción iónica (FI). Cada valor representa la media \pm el desvío estándar de 3 repeticiones.

		α - Gal		β - Gal	
		FSA	FI	FSA	FI
SAC	MS	18.9 \pm 3.4 Bab	28.1 \pm 7.1 Ad	16.1 \pm 4.6 Ba	65.8 \pm 18.6 Ba
	MC	7.5 \pm 0.9 Aab	54 \pm 2.1 Bd	11.3 \pm 0.9 Aa	25.4 \pm 4.9 Aa
GLU	MS	20.4 \pm 4.7 Bab	19 \pm 4.5 Abc	28 \pm 6.1 Bab	158 \pm 16.9 Bb
	MC	11.3 \pm 2.5 Aab	32 \pm 5.8 Bbc	15.7 \pm 5.9 Aab	128 \pm 8.8 Ab
FRU	MS	24 \pm 10.6 Bb	20.7 \pm 9.6 Abcd	43.6 \pm 30.1 Bbc	181 \pm 75.6 Bb
	MC	27.3 \pm 6.7 Ab	40.3 \pm 8.9 Bbcd	23.7 \pm 5.9 Abc	108 \pm 16.4 Ab
GAL	MS	31.3 \pm 11.3 Bab	25.2 \pm 11.2 Abc	15 \pm 7 Ba	78.9 \pm 21 Bab
	MC	14.8 \pm 2.2 Aab	22.6 \pm 1.9 Bbc	9.9 \pm 2.9 Aa	105 \pm 17.1 Aab
MAL	MS	14.5 \pm 1.3 Bab	31.7 \pm 6.3 Abcd	15.1 \pm 3.4 Ba	56.6 \pm 17.4 Ba
	MC	11.7 \pm 2.4 Aab	34.4 \pm 2.8 Bbcd	10.5 \pm 1.3 Aa	27 \pm 4 Aa
LAC	MS	15.1 \pm 2.4 Ba	17.2 \pm 1.8 Abcd	19.9 \pm 1 Bab	75 \pm 2.4 Ba
	MC	8.5 \pm 1.9 Aa	36.5 \pm 4.4 Bbcd	11.4 \pm 6.5 Aab	49.7 \pm 15.1 Aa
RAF	MS	18 \pm 5.1 Bab	30.6 \pm 7.4 Acd	26.9 \pm 10.5 Bab	117 \pm 26.2 Bab
	MC	15 \pm 7.2 Aab	44.6 \pm 9.7 Bcd	13.4 \pm 6.2 Aab	57.8 \pm 4.8 Aab
SOR	MS	26 \pm 5.9 Bab	19.9 \pm 8.2 Aab	30.7 \pm 4.4 Bab	156 \pm 76.6 Bab
	MC	10.5 \pm 1.2 Aab	22.3 \pm 1 Bab	15.6 \pm 3.2 Aab	44.2 \pm 7.5 Aab
MAN	MS	9.9 \pm 6 Bab	8.6 \pm 7.7 Aa	49 \pm 23.6 Bc	153 \pm 10.9 Bb
	MC	20.3 \pm 5.9 Aab	6.2 \pm 3.6 Ba	48.7 \pm 10.2 Ac	99.8 \pm 17.6 Ab

Las letras en minúscula representan diferencias significativas entre los diferentes hidratos de carbono. Las letras mayúsculas indican diferencias debidas al suplemento o no de RCV.

Las medias en la misma columna que tienen la misma letra (mayúscula o minúscula) no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla A.7) Análisis estadístico de dos vías del efecto de diferentes hidratos de carbono sobre la actividad de α -D-xilosidasa Y β -D-xilosidasa. Las actividades enzimáticas fueron medidas en la fracción soluble en agua (FSA) y en la fracción iónica (FI). Cada valor representa la media \pm el desvío estándar de 3 repeticiones.

		α - Xil		β - Xil	
		FSA	FI	FSA	FI
SAC	MS	0.4 \pm 0.2 Aa	1.1 \pm 0.2 Ab	1 \pm 0.1 Aa	5.4 \pm 0.8 Ba
	MC	0.8 \pm 0.1 Aa	1.4 \pm 0.2 Bb	0.6 \pm 0.1 Aa	3.6 \pm 0.9 Aa
GLU	MS	0.6 \pm 0.2 Aa	0.4 \pm 0.2 Aab	0.6 \pm 0.2 Aa	34.8 \pm 4.6 Bcd
	MC	0.8 \pm 0.1 Aa	1 \pm 0.1 Bab	0.8 \pm 0.1 Aa	29.1 \pm 3.6 Acd
FRU	MS	0.8 \pm 0.3 Aa	0.6 \pm 0.6 Aab	0.9 \pm 0.2 Aa	33.3 \pm 2.9 Bcd
	MC	1 \pm 0.2 Aa	0.9 \pm 0.3 Bab	0.6 \pm 0 Aa	24.1 \pm 4.8 Acd
GAL	MS	1.2 \pm 0.6 Aa	0.4 \pm 0.4 Aab	0.8 \pm 0.1 Aab	16.1 \pm 4.7 Bbc
	MC	0.8 \pm 0.2 Aa	1 \pm 0.4 Bab	1.1 \pm 0 Aab	30.5 \pm 4.8 Abc
MAL	MS	0.7 \pm 0.1 Aa	0.1 \pm 0.1 Aab	0.9 \pm 0.2 Aa	7.1 \pm 5.8 Ba
	MC	0.8 \pm 0.1 Aa	1.2 \pm 0.1 Bab	0.5 \pm 0.1 Aa	3 \pm 0.4 Aa
LAC	MS	0.7 \pm 0.1 Aa	0.6 \pm 0.2 Aab	0.6 \pm 0.1 Aa	13.9 \pm 3 Bab
	MC	0.9 \pm 0.1 Aa	1 \pm 0.4 Bab	0.7 \pm 0.2 Aa	7.6 \pm 2 Aab
RAF	MS	1 \pm 0.3 Aa	0.4 \pm 0.7 Aab	1 \pm 0.1 Aa	8.1 \pm 2.2 Ba
	MC	0.9 \pm 0.1 Aa	1.3 \pm 0.1 Bab	0.6 \pm 0.1 Aa	7.4 \pm 1.7 Aa
SOR	MS	0.7 \pm 0.3 Aa	1 \pm 0.7 Ab	1.2 \pm 0.5 Aa	37.2 \pm 20.2 Bc
	MC	0.7 \pm 0 Aa	1.1 \pm 0.3 Bb	0.6 \pm 0.2 Aa	14.4 \pm 1.6 Ac
MAN	MS	0.4 \pm 0.2 Aa	0.4 \pm 0.4 Aa	1.2 \pm 0.4 Ab	42.1 \pm 9.7 Bd
	MC	0.8 \pm 0.3 Aa	0.2 \pm 0.1 Ba	1.7 \pm 0.3 Ab	38.1 \pm 4.8 Ad

Las letras en minúscula representan diferencias significativas entre los diferentes hidratos de carbono. Las letras mayúsculas indican diferencias debidas al suplemento o no de RCV.

Las medias en la misma columna que tienen la misma letra (mayúscula o minúscula) no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).