



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

*Estudio de expresión de factores de transcripción de
tipo MADS-BOX de Fragaria chiloensis*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNO: Jorge Ramos Sandoval
PROFESOR GUÍA: Dra. María Alejandra Moya León
Dra. Daniela Urbina Alvear

Talca-Chile

2018

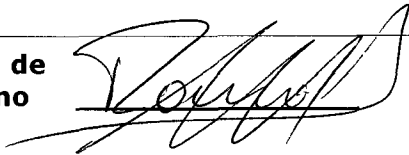
**AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN
DE MEMORIAS DE PREGRADO Y TESIS DE POSTGRADO**

Yo, **Jorge Eduardo Ramos Sandoval** cédula de Identidad N° **17.931.090-2**
autor de la memoria o tesis que se señala a continuación, **SI** autorizo a la Universidad de Talca para publicar
en forma total o parcial, tanto en formato papel y/o electrónico, copias de mi trabajo.

Esta autorización se otorga en el marco de la Ley N° 20.435 que modifica la Ley N° 17.336 sobre Propiedad
Intelectual, con carácter gratuito y no exclusivo para la Universidad.

Título de la memoria o tesis:	Estudio de expresión de factores de transcripción de tipo MADS-BOX de <i>Fragaria chiloensis</i> .
Unidad Académica:	Instituto de Ciencias Biológicas Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología
Carrera o Programa:	Tecnología Médica
Título y/o grado al que se opta:	Licenciado en Tecnología Médica Menciones: Laboratorio Clínico, Hematología y Banco de Sangre.
Nota de calificación	6,2

Timbre Escuela

Firma de Alumno	
Rut:	<u>17.931.090-2</u>
Fecha:	<u>25 / 03 / 2019</u>

Agradecimientos

Proyecto Fondecyt 1171530, “Ripening regulation of the Chilean Strawberry fruit: roles of hormones and molecular regulators”

María Alejandra Moya León, investigador responsable.

Fue un viaje bastante largo estos 6 años, pero el mejor, por lo mismo quiero agradecer a mis padres Jorge y Ana, a mis hermanas Francisca y Camila, y mi sobrina Vicenta, ya que tener el apoyo de tu familia es muy importante.

Quiero agradecer a las profesoras María Alejandra Moya y Daniela Urbina Alvear por permitirme participar en este programa de investigación y por la paciencia que me tuvieron a lo largo de todo este proyecto. También a las personas del laboratorio de Genética y Biología Molecular Vegetal por siempre ayudarme y aconsejarme.

Gracias a los amigos que hice en la universidad que hicieron todo más fácil, ameno, y que a final de cuentas es lo más importante y que perdurara en el tiempo.

1. RESUMEN

Los frutos de *Fragaria chiloensis* se caracterizan por tener un agradable aroma y sabor, pero su rápido ablandamiento limita su comercialización. Los cambios de textura en el fruto son importantes pues definen la calidad de la fruta, determinan la vida postcosecha de los frutos y la susceptibilidad a ciertos patógenos. El ablandamiento de los frutos se debe a cambios en la estructura de la pared celular debido a la acción de múltiples enzimas que actúan sobre ésta. Esto exige una adecuada coordinación transcripcional, la que podría ser llevada a cabo a través de factores de transcripción (FT). Se han identificado varios FT que podrían estar participando, algunos de los cuales pertenecen a la familia MADS-box. Se ha demostrado en frutos como durazno, tomate y frutilla una estrecha relación de FT de la familia MADS-box con eventos claves en la maduración de estos frutos, como lo son el desarrollo de color, sabor, compuestos volátiles para generar aromas y el ablandamiento. En *Fragaria chiloensis* se han encontrado FT de tipo MADS-box que se expresan diferencialmente en frutos en los distintos estadios de maduración y que presentan un aumento en su transcripción durante la fase de maduración de la fruta, tales como MADS1 y MADS2 del tipo SEPALLATA (SEP). Se ha identificado un nuevo factor de transcripción MADS-box del tipo SHATTERPROOF (SHP) en frutos de *Fragaria chiloensis* el cual ha sido nombrado Fc1185. Se cuantificó los niveles de transcritos de Fc1185 mediante RT-qPCR determinando una tasa transcripcional elevada en fruto y muy baja en otros tejidos, con niveles incrementales durante la maduración de los frutos de *F. chiloensis*. Debido a que se ha reportado que FT MADS-box del tipo SEP y SHP actúan en conjunto durante la regulación transcripcional de genes asociados a la maduración, se comparó los niveles de expresión de Fc1185 (tipo SEP) y MADS1 y MADS2 (tipo SHP). Los resultados de qPCR muestran un perfil de transcripción similar entre ellos durante el proceso de maduración de frutos de *F. chiloensis*, lo que sugiere la posible participación conjunta de estos FT durante la maduración de estos frutos.

ÍNDICE

2. INTRODUCCIÓN.....	7
3. MARCO TEÓRICO.....	9
3.1 El fruto de <i>Fragaria sp.</i>	9
3.2 <i>Fragaria chiloensis</i>	10
3.3 Importancia nutritiva.....	10
3.4 Maduración del fruto.....	11
3.4.1 Acumulación de azúcares y producción de flavonoides.....	11
3.4.2 Ablandamiento frutal.....	12
3.5 Estructura de la pared celular.....	13
3.5.1 Componentes de la pared celular.....	13
3.5.2 Enzimas involucradas en el desensamblaje de la pared celular.....	18
3.6 Hormonas relacionadas con la maduración de las frutas.....	19
3.7 Factores de transcripción relacionados con la maduración.....	19
3.7.1 Factor de transcripción tipo MADS-box.....	21
3.7.2 Factores de transcripción tipo MADS-box en frutillas.....	23
3.7.3 MADS-box de tipo SHATTERPROOF (SHP).....	23
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1 Obtención de material vegetal.....	26
5.2 Extracción de RNA desde frutos de <i>Fragaria chiloensis</i>	26

5.3 Síntesis de cDNA.....	28
5.4 Análisis de la expresión del factor de transcripción MADS1, MADS2 y Fc1185 mediante PCR en tiempo real (qPCR).....	29
5.5 Análisis filogenético.....	29
6. RESULTADOS.....	30
6.1 Síntesis de cDNA.....	30
6.2 Análisis de expresión génica relativa del tipo MADS-box durante el desarrollo del fruto de <i>Fragaria chiloensis</i>	35
6.3 Árbol filogenético de Fc1185.....	39
7. DISCUSIÓN.....	40
8. CONCLUSIÓN.....	47
9. BIBLIOGRAFÍA.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Morfología de frutos de <i>Fragaria</i>	9
Figura N°2: Estructura de la celulosa en la pared celular vegetal.....	14
Figura N°3: Representación estructural xiloglicano.....	15
Figura N°4: Representación estructural xilanos.....	15
Figura N°5: Representación estructural glucomanano.....	16
Figura N°6: Representación estructural homogalacturonanos.....	17
Figura N°7: Representación estructural ramnogalacturonano I.....	17
Figura N°8: Esquema de la clasificación estructural de los genes MADS-box en plantas...22	
Figura N°9: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de ARN de muestras de <i>Fragaria chilensis</i>	31
Figura N°10: Electroforesis para verificar la integridad del ARN, luego del tratamiento con DNAsa.....	33
Figura N°11: Electroforesis en gel agarosa de un PCR para GAPDH de las muestras tratadas con DNAsa.....	33
Figura N°12: Electroforesis en gel de agarosa de un PCR para GAPDH utilizando las muestras de cDNA.....	34
Figura N°13: Niveles de transcritos de Fc1185, MADS1 y MADS2, en frutos y diferentes tejidos.....	37
Figura N°14: Comparación en los niveles de transcritos de Fc1185, MADS1 y MADS2...38	
Figura N°15: Árbol filogenético de factores de transcripción de tipo MADS-box.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Clasificación de los factores de transcripción en plantas según sus dominios conservados.....	21
Tabla N°2: Extracción de ARN desde los frutos de <i>Fragaria chiloensis</i>	30
Tabla N°3: Tratamiento de muestras de ARN con DNasa.....	32
Tabla N°4: Partidores utilizados y su eficiencia.....	35

2. INTRODUCCIÓN

La maduración de los frutos es un proceso que ocurre durante su desarrollo, es altamente coordinado y coincide con la maduración de las semillas. El proceso de maduración de un fruto está regulado por miles de genes que controlan el progresivo ablandamiento de éste, acumulación de azúcares, ácidos, pigmentos y liberación de compuestos volátiles (1). Todos los cambios que experimenta la fruta durante la maduración requieren de una compleja red donde interactúan múltiples genes y vías de señalización (2). Esto requiere la participación de distintos compartimentos celulares, múltiples enzimas y por lo mismo un sinnúmero de genes y su traducción a proteínas. Así es como todos estos eventos tienen como función alterar fisiológicamente y bioquímicamente a la fruta influenciando su apariencia, textura, sabor y aroma (3) para transformarlo en un fruto organolépticamente atractivo.

Todas las frutas presentan modificaciones en el color, aroma, textura, sabor y susceptibilidad a patógenos durante la maduración, pero las podemos clasificar en dos grandes grupos según su fisiología de maduración: frutas climatéricas y no-climatéricas. Esta clasificación se basa principalmente en separar a las frutas que presentan un alza en la tasa respiratoria y un alza en la tasa de producción de etileno durante la maduración (frutos climatéricos) de los que no lo presentan (frutos no-climatéricos) (4). A pesar de esta diferencia e independientemente del tipo de fruto, todos estos procesos son altamente coordinados por una amplia red de vías de señalización donde participan múltiples genes y hormonas.

En el caso de las frutillas, una fruta no climatérica, la maduración ocurre en forma independiente del etileno. Un gran número de genes asociados a la maduración se expresan en la frutilla y codifican para proteínas potencialmente involucradas en cambios metabólicos, respiratorios y físicos en el fruto en maduración, incluyendo el metabolismo de polisacáridos asociados al desensamblaje de la pared celular y como consecuencia en el ablandamiento (5). Este último punto es de especial importancia, durante la maduración la

fruta se vuelve más susceptible a la enfermedad y descomposición que una fruta verde sin madurar (6), así es como de todos los procesos madurativos por los que atraviesa el fruto, el desensamblaje de la pared celular, es decir, ablandamiento del fruto es un paso crucial que aumenta la susceptibilidad (7) tanto a agentes patógenos como a daño mecánico, lo que puede deteriorar su calidad.

Los genes MADS-box son una familia de factores de la transcripción reguladores de la expresión de múltiples genes. Estos factores de transcripción están altamente conservados en plantas, animales y levaduras. Los análisis genéticos muestran que estos genes están involucrados en el desarrollo de muchos órganos florales (8). En el caso de la frutilla se ha documentado un incremento de la expresión de estos genes durante su maduración, pero su rol específico aún no ha sido clarificado.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 El fruto de *Fragaria* sp.

Las frutillas (*Fragaria* sp, pertenecientes a la familia de las rosáceas) son frutos muy apetecidos comercialmente, principalmente por su atractivo color, sabor y aroma. En el sentido horticultural del fruto, este es un conjunto de aquenios o frutos verdaderos, desarrollados sobre el receptáculo o pseudocarpio que corresponde a la base de la flor (Fig. 1). Los aquenios se caracterizan por ser secos, indehiscentes y monoespermos, mientras que el pseudocarpio corresponde a la expansión del receptáculo o tálamo de la flor, la cual se hipertrofia después de la fecundación para convertirse en la parte comestible del fruto.

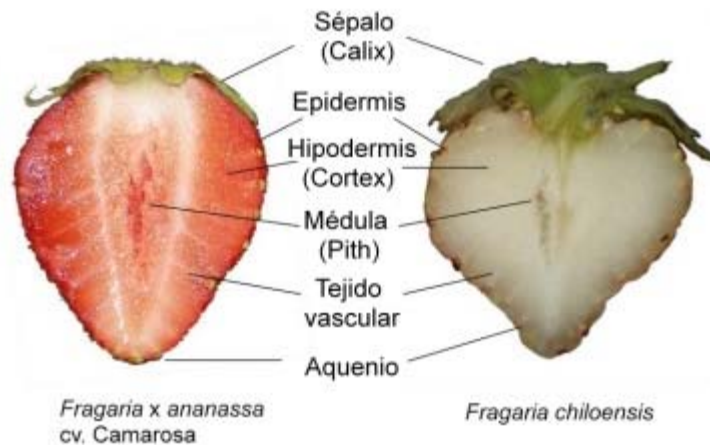


Figura N°1: Morfología de frutos de *Fragaria*.

Se muestra la morfología de frutos de *Fragaria* de diferentes especies, donde destaca la diferencia en la coloración del receptáculo de *Fragaria chiloensis*, de color blanco.

3.2 *Fragaria chiloensis*.

La frutilla chilena (*Fragaria chiloensis*) es una especie nativa de Chile la cual es uno de los progenitores de la frutilla comercial (*Fragaria ananassa*) y se encuentra distribuida en el país en diferentes sistemas agroecológicos(9).

La frutilla chilena es un fruto no climatérico. Se caracteriza por ser una fruta de elevada calidad con características como excelente aroma y sabor y una alta resistencia a la infección por patógenos. En el último tiempo se ha incrementado el interés en expandir la producción de este fruto en Chile (10).

Basándonos en características morfológicas existen dos formas botánicas: *Fragaria chiloensis f. patagonica* y *Fragaria chiloensis f. chiloensis*. La primera se caracteriza por ser plantas pequeñas que producen gran número de estolones y frutos pequeños y rojos, mientras que la otra forma genera menos estolones y desarrolla una fruta más grande de color blanco-rosáceo (11).

3.3 Importancia nutritiva.

Ha sido demostrado que la frutilla comercial (*Fragaria x ananassa*) presenta grandes beneficios nutricionales, por ejemplo los berries en general contienen una gama de micronutrientes que son esenciales para la salud. En particular, muchos tipos de berries contienen un alto nivel de vitamina C (ácido ascórbico), tanto que a menudo solo un puñado de la fruta puede proporcionar la cantidad diaria recomendada (RDA). Dado que esta vitamina tiene actividad antioxidante, actúa como un cofactor en las reacciones de hidroxilación que se requieren para la síntesis de colágenos, tienen un papel en la síntesis de hormonas, el sistema inmunológico, la absorción de hierro, la agregación de plaquetas, la formación de trombos y pueden tener un papel en la prevención de enfermedades cardíacas, osteoporosis y una variedad de cáncer (12).

En el caso de *Fragaria chiloensis*, se hace muy difícil su obtención y consumo, debido a la limitada área geográfica donde se cultiva y a su proceso acelerado de maduración una vez que el fruto es cosechado desde la planta, por lo mismo sería útil saber que genes,

hormonas están involucrados y como participan estos en las vías de señalización implicadas en la maduración de este fruto no climatérico.

3.4 Maduración del fruto.

Los cambios fisiológicos que sufre la frutilla se deben principalmente a cambios en la expresión génica y a la actividad de ciertas enzimas. Los cambios más importantes ocurren en cuanto a su tamaño, forma, textura, color y sabor, lo que va de la mano del aumento de la concentración de sólidos solubles y compuestos aromáticos

3.4.1 Acumulación de azúcares y producción de flavonoides.

La frutilla es una de las frutas más populares y con mayor demanda a nivel mundial. La calidad sensorial de la frutilla está basada principalmente en su apariencia (tamaño, forma, color, entre otros) y el balance apropiado de compuestos volátiles y no volátiles presentes en el fruto; de estos últimos los carbohidratos, aminoácidos y los ácidos orgánicos son considerados como los compuestos responsables del sabor. En el caso de los carbohidratos, la glucosa, fructosa y sacarosa están relacionados directamente con la percepción del sabor dulce y la glucosa da origen a diversos compuestos como los pertenecientes a la familia de las furanonas que forman parte del aroma de la frutilla (13).

Durante la fase de maduración de la frutilla, las concentraciones de fructosa, galactosa, sacarosa, citrato y malato continúan aumentando, lo que lleva a una mayor proporción de azúcar / ácido, que es un determinante importante del sabor de la fruta (14).

Los flavonoides son compuestos polifenoles importantes en la comunicación entre la planta y el medio ambiente, y desempeñan un papel en respuesta al estrés biótico y abiótico. En flores y frutas, contribuyen a la apariencia de la planta y son importantes para la fertilización mediante el polen, la atracción de los animales para la polinización y la dispersión de las semillas. Los compuestos polifenoles tienen una importante capacidad antioxidante y efectos beneficiosos para la salud (15).

Las antocianinas son los pigmentos responsables del color del receptáculo de la frutilla. En las frutillas comerciales se han identificado antocianinas glicosiladas derivadas de pelargonidina y cianidina, con pelargonidina 3-glucósido como antocianina predominante. Sin embargo, en el fruto de la frutilla nativa blanca, la principal antocianina encontrada corresponde a la cianidina 3-O glucopiranosido, que está presente solo en los aquenios (16). La biosíntesis de pigmentos de flavonoides está determinada por la expresión de genes estructurales, que están regulados por factores de transcripción involucrados en diferentes niveles en la ruta biosintética de los compuestos flavonoides. La intrincada red de interacciones entre los genes estructurales y reguladores de esta vía permite una regulación precisa de la producción de un metabolito en particular, en alguna etapa de desarrollo u órgano de la planta.(17)

3.4.2 Ablandamiento frutal.

Uno de los principales factores que limitan la vida de post cosecha y reducen la calidad de una fruta es el exceso de ablandamiento. Estos cambios en la textura que ocurren durante la maduración de las frutas que comprenden: la disolución de la lámina media, reducción de la adhesión célula-célula y el debilitamiento de la pared celular son el resultado de la acción de un sinnúmero de enzimas modificadoras de la pared celular (18). Las modificaciones de la pared celular que conllevan al ablandamiento de la fruta resultan principalmente de enzimas modificadoras de la pared como poligalacturonasa, pectin metilesterasa, pectato liasa y beta-galactosidasa, entre otras, generalmente codificadas por genes relacionados con la maduración (19). En frutilla los cambios de la pared celular asociados a su ablandamiento durante la maduración están principalmente asociados a la solubilización de la pectina y despolimerización de las hemicelulosas (20)

3.5 Estructura de la pared celular.

La pared celular tiene como función determinar la forma celular, otorgar estabilidad mecánica, mantener unidas las células en un tejido, modular el crecimiento celular y constituir una barrera frente al ataque de agentes patógenos (21).

En cuanto a su estructura, esta tiene una arquitectura supramolecular, compuesta de varios tipos de polímeros heterogéneos. En general todas las células están rodeadas por una pared celular primaria, sin embargo, algunos tipos celulares contienen también una pared secundaria, como los xilemas (22).

La pared celular primaria, que es la que se halla en los frutos, posee un escaso o nulo contenido de compuestos aromáticos (fundamentalmente lignina) y a diferencia de las paredes secundarias, la pared primaria está altamente hidratada (65% agua). Dicho componente acuoso contiene solutos y proteínas solubles, de las cuales se destacan enzimas (23), específicamente las que son capaces de degradar polisacáridos.

3.5.1 Componentes de la pared celular.

Celulosa: Es un polisacárido constituido de un continuo de disacáridos de glucosa (celobiosa), posicionados en 180° uno respecto del otro, con enlaces β -1,4-glucopiranosil no ramificados (24).

Se han descrito complejos enzimáticos, celulosa-sintasa, unidos a la membrana plasmática, responsables de la síntesis y ensamblaje de las microfibrillas. Estos complejos pueden ser visualizados como rosetas hexaméricas de 26-30 nm de diámetro (25).

La celulosa tiene una sofisticada organización, siendo su estructura básica la fibrilla elemental, las cual está compuesta por unas 100 moléculas de celobiosa, a su vez 20 de esta fibrillas elementales forman una microfibrilla. Por unión de 250 microfibrillas se forma la macrofibrilla, y por último aproximadamente la unión de unas 6 macrofibrillas forman la fibra de celulosa (Fig.2).

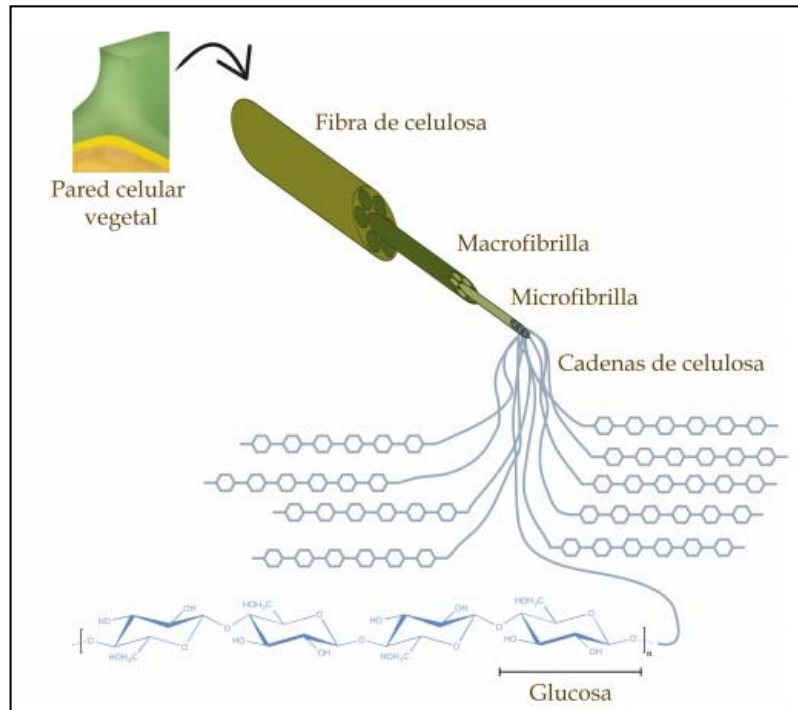


Figura N°2: Estructura de la celulosa en la pared celular vegetal (26)

Hemicelulosas: Este grupo de moléculas está compuesto por polisacáridos que se asocian con las microfibrillas de celulosa para formar una matriz entrecruzada (27).

Son polisacáridos heterogéneos que presentan una cadena principal con ramificaciones cortas. La composición varía de un tipo de célula a otra y según la especie (26). Así es como existen tres clases principales de hemicelulosas: xiloglucanos, xilanos y glucomananos.

- A) Xiloglucanos: Son cadenas de β -1,4-glucanos con ramificaciones de residuos de D-xilosa, algunas de las cuales están enlazadas a residuos de D-galactosa (Fig.2). Los xiloglucanos se encontrarían estrechamente unidos a las microfibrillas de celulosa mediante dos mecanismos: por múltiples puentes de hidrógeno, y segundo, al ser atrapado en el proceso de cristalización justo después de la síntesis de las fibrillas de celulosa (28).

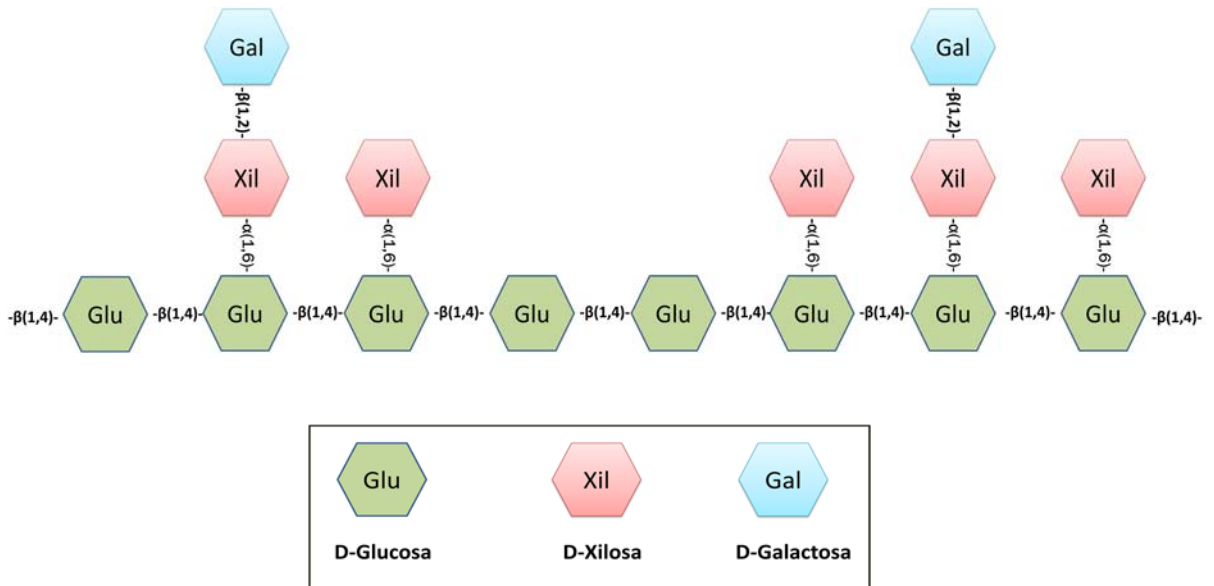


Figura N°3: Representación estructural xiloglicano. Adaptado de Somerville y col., 2004

B) Xilanos: Son polímeros cuya estructura está formada por una cadena principal de D-xilanos unidos por enlaces β -1,4, los cuales presentan ramificaciones de ácido α -D-glucorónico y de α -L-arabinosa (Fig. 3).

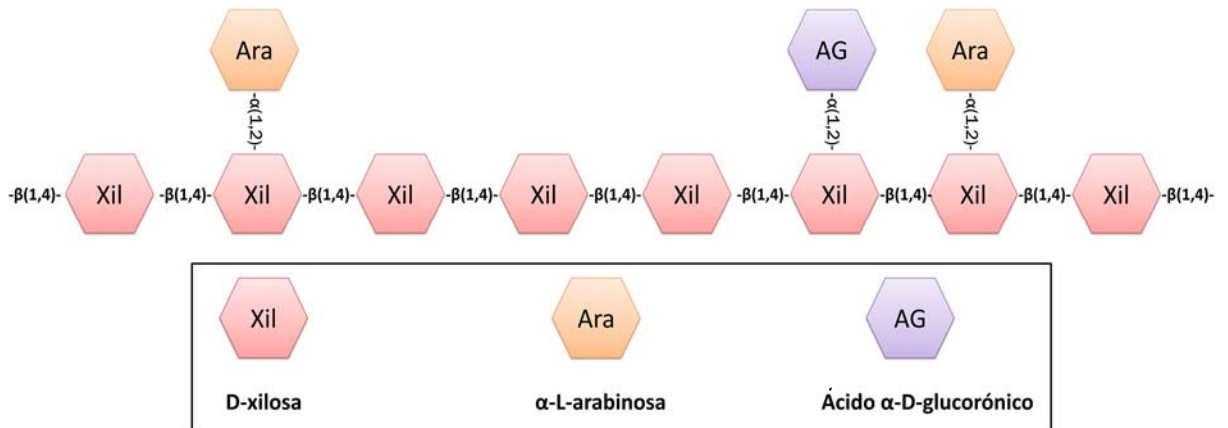


Figura N°4: Representación estructural xilanos. Adaptado de Somerville y col., 2004

C) Glucomananos: Son moléculas que en su estructura van alternando monómeros de D-glucosa y D-manosa unidos por enlaces β -1,4, con algunas ramificaciones de D-galactosa (Fig. 4).

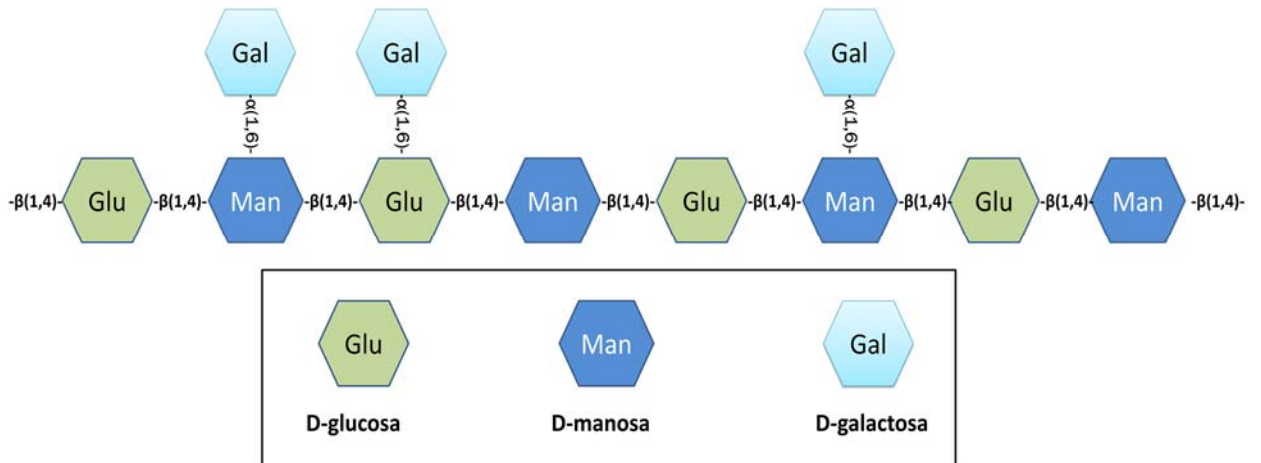


Figura N°5: Representación estructural glucomanano. Elaboración propia

Pectinas: Es un conjunto heterogéneo de polímeros altamente hidratados, que poseen en su estructura numerosos monómeros de ácido α -D-galacturónico (29). Estas estructuras en conjunto con las hemicelulosas se agregan a las microfibrillas de celulosa, promoviendo la hidratación de la pared gracias a su alta capacidad hidrofílica. En general las pectinas son el grupo de polisacáridos más abundante en la pared celular de los frutos, llegando a conformar en algunos casos la mitad de todo el contenido polimérico de la pared (23). Se han reconocido al menos tres tipos de polisacáridos en este grupo: homogalacturonano, ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II.

A) Homogalacturonanos: Es el polímero más abundante de las pectinas, llegando a alcanzar incluso un 65% del total de pectinas en frutos cítricos (30). Son cadenas lineales de ácido galacturónico unidas por un enlace α -1,4, formando las partes “lisas” de las pectinas de las paredes celulares (31). Pueden presentar metil-esterificación en C-6 y eventualmente grupos acetilo en C-2 o C-3. Serían sintetizados con un alto porcentaje de grupos carboxilos esterificados, esto sirve para disminuir la repulsión entre polímeros (29).

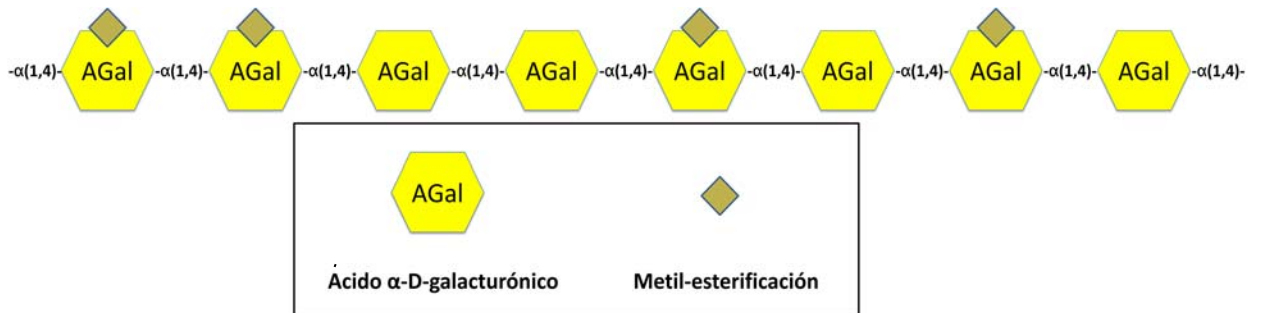


Figura N°6: Representación estructural homogalacturonanos. Adaptado de Somerville y cols., 2004

B) Ramnogalacturonano I: Constituye aproximadamente entre el 20-35% de las pectinas y su estructura está constituida por repeticiones de un disacárido de Ácido galacturónico y ramnosa con enlaces de tipo α -1,4 y α -1,2, donde más o menos la mitad de los residuos de ramnosa son sustituidos en C-4 con cadenas laterales que contienen principalmente arabinosa y galactosa.

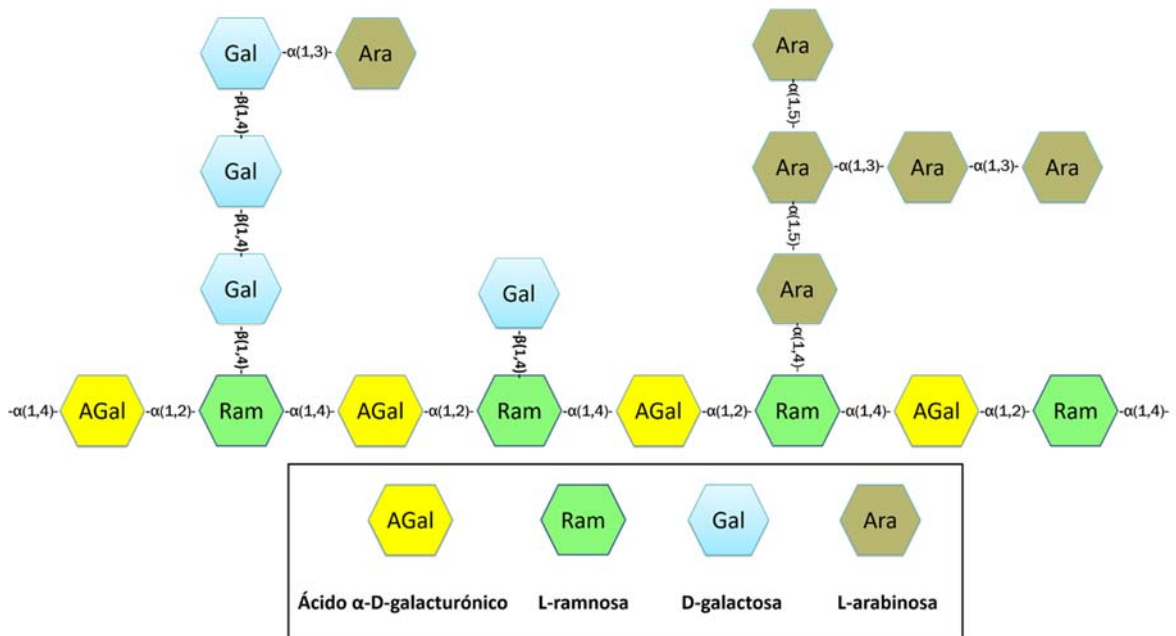


Figura N°7: Representación estructural ramnogalacturonano I. Adaptado de Somerville y cols., 2004

C) Ramnogalacturonano II: estos polisacáridos poseen una cadena principal de al menos siete residuos de ácido galacturónico unidos por enlaces α -1,4, y se caracterizan por tener una estructura muy ramificada. Las cadenas laterales generalmente pueden ser de nona, octa o disacáridos, y estos residuos pueden ser D-apiosa, L-fucosa, L-ramnosa, y ácido deoxo-D-lixo-heptulósico entre otros (21).

3.5.2 Enzimas involucradas en el desensamblaje de la pared celular.

El desensamblaje de la pared celular durante la maduración de la fruta está mediado por genes que codifican para enzimas y proteínas capaces de modificar los diferentes polisacáridos, especialmente glicanos y pectinas. Estas enzimas generalmente se clasifican en pectolíticas, capaces de degradar o modificar polisacáridos de pectina, y no pectolíticas responsables de las modificaciones de hemicelulosas (32).

Las pectinasas, como la poligalacturonasa (PG), han recibido una considerable atención debido a su relación directa con la maduración y reducción de la firmeza de la frutilla. Se ha demostrado en *F. x ananassa* el incremento en la acumulación de transcritos de PG durante el desarrollo frutal y su directa relación con la reducción de firmeza (33).

Otra enzima importante es la pectato liasa que actúa sobre el mismo sustrato que la PG, pero utiliza un mecanismo de acción diferente. La catálisis se produce por una beta-eliminación la que genera una insaturación en los enlaces C4-C5 (34).

Las expansinas son otro grupo de proteínas involucradas en el ablandamiento. Su función sería la de interrumpir las interacciones de puentes de hidrógeno existentes entre la celulosa y los glucanos no celulósicos, permitiendo la relajación de la estructura de la pared vegetal. Además de este efecto directo sobre la estructura de la pared se ha propuesto que la acción de las expansinas facilitaría el acceso de otras enzimas presentes a sus sustratos, contribuyendo de este modo al desmantelamiento de la pared celular (35).

3.6 Hormonas relacionadas con la maduración de las frutas.

Como se mencionó anteriormente, la frutilla al ser un fruto no-climatérico no requiere de etileno para madurar y no presenta el aumento en la tasa respiratoria durante su maduración. Por lo mismo se han propuesto otras hormonas reguladoras como la auxina y el ácido abscísico (ABA).

Las auxinas son un grupo de moléculas reguladoras del crecimiento que originalmente se relacionaron al crecimiento celular en brotes y su alargamiento en el eje longitudinal⁽³⁶⁾. Si bien los niveles de las auxinas son elevadas durante el desarrollo, al comenzar y avanzar la maduración éstos descienden. En el caso de *F. x ananassa*, esta fruta ha sido muy estudiada como modelo de fruta no-climatérica, su perfil hormonal indica una disminución gradual en los niveles de auxina en etapas tardías del crecimiento, lo que está relacionado con el comienzo de la maduración (37).

Otra hormona muy importante es el ácido abscísico (ABA). Se ha registrado un aumento en el contenido de ABA durante la maduración tanto de fruto climatéricos (peras, paltas, tomates y duraznos) como en frutos no-climatéricos (uvas y frutillas) (38). En investigaciones más recientes, se han tratado frutos con ABA provocando un aumento de ciertas características asociadas a la maduración como: desarrollo de color por aumento de antocianinas y pérdida de la firmeza del fruto (39).

3.7 Factores de transcripción relacionados con la maduración.

Todos los genes que codifican para proteínas, son transcritos por la RNA polimerasa II (RNAPII), que en realidad es un complejo multiproteico llamado holoenzima RNAPII. La tasa de transcripción depende principalmente de la tasa de inicio de la transcripción, la cual está dada por la unión del RNAPII al sitio de iniciación. Esta unión a su vez depende de la actividad combinada de factores de transcripción que se unen a regiones cercanas al inicio de la transcripción, normalmente hacia el 5' del inicio de la transcripción, pero también se pueden ubicar en un exón al interior del mismo gen o a distancias relativamente lejanas del gen.

La unión de los factores de transcripción al DNA provoca una apertura de la cromatina y reclutamiento de otros factores de transcripción llamados co-activadores. Estos últimos actúan acetilando histonas y desmetilando citosinas del DNA. Por lo tanto, el estado transcripcional de cada gen viene regulado por el conjunto de factores de transcripción y proteínas que modifican el estado de compactación de la cromatina (40).

En términos generales, existen dos tipos de factores de transcripción: factores de transcripción basales y regulatorios. Los primeros pertenecen a un conjunto mínimo de proteínas requeridas para la iniciación de la transcripción, las cuales junto a la RNAPII forman el aparato transcripcional básico. Los factores de transcripción regulatorios se unen de manera proximal o distal del aparato transcripcional basal y pueden actuar como factores constitutivos o inducibles (41).

En cuanto a los factores de transcripción que encontramos en plantas, estos se distribuyen en familias de multigenes, los cuales pueden estar dispersos en el genoma o encontrarse en un mismo cromosoma. Tanto los genes que se expresan de forma constitutiva como los que responden a ciertos estímulos dependen de la interacción de un factor de transcripción con un elemento en *cis*, acompañado o no de otros factores de transcripción.

Algunas familias de factores de transcripción son clasificadas según el tipo de dominio que presentan (Tabla N°1) (42).

Tabla N°1: Clasificación de los factores de transcripción en plantas según sus dominios conservados.

Tipo de dominio	Estructura
Dedos de Zinc	Motivos en dedo, cada uno mantenido por residuos de cisteína y/o histídina alrededor de un ion de zinc
bZIP	Una región básica con uno a tres motivos en cremallera ricos en leucina
MYB	Una región básica con una a tres repeticiones imperfectas formando una hélice-hélice-vuelta-hélice
Trihélice	Motivo rico en residuos básicos, ácidos y prolina/glutamina el cual forma un dominio trihélice de unión a ADN
Homeodominio	Aproximadamente 60 residuos aminoácidos que generan entre tres a cuatro α -hélices y un brazo N-terminal
MYC b/HLH	Un “cluster” de residuos aminoácidos básicos adyacentes a un motivo hélice-giro-hélice.
MADS	Aproximadamente 57 aminoácidos que comprenden una larga α -hélice y dos β -plegadas.
Motivo garfio-AT	Una secuencia central de consenso R(G/P)RGRP, con la región RGR contactando el surco menor de ADN rico en A/T.
Caja HMG	Dominio en forma de L que consiste en tres α -hélice con un ángulo de 80° entre los brazos
AP2/EREBP	Región de 68 aminoácidos con un dominio conservado que constituye una α -hélice anfipática putativa
B3	Una secuencia conservada de 120 aminoácidos en el extremo C-terminal de VP1 y ABI3
ARF	Una región de 350 aminoácidos similar a B3 en la secuencia

Análisis transcripcionales de frutilla mediante técnicas moleculares como “microarrays” han encontrado genes relacionados con la maduración, involucrados en la biosíntesis de antocianinas, degradación de la pared celular, sacarosa y metabolismo de lípidos, fosfatasa y factores de transcripción (43).

En las plantas, los genes homeóticos están representados por una clase de factores de transcripción llamados genes MADS-box. Estos genes son el grupo de factores de transcripción más estudiados en plantas (44).

3.7.1 Factor de transcripción tipo MADS-box.

El motivo de la caja MADS es una región de 56 aminoácidos conservada que se encuentra dentro del dominio de unión al ADN de numerosos factores de transcripción eucarióticos. El nombre en sí se deriva de las iniciales de los miembros fundadores de esta familia: MCMI, AG, DEFA y SRF. En la mayoría de las proteínas MADS-box, la caja MADS se encuentra en el extremo N-terminal (por ejemplo, RSRFC4MEF2). Sin embargo, en otras proteínas, la caja MADS está ubicada más centralmente (por ejemplo, SFW) o hacia el extremo C-terminal (por ejemplo, ARGRI). Al menos en el caso de SRF (factor de respuesta del suero), la presencia de una extensión N-terminal a la caja MADS tiene profundas consecuencias para su especificidad de unión al ADN (45).

Existen dos linajes de proteínas MADS. Las proteínas MADS de clase I son un grupo heterogéneo grande que comparte solo el dominio MADS ("M"). Las proteínas de Clase II, o las proteínas MADS de tipo MIKC incluyen las proteínas homeóticas florales bien caracterizadas y contienen los dominios "M", "I" (Intervención), "K" (Keratin-like) y una región C-terminal variable. El dominio K es importante para la homo y heterodimerización y la formación de complejos de orden superior (46). Los factores de transcripción MADS-box reconocen específicamente secuencias de ADN llamadas cajas CArG que se encuentran en las secuencias promotoras de los genes blanco (47), esto es de mucha utilidad al momento de buscar genes putativos para este tipo de factor de transcripción en nuevos organismos como *Fragaria chiloensis*.

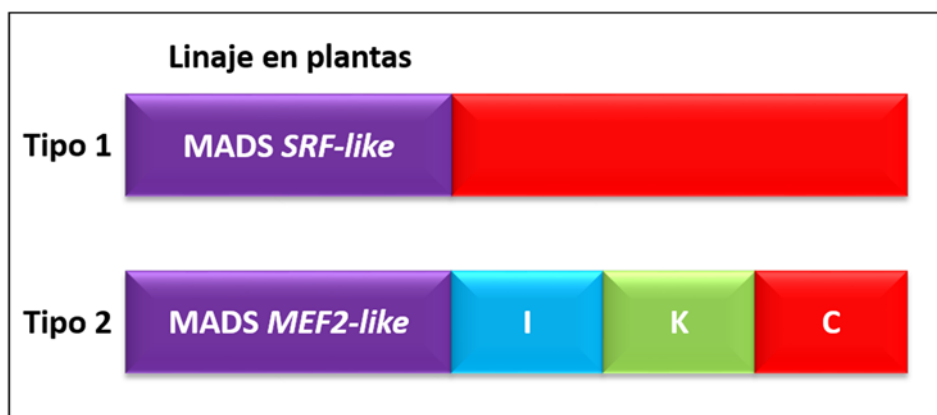


Figura N°8: Esquema de la clasificación estructural de los genes MADS-box en plantas. El dominio MADS en morado, se encuentra altamente conservado. Los MADS-box de tipo II poseen otros dominios como el I de intervención, K o Keratin-like y C o C-terminal.

3.7.2 Factores de transcripción tipo MADS-box en frutillas.

En frutillas los genes FaMYB1 y FaMYB10 codifican dos factores de transcripción de tipo MYB, ambos relacionados con la acumulación de antocianinas durante la maduración (48). Recientemente se identificó otro factor de transcripción de la familia MYB, FaGAMYB, que desempeña un importante papel regulador en el inicio de la maduración del receptáculo (49).

Por otra parte se ha demostrado que silenciando un gen de la clase SEP1/2 (factor de transcripción MADS-box) en plantas transgénicas, el cual es expresado durante la maduración normal de ésta, se retrasa el desarrollo y modifica este importante proceso (50). En el caso de *Fragaria chiloensis* se han identificado dos genes MADS-box (FcMADS1 y FcMADS2). FcMADS1 muestra un incremento en la expresión durante las etapas de cambio de color y maduración de la fruta, mientras que FcMADS2 aumenta solo durante la fase de maduración (51). Esto podría indicar que los factores de transcripción de la familia MADS-box podría estar participando en la regulación transcripcional de los genes de la pared celular durante la maduración de la frutilla.

3.7.3 MADS-box de tipo SHATTERPROOF (SHP).

Los factores de transcripción MADS de tipo II contienen una secuencia conservada N-terminal denominada MADS (MADS: MCM1-AGAMOUS-DEFICIENS-SRF) encargada de interactuar con secuencias de DNA específicas (cajas CArG), seguida de una región I y una caja K, ambos de los cuales están involucrados en la mediación de las interacciones proteína-proteína, y el dominio C-terminal que se ha demostrado que es esencial para la formación de complejos ternarios y la función activadora de la transcripción (52).

SHP1 y SHP2 pertenecen a la familia de MADS-box eucariotas de reguladores transcripcionales que se han diversificado mucho en plantas, particularmente en angiospermas, donde funcionan en una diversidad de eventos de desarrollo a lo largo del ciclo de vida de la planta (46).

En *Arabidopsis* SHP1 y SHP2 son dos genes MADS-box estrechamente relacionados y altamente redundantes que participan en varios aspectos del desarrollo reproductivo. Son más conocidos por promover la lignificación en la zona de dehiscencia, causando así la rotura de la vaina en la madurez.

Mientras que los mutantes a un solo SHP presentan el mismo fenotipo que las plantas de tipo salvaje, los dobles mutantes a SHP1 y SHP2 no pueden llevar a cabo la dehiscencia, y las plantas que sobreexpresan estos dos genes presentan una apertura prematura de los frutos (53).

Recientemente se ha mostrado un papel en el desarrollo y maduración de la fruta para los genes que pertenecen al subgrupo PLENA / SHATTERPROOF en frutos climatéricos como duraznos y tomates. El papel desempeñado por un gen de la caja MADS de tipo C en la maduración de las frutillas (*Fragaria x ananassa*) se ha estudiado modificando de forma transitoria la expresión génica mediante la sobreexpresión o la regulación mediada por ARN de interferencia. La expresión alterada de un gen nombrado FaSHP causó un cambio en el tiempo necesario para alcanzar la etapa rosa, que fue ligeramente más corta y mucho más larga, respectivamente. Paralelamente a los tiempos de maduración modificados, los componentes metabolómicos y la expresión de genes relacionados con la maduración también aparecieron diferentes en las frutas modificadas transitoriamente (54).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Estudiar los niveles de expresión de un factor de transcripción MADS-box de tipo SHATTERPROOF (Fc1185) de *Fragaria chiloensis* en distintos tejidos y estadios de maduración del fruto.

4.2 Objetivos específicos:

Medir el perfil de expresión de este factor de transcripción a lo largo de los diferentes estadios de maduración del fruto de *Fragaria chiloensis*

Analizar y correlacionar los niveles de expresión de este factor de transcripción con otros MADS-box ya descritos en la literatura de tipo SEPALLATA.

Caracterizar filogenéticamente a este factor de transcripción, evaluando sus dominios conservados buscando parentesco evolutivo con otros SHATTERPROOF.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de material vegetal.

Se cosechó frutos de *F. chilensis* en diferentes etapas de su desarrollo y maduración, obtenidas desde plantas que crecen en campos comerciales en las ciudades de Contulmo y Purén, durante los meses de Diciembre-Enero de cada año. La fruta se clasificó en cuatro estadios de maduración, de acuerdo al peso y color del receptáculo: C1, fruto pequeño de color verde; C2, fruto grande con receptáculo verde, C3 fruta en transición con achenios de color rojo y receptáculo blanco; y C4, fruta grande madura, con achenios de color rojo y receptáculo blanco/rosado.

5.2 Extracción de RNA desde frutos de *Fragaria chilensis*.

El RNA total se extrajo mediante el método del CTAB (55) desde muestras de fruto completas (incluyendo receptáculo y achenios), de cada uno de los diferentes estadios de maduración. Desde cada estadio se prepararon 3 extracciones de RNA independientes (3 réplicas biológicas). Se midió la concentración y pureza del RNA mediante espectrofotometría con el equipo Nanodrop (ND-1000).

A 0,2 g de tejido pulverizado y congelado en nitrógeno líquido se le agregó 1 ml de buffer de extracción (100 mM Tris (pH 8), 25 mM EDTA, 2 M de NaCl, 2% CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio), 2 % PVP (polivinilpirrolidona), 0,4% β -mercaptoetanol, y 0,04 % espermidina). Luego de incubar a 65°C por 15 min, se le agregó 1 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (IAA) (24:1). Luego de centrifugar a 13.000 rpm por 15 min a 4°C, se rescató el sobrenadante, al cual se le agregó igual volumen de cloroformo:IAA (24:1). Se volvió a centrifugar y el sobrenadante obtenido se mezcló con LiCl 10 M en relación 1:4. Luego de incubar por 12 h a 4°C, se volvió a centrifugar. El precipitado obtenido se resuspendió en 500 μ l de buffer SSTE (10 mM Tris (pH 8), 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% SDS (dodecilsulfato sódico). Se volvió a extraer con 1 vol de cloroformo:IAA (24:1), se centrifugó y el sobrenadante obtenido se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto a -

80° C por 45 min. Luego de centrifugar, el precipitado se secó y se resuspendió en 30 µl de agua tratada con DEPC 1%.

5.3 Síntesis de cDNA

Inicialmente a las muestras de RNA se les realizó tratamiento con DNAsa y posterior comprobación de la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5 %. Para la síntesis de cDNA se siguió el siguiente protocolo donde se utilizó una concentración inicial de 500 ng de ácido nucleico por cada una de las muestras, se llevó a 4 µl con agua y se agregó 1 µl de oligo dT; se incubó a 70°C por 5 minutos y luego a 4°C por 5 minutos; posteriormente se agregó 15 µl de un mix de reacción que contenía lo siguiente: 7 µl de agua libre de nucleasa; 4 µl buffer de reacción; 2 µl de MgCl₂ (25mM); 1 µl de dNTPs y 1 µl de la enzima GoScript™ Transcriptasa Reversa, se incubó siguiendo el siguiente protocolo: a 25 ° C por 5 minutos, 42°C por 1 hora y a 70°C por 15 minutos, almacenando el cDNA a -20°C hasta su utilización.

5.4 Análisis de expresión de los factores de transcripción de tipo MADS-box (MADS1, MADS2 y Fc1185) mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Los niveles de expresión de genes correspondientes a los factores de transcripción de tipo MADS-BOX, en estudio (**anotado como Fc1185**) se cuantificaron mediante análisis con RTqPCR. Para esto se utilizó el kit Improm-II™ Reverse Transcription System para la síntesis de cDNA a partir de las muestras de RNAm. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo utilizando 20 µl Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix, con 5 µM de cada primer. La especificidad de los productos de amplificación obtenidos fue confirmada registrando las curvas de melting de los productos de PCR. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una incubación inicial a 95°C por 10 minutos para activar la enzima, seguida del siguiente ciclo 40 veces; 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos.

5.5 Análisis filogenético.

Se construyó un árbol filogenético con el alineamiento de la secuencia del factor de transcripción Fc1185 con otros 16 genes, correspondientes a factores de transcripción de tipo MADS-box de *F. chiloensis*, *F. ananassa* y *F. vesca*, utilizando el programa MEGA 10.

6. RESULTADOS

6.1 Síntesis de cDNA

Se realizó extracción de ARN desde frutos en diferentes estadios de maduración, considerando tres replicas biológicas para cada uno. Las concentraciones y pureza obtenidas se observan en la Tabla N°2. Todas las muestras tienen una concentración superior a los 340 ng/ul, lo cual es suficiente para realizar los pasos posteriores. En cuanto a la pureza de las muestras, estas se encuentran dentro del rango óptimo que sería entre 1,8-2,4 para cada una de las lecturas (260/280 y 260/230).

Tabla N°2: Cuantificación de ARN total extraído desde frutos de *Fragaria chiloensis*

Estadio	260/280	260/230	ng/μl
C1 I	2,26	2,24	1052,8
C1 II	2,06	2,37	704,2
C1 III	1,98	2,07	560,1
C2 I	2,11	2,17	402,8
C2 II	2,17	2,28	344,5
C2 III	2,18	2,3	368,7
C3 I	2,1	2,28	328,7
C3 II	2,15	2,3	558,6
C3 III	2,12	2,17	405,5
C4 I	2,11	2,16	478,4
C4 II	2,13	2,2	410,2
C4 III	2,15	2,11	398,4

La extracción de ARN se realizó mediante el método CTAB (55) y la cuantificación se efectuó mediante el equipo Nanodrop (ND-1000). La extracción se realizó a partir de 0,2 g de fruta con 1 ml de buffer de extracción.

Mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 9) se pudo comprobar la buena calidad de las muestras de ARN, pues éstas presentan las bandas correspondientes a la subunidad mayor (28S) y menor (18S) de ARN ribosomal en una relación 2:1, lo cual es indicativo de una buena calidad e integridad del ARN, no observándose degradación de éste.

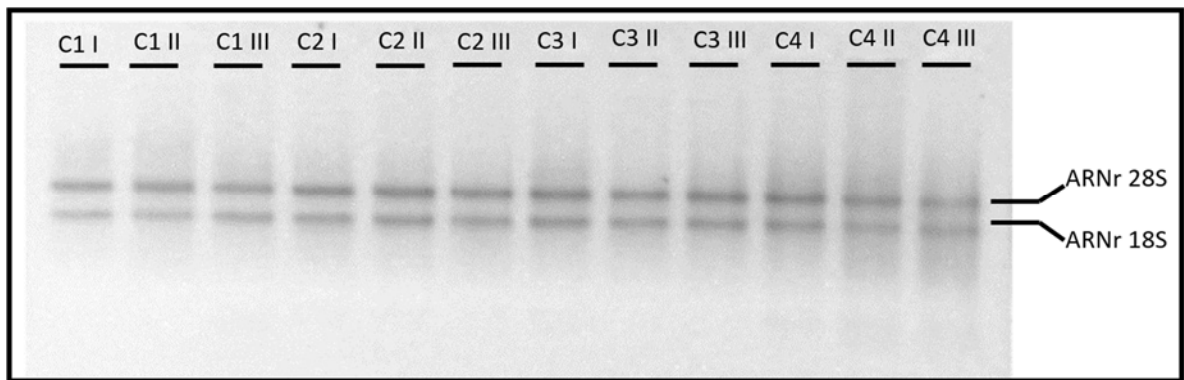


Figura N°9: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de ARN total de muestras de *Fragaria chiloensis*. Aquí mediante electroforesis en gel de agarosa se observan las bandas correspondientes a las subunidades mayor y menor de ARN, 28S y 18S correspondientemente, su integridad y relación 2:1

Las muestras de ARN total fueron tratadas con DNAsa para eliminar la posible contaminación con ADN, que podría interferir en los pasos posteriores de síntesis de cDNA y de qPCR. Posteriormente, nuevamente se verificó la pureza de las muestras, como se aprecia en la Tabla N°3.

Tabla N°3: Cuantificación de ARN extraído desde frutos de *Fragaria chiloensis* y tratados con DNasa

Estadio	260/280	260/230	ng/μl
C1 I	2,13	2,31	659,1
C1 II	2,16	2,35	515
C1 III	2,11	2,2	435,8
C2 I	1,97	1,8	146,6
C2 II	1,9	1,84	225,3
C2 III	2,11	2,3	350,1
C3 I	2,14	1,85	239
C3 II	2,1	1,82	615,2
C3 III	2,06	1,9	356,4
C4 I	1,96	1,81	333
C4 II	2,03	1,97	351,1
C4 III	2,01	1,83	220,4

Concentración de ARN luego del tratamiento con DNasa. La cuantificación se efectuó mediante el equipo Nanodrop (ND-1000)

Nuevamente se verificó la integridad del ARN de las muestras tratadas con DNasa ya que ésta podría eventualmente degradar también el ARN. Como se observa en la figura N°10 las bandas correspondientes a las subunidades mayor y menor de ARN, 28S y 18S, se encuentran íntegras, sin signos de múltiples bandas de degradación y con una relación 2:1 en todas las muestras analizadas.

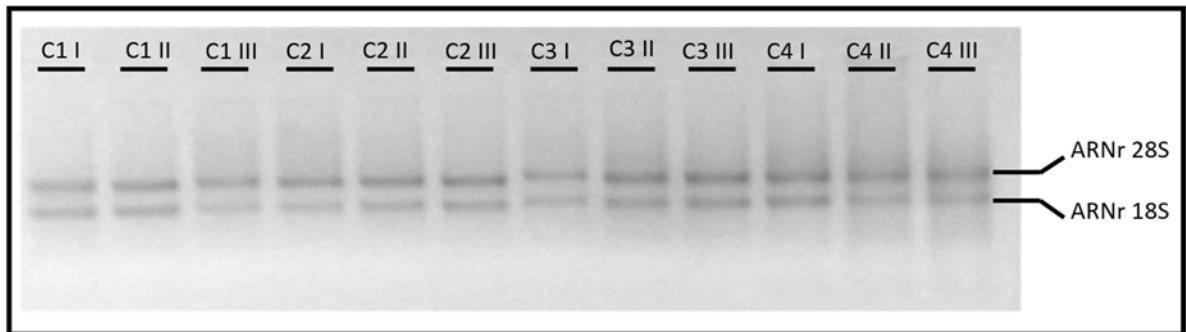


Figura N°10: Electroforesis para verificar la integridad del ARN extraído y tratado con con DNAsa.

Se realizó una PCR convencional utilizando como templado las muestras tratadas con DNAsa y un partidor de GAPDH, para verificar la correcta degradación del ADN de las muestras. Como es apreciable en la figura 11 hubo amplificación en el control positivo C (+), mientras que en el control negativo C (-) ni en ninguna de las muestras de ARN ocurrió la amplificación de GAPDH, confirmando así la ausencia de moléculas de ADN en la muestra.

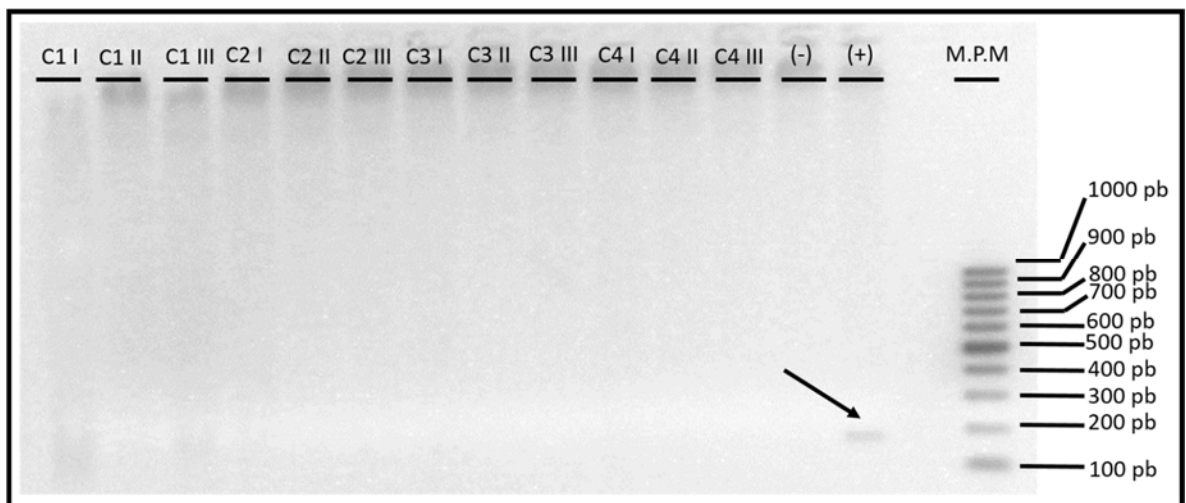


Figura N°11: Electroforesis en gel agarosa de un PCR para GAPDH de las muestras tratadas con DNAsa. Indicado con la flecha la amplificación de GAPDH del control (+).

A partir de las muestras de ARN libres de ADN se sintetizó su cDNA utilizando la metodología descrita en materiales y métodos. Para comprobar el cDNA se realizó un PCR convencional utilizando el cDNA como templado y un partidor de GAPDH. En la figura 12 se observa la amplificación de una banda de alrededor de 200 pb tanto en el control positivo como en todas las muestras de fruto. No se observa amplificación en el control negativo como era de esperarse.

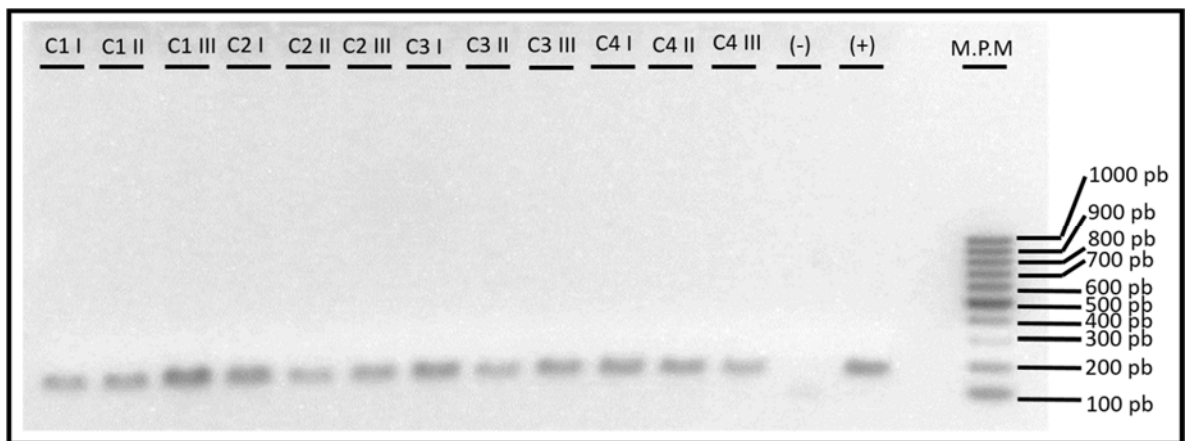


Figura N°12: Electroforesis en gel de agarosa de un PCR para GAPDH utilizando las muestras de cDNA. Se observan diferencias en la intensidad de las bandas, pero esto se corrigió ya que cuando se realizaron los análisis se ajustaron las concentraciones.

6.2 Análisis de expresión génica relativa del tipo MADS-box durante el desarrollo del fruto de *Fragaria chiloensis*.

Se realizó mediante RTqPCR, utilizando los partidores y eficiencias que se observan en la tabla N°4, todos ellos estandarizados.

Tabla N°4: Partidores utilizados y su eficiencia.

<i>Gen</i>	<i>Partidor Forward 5'→3'</i>	<i>Partidor Reverse 5'→3'</i>	<i>Eficiencia</i>
<i>Fc1185</i>	GCAATGCTAGAAGGCAATCTGGTGA	GGAATGATGGATCGACTTCATGCG	2,04
<i>MADS1</i>	TGAGCAAACAAAACGATCATCC	ACAGACCAGGTAAACTCCGTTC	1,90
<i>MADS2</i>	CAAGCAACTGTGTATGGTGAAAAG	TAATCTCAACTCACAACGAACC	1,86
<i>GAPDH</i>	TCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG	GACAGCCTTTCCAAGACGGACGA	1,92

Se trabajó con dos tipos de factores de transcripción de tipo MADS-box, SHATTERPROOF correspondientes al gen Fc1185 y SEPALLATA correspondientes a los genes MADS1 y MADS2.

El objetivo de este análisis es determinar el perfil de expresión de Fc1185 el cual es un factor de transcripción de tipo SHATTERPROOF principalmente, que como se ha observado en otros frutos, deberían acumularse sus transcritos a medida que avanzan los estados de maduración del fruto.

A modo de comparación también se determinó el perfil de expresión de dos factores de transcripción MADS-box de tipo SEPALLATA, llamados MADS 1 y MADS2, los cuales se ha visto que tienen perfiles de expresión similares a los de tipo SHATERPROOF.

En la figura 13A se pueden apreciar los niveles de expresión del gen MADS-box de tipo SHATTERPROOF, específicamente Fc1185, donde se evidencia que ocurre un aumento de la acumulación de los transcritos, con un máximo estadísticamente significativo de acumulación en el estadio C3, permaneciendo elevado en estadio C4. En este análisis se utilizó como control los niveles del estadio C1 asignando valor relativo igual a 1.

En contraste tenemos que en la figura 13B se aprecia los niveles de transcrito de Fc1185 en diferentes tejidos de *Fragaria chiloensis* como lo son hoja (L), estolón (RU), raíz (R) y

tallo (SH), donde los niveles de transcritos de este factor de transcripción son muy bajos, en comparación con el estadio C1.

Por otro lado, los niveles de MADS 1 y MADS2, figura 13C y 13D respectivamente, como era de esperarse para estos tipos de factores de transcripción, sus niveles de transcrito se encuentran significativamente elevados en los estadios C3 y C4 para MADS1 y en los estadios C2 y C3 para MADS2. Cabe destacar que al igual que con Fc1185 se produce un incremento de estos transcritos a medida que avanza la maduración del fruto, alcanzado su máximo nivel en estadio C3.

En la figura 14E y 14F se muestra la comparación de transcritos entre Fc1185 y MADS1, y Fc1185 y MADS2 respectivamente, donde se observa que no hay diferencia significativa en ninguno de los estadios, es decir, los niveles de transcritos aumentan de manera similar en cada uno de los diferentes estadios de maduración. Esto indica que ambos factores de transcripción MADS-box, los de tipo *SEPALLATA* y *SHATERPROOF* presentan perfiles transcripcionales similares.

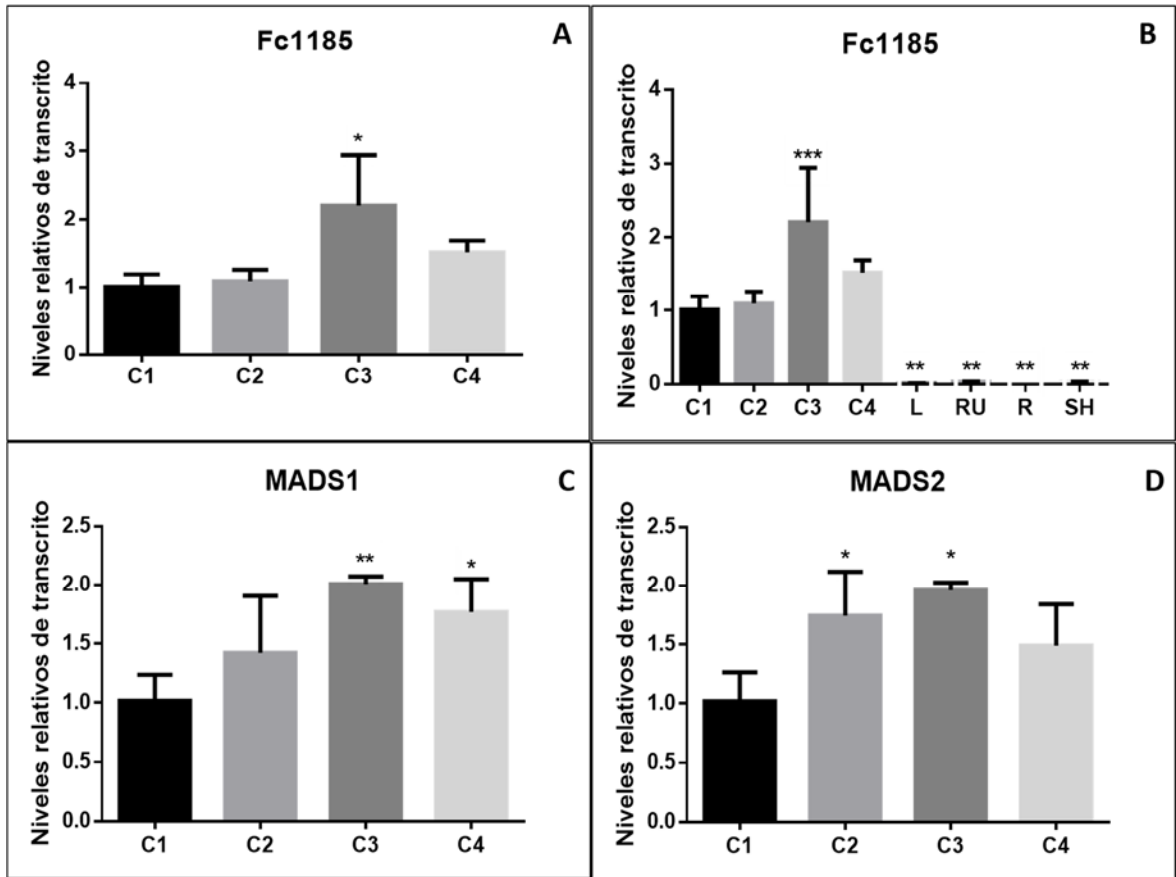


Figura N°13: Aquí se observan los diferentes niveles de transcritos de tres factores de transcripción. (A) Aquí se aprecian los niveles de transcritos de Fc1185 en distintos estadios de desarrollo y maduración de frutos de *F. chiloensis*. (B) Comparación de los niveles de transcritos de Fc1185 tanto en frutos como en diferentes tejidos, hoja (L), estolón (RU), raíz (R) y tallo (SH). (C) y (D) corresponde a los niveles de transcritos de los factores de transcripción MADS1 Y MADS2 respectivamente, en distintos estadios de desarrollo y maduración de frutos de *F. chiloensis*.

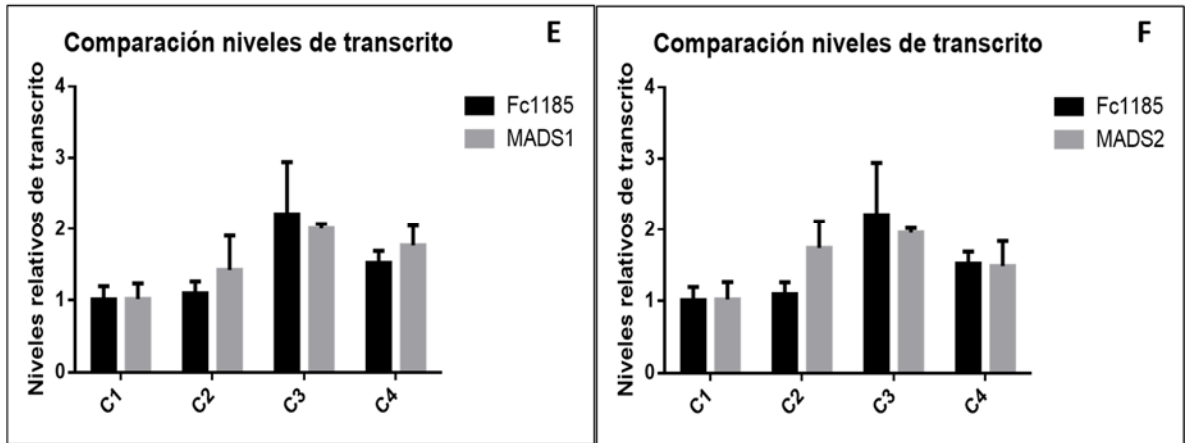


Figura N°14: Gráficos E y F muestran la comparación en los niveles de transcritos de Fc1185, MADS1 y MADS2, para cada uno de los estadios de desarrollo y maduración de frutos de *F. chiloensis*. En el grafico E se aprecia que no hay diferencia significativa en la expresión relativa de ambos genes, comparando cada uno de los estadios por separado entre si y que estos dos aumentan en la misma proporción, tanto Fc1185 y MADS1, lo mismo ocurre cuando comparamos en el grafico F Fc1185 y MADS2, no hay diferencia significativa en sus niveles de transcritos.

6.3 Árbol filogenético de Fc1185

En la confección del árbol filogenético se utilizaron las secuencias de genes de *Fragaria chiloensis*, *Fragaria x ananassa* y *Fragaria vesca*, ya que aún no están caracterizados todos los factores de transcripción de tipo MADS-box en *F.chiloensis*. En color verde se pueden apreciar los genes MADS1 y MADS2 de *F.chiloensis* los cuales pertenecen al grupo E o SEPALLATA (SEP) como era de esperarse por su homología con MADS1 de *F .x ananassa*. En color rojo se observa el gen Fc1185 de *F.chiloensis* junto al SHP de *F. x ananassa*, ambos en el grupo AG de factores de transcripción MADS-box, subgrupo SHATERPROOF.

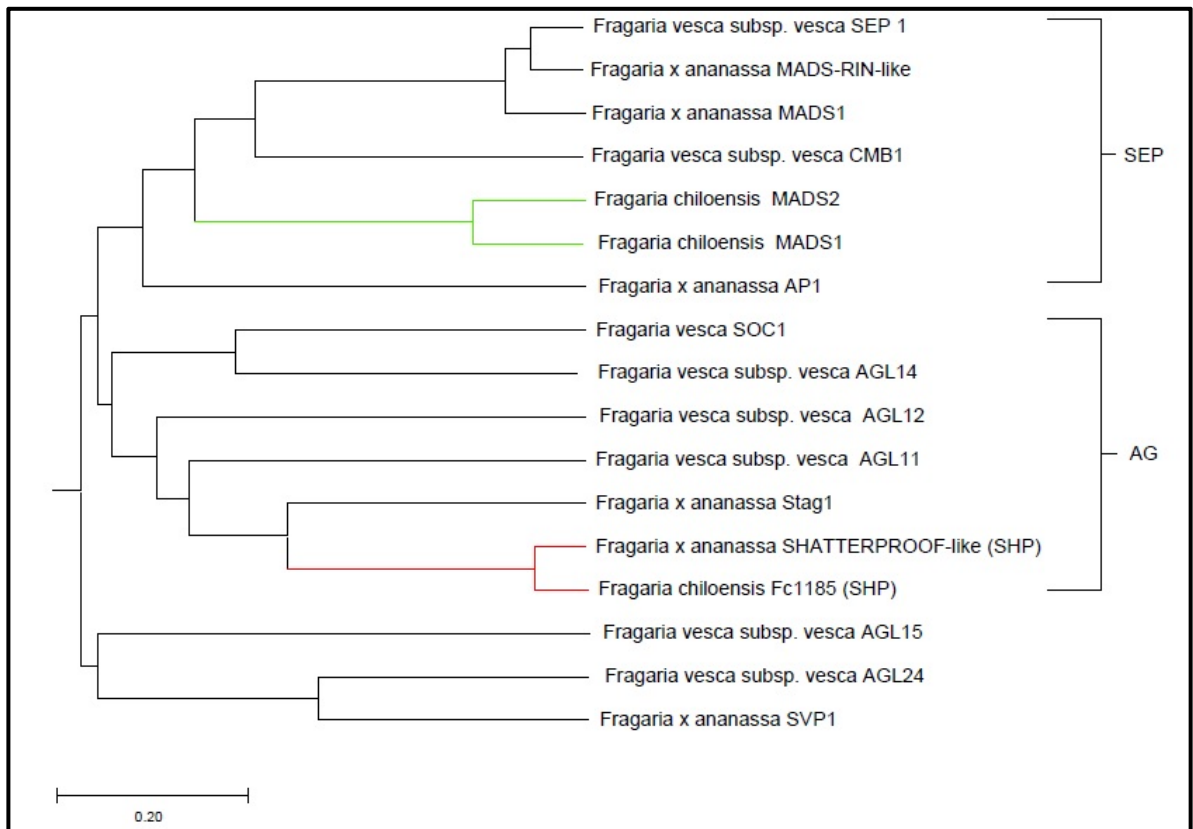


Figura N°15: Árbol filogenético de factores de transcripción de tipo MADS-box

7. DISCUSIÓN

Los factores de transcripción de tipo MADS-box pueden ser encontrados en todos los eucariotas estudiados hasta la fecha, incluyendo plantas, animales y hongos, pero hace tiempo es conocido el efecto de estos factores de transcripción en plantas donde se reconoce un patrón que se repite en cuanto a la estructura de estos factores de transcripción. Es así que presentan una estructura de tipo MIKC, el dominio M representa el dominio de unión al ADN, mientras que I es un intermediario y K es un dominio similar a la queratina y está involucrado en las interacciones proteína-proteína, al igual que el dominio C terminal en ciertas proteínas MADS-box (56). En cuanto a la funcionalidad que presentan en las plantas estos factores de transcripción es amplio, abarcando desde el desarrollo del saco embrionario, polen, raíces, flores y frutos. Volviendo con la estructura de estos factores de transcripción, cabe decir que el dominio M es común a todos, pero en plantas florales evolucionó para tener otro dominio importante, siendo el dominio K el que le permitiría a estas proteínas formar dímeros y tetrámeros con otros MADS-box llegando a formar heterotetrámeros que pueden unirse no solo a un sitio del DNA sino que a dos formando un loop en el DNA, necesario para el desarrollo de algunas flores (57). Básicamente cuando hablamos de la estructura de estos factores de transcripción, estos poseen una zona que se une al DNA (N-terminal) y otra que se une a otras proteínas (C-terminal), esta organización permite la formación de múltiples dímeros y tetrámeros con diferente especificidad de unión al DNA a partir de un número limitado de genes que codifican para esos factores de transcripción.

Los factores de transcripción de tipo MADS-box se expresan en una variedad de especies que incluyen tomate, plátano, manzana, uva y frutilla, es decir tanto en frutos climatéricos como no-climatéricos.

En el caso de la frutilla, específicamente en su proceso de maduración, el cual conlleva varios cambios en sabor, color y ablandamiento, estos factores de transcripción están involucrados en la expresión o silenciamiento de múltiples enzimas como lo son alcohol

aciltransferasas encargadas de producir compuestos que le darán el sabor característico, antocianidin sintasas y reductasas que participaran en la generación de compuestos que le entregarán color a la fruta y enzimas relacionadas con el ablandamiento de la pared celular como pectato liasas y poligalacturonidasas (27).

A pesar de que se sabe que la relación entre ácido abscísico/auxinas en frutillas, dos hormonas que determinan el paso o cambio del desarrollo del fruto, son de vital importancia para su maduración, se desconoce en gran medida la red metabólica en la que están involucradas. Algunos factores de transcripción, la mayoría pertenecientes a la familia MADS-box han sido identificados estructural y funcionalmente con el desarrollo de los frutos (58).

Hay múltiples estudios que hablan de la acción de estos factores de transcripción en el desarrollo floral de las plantas, y la frutilla no es la excepción.

El gen FaSOC1 se encuentra altamente expresado en los órganos reproductores, incluyendo ápices, capullos florales, flores, estambres y sépalos. Su sobreexpresión en *Arabidopsis* causa floración temprana y la sobreexpresión de genes de floración como LFY y AP1 (59). En cuanto al desarrollo del fruto a grandes rasgos hay múltiples estudios en *Fragaria x ananassa* que relacionan a estos factores de transcripción con uno o varios procesos de la maduración de la frutilla, como por ejemplo FaMYB1 el cual al ser sobreexpresado produce una dramática disminución en los niveles de antocianinas y flavonoides, encargados de darle la coloración a los frutos, no así con los niveles de fenilpropanoles y el metabolismo de la lignina, los cuales se mantuvieron iguales a los frutos control (60). Es decir, solo afectó la coloración pero no el desarrollo del aroma y el ablandamiento de la frutilla.

En contraste tenemos otro factor de transcripción como lo es FaGAMYB, el cual está involucrado en varios aspectos del desarrollo del receptáculo. De hecho, el silenciamiento parcial y total de este gen afectó en gran medida la expresión de otros 2624 genes, de los cuales 109 eran otros factores de transcripción. La expresión de genes responsables de cambios metabólicos como la acumulación de antocianinas y azúcares, producción de compuestos volátiles, y de enzimas de degradación de la pared se vieron afectadas por su silenciamiento mediante RNAi (49).

En el caso de *Fragaria chiloensis* dos factores de transcripción de tipo MADS-box han sido identificados FcMADS1 y FcMADS2, ambos muestran un incremento en la expresión de los transcritos durante etapas iniciales del desarrollo del fruto y durante el proceso de maduración del fruto propiamente tal, además de ser expresados en mayor medida en las flores de la planta. Este aumento de los niveles de transcrito evidencia el posible rol de estos factores de transcripción en el desarrollo, maduración y desarrollo del órgano floral de la frutilla chilena (51).

Así es como mediante la identificación de un nuevo putativo factor de transcripción de tipo MADS-box en *Fragaria chileonsis*, se generó la secuencia completa de éste mediante la técnica de RACE, donde los productos del PCR obtenidos fueron amplificados, clonados y secuenciados. Finalmente estas secuencias fueron alineadas para así obtener la secuencia completa del cDNA correspondiente a este nuevo factor de transcripción.

Este nuevo factor de transcripción de la familia MADS-box, llamado Fc1185, a diferencia de los anteriores que eran del tipo SEPALLATA (FcMADS1 y FcMADS2) es del tipo SHATERPROOF.

Como se mostró (figura 13 A), este factor de transcripción ve significativamente aumentada sus niveles de transcritos, con el avance del desarrollo y maduración, existiendo una mayor acumulación en el estadio C3. Esto concuerda con las investigaciones en tomate para TAGL1, un factor de transcripción MADS-box del tipo SHP el cual ve aumentados sus niveles de transcrito durante la maduración del tomate. El silenciamiento mediante RNAi de este gen se provoca la disminución en la biosíntesis de carotenoides y por consiguiente, reducción en la acumulación de carotenoides y el color rojo característico de los tomates (61, 62). Lo mismo ocurre con MaMADSS, el gen ortólogo encontrado en banana, el cual ve aumentado sus niveles de transcritos tanto en la flor como en el fruto durante la maduración (63). Otro ejemplo sería el gen PpPLE de duraznos el cual pertenece al subgrupo PLENA, y que comparte linaje con los de tipo SHATERPROOF, donde se produce el mismo incremento transcripcional tanto en flores como en el fruto. En este mismo estudio se realizó también un constructo para expresar constitutivamente el gen

PpPLE en tomates, dando como resultado un acelerado ablandamiento de los frutos, debido al aumento de expresión de beta-galactosidasa y expansinas (64).

En cuanto a frutos no climatéricos, tenemos las investigaciones llevadas a cabo en *Fragaria x ananassa* donde el gen nombrado FaSHP fue aislado y caracterizado, aumentando sus niveles de expresión durante la maduración del fruto. Además fue modificada su expresión, tanto inhibiéndola como sobreexpresándola para poder visualizar los cambios que presentaba la frutilla en esta etapa. Macroscópicamente no se observaron grandes diferencias con el grupo control, solo en la cantidad de días que demoró en adquirir la coloración rojiza característica de la frutilla. Este efecto fue más importante cuando se silenció el gen demorando un 50% más de tiempo en adquirir la coloración el fruto, pasando de 6 a 9 días en total, mientras que en el caso de la sobreexpresión del gen, se aceleró el proceso de coloración de 6 a 5 días. Teniendo en cuenta que el silenciamiento generó un cambio más importante, esto sugiere que FaSHP está involucrado en la síntesis de antocianinas. Para apoyar esta hipótesis también se cuantificó los niveles de FaCHS un gen que participa en forma directa en el proceso de síntesis de antocianinas, el cual disminuyó su expresión en conjunto con FaSHP. Otro aspecto importante de la maduración es el ablandamiento del fruto, donde en el caso de FaSHP, su supresión también significó la disminución de los niveles de transcritos de tres genes que codifican para enzimas encargadas de la degradación de la pared celular, como endogluconasa (FaEG1). Y por último tenemos FaQR, gen relacionado con la producción de compuestos aromáticos, específicamente furaneol, donde sus niveles de transcritos disminuyeron cuando se suprimió la expresión de FaSHP (54).

Toda esta evidencia parece indicar la directa relación de los factores de transcripción MADS-box de tipo SHATERPROOF con la maduración de frutos tanto climatéricos como no climatéricos, donde se evidencia su importante rol en diferentes aspectos de la maduración, y como los niveles de expresión de sus transcritos aumentan a medida que avanza el proceso de maduración, lo cual concuerda perfectamente con los resultados observados en la figura 13 A para el gen Fc1185, donde los niveles de transcritos aumentan en los frutos de *Fragaria chiloensis* a medida que avanzan los estadios de maduración.

Otro aspecto importante de este estudio fue observar el perfil de expresión de este factor de transcripción en diferentes tejidos de *F.chiloensis* además del receptáculo, como hoja (L), estolón (RU), raíz (R) y tallo (SH) (figura 13 B). Los niveles de transcritos de Fc1185 en los distintos tejidos son significativamente menores que los encontrados en fruto de estadio C1, lo cual concuerda con la funcionalidad que ha sido descrita a lo largo del tiempo de estos factores de transcripción de tipo SHP donde en *Arabidopsis* se encuentran especialmente incrementados en carpelos, esencial en el desarrollo floral y en genes relacionados con la lignificación del fruto (65). En sintonía con esto, estudios en *Fragaria x ananassa* muestran que los niveles de transcripción de FaSHP en hoja son prácticamente nulos comparados con los presentes en fruto (54). En conjunto podemos inferir que Fc1185 posee un comportamiento similar a otros factores de transcripción de tipo SHP en otras especies de frutilla, e incluso en *Arabidopsis*, donde siempre se ve asociado un incremento de sus niveles de transcrito al desarrollo frutal.

Siguiendo con estos patrones de expresión comunes en diferentes especies, también se quiso analizar la relación de coexpresión que existe entre los factores de transcripción de tipo SHATERPROOF y SEPALLATA. Para esto como se aprecia en la figura 13 C y D, se midieron los niveles de transcritos de MADS1 y MADS2 por separado, los cuales son dos factores de transcripción de tipo SEPALLATA que se encuentran en *Fragaria chiloensis*, donde se puede ver el aumento progresivo de los niveles de transcrito de estos factores de transcripción a lo largo de los cuatro estadios de maduración de la frutilla, alcanzando su más alto valor en C3. Esto último tiene total correlación con las mediciones realizadas a estos factores de transcripción en un estudio anterior, donde MADS1 muestra un incremento de los niveles de transcrito tanto en la etapa de desarrollo del fruto como en su maduración, mientras que MADS2 solo lo hace durante la maduración de la frutilla (51).

Una vez hecho esto se comparó la coexpresión de estos genes con Fc1185, ya que esta descrito en la literatura la participación en conjunto de los factores de transcripción de tipo SHP y SEP, formando heterodímeros o heterotetrámeros, como ocurre en el desarrollo floral de *Arabidopsis*, donde SHP1 y SHP2 están relacionados con el desarrollo del óvulo, en conjunto con otro gen llamado STK, pero necesitan de otro mediador para poder formar

el tetrámero, el cual resulta ser SEP3, el cual es capaz de interactuar con todos ellos en cualquier combinación posible, haciendo este complejo más estable que si no estuviera presente SEP3 (66). Por otro lado, el desarrollo de estambres en *Arabidopsis* es llevado a cabo por factores de transcripción de tipo AP1, PI, SEP y AG, tetrámeros formados por SEP y AG controlan el desarrollo del carpelo, y dentro de los factores de transcripción de tipo AG se encuentran subclasificados los de tipo SHP (67).

También se ha encontrado esta relación en mango (*Mangifera indica*) donde se identificaron los genes MiMADS1, MiMADS2 y MiMADS3 pertenecientes al subgrupo SEP, los cuales presentan el mismo patrón de aumento de sus niveles de transcritos al ir desarrollándose y madurando el fruto. En conjunto con esto también se estudiaron los genes MiAGLSHP y MiAGL15, pertenecientes al subgrupo AG, donde el primero presenta una mayor importancia en la etapa del desarrollo del fruto, mientras que el segundo se mantiene elevado tanto al inicio como al final del desarrollo y maduración de este, desde donde se puede inferir que estos factores de transcripción participan en conjunto durante la maduración del mango (68).

El hecho de que los factores de transcripción SEP y SHP trabajen en conjunto se debe principalmente a que los de tipo SEP se han definido como mediadores de interacción de todos los otros tipos de factores de transcripción de tipo MADS-box. Estos pueden estabilizar estructuras diméricas y afectar la ubicación subcelular de las moléculas a las cuales se unen. Específicamente SEP3 parece poseer un fuerte dominio de activación de la transcripción, participando así como un factor ternario, agregándole actividad transcripcional a complejos de factores de transcripción multiméricos o estabilizando la estructura (69).

Así es como en la figura se puede apreciar de que no existe diferencias significativas en los niveles relativos de transcritos entre Fc1185 y MADS1 o MADS2 (Figuras 14A y 14B), revelando el mismo patrón de expresión a lo largo de la maduración del fruto, lo cual concuerda con la bibliografía expuesta anteriormente, que señala que los factores de transcripción de tipo SEP participan formando complejos con otros tipos de MADS-box, por lo que tendrían sentido los resultados obtenidos en este trabajo.

En cuanto al árbol filogenético generado para el gen Fc1185 (figura 15), este gen pertenece al grupo de factores de transcripción de tipo MADS-box AGAMOUS (AG), dentro del subgrupo SHATERPROOF, y presentaría una secuencia muy similar al gen SHP de *Fragaria x ananassa*. Esto se explica porque *F. x ananassa* es una especie de frutilla comercial originada por la cruce *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana*. También se puede observar la proximidad filogenética de los factores de transcripción de tipo SEPALLATA (SEP), los cuales según la evidencia bibliográfica participarían directamente formando heterodímeros y tetrámeros con los factores de transcripción SHATERPROOF (SHP).

8. CONCLUSIÓN

En esta tesis se determinó el perfil de expresión del gen *Fc1185* de *Fragaria chiloensis* y que corresponde a un factor de transcripción de tipo MADS-box, del grupo AGAMOUS (AG), subgrupo SHATERPROOF. Se observó un incremento en los niveles de transcritos de *Fc1185* a medida que el fruto va madurando, de manera similar a lo que ocurre con su gen homólogo en *Fragaria x ananassa* (*FaSHP*).

Otro punto importante fue medir sus niveles de expresión en diferentes tejidos, donde como la mayoría de los MADS-box, este solo se expresó en fruto, obteniéndose niveles muy bajos en hoja, estolón, raíz y tallo. Aquí hay un punto a considerar para futuros estudios, que es que no se midieron los niveles de transcrito en flor, donde por ejemplo para el gen *FaSHP*, homólogo en *Fragaria x ananassa*, este presenta niveles de transcrito muy altos en flores, llegando incluso a ser mayores que en el fruto propiamente tal (54).

Se pudo corroborar que los genes *MADS1* y *MADS2* de *Fragaria chiloensis*, pertenecientes al grupo SEPALLATA de factores de transcripción MADS-box, presentan un perfil de expresión similar a *Fc1185*, es decir, a medida que avanzan los estadios de maduración del fruto se van acumulando los transcritos (51). Esto coincide con lo descrito en la literatura (66), (67), (68), (69), donde se señala perfiles de transcripción similares entre los factores de transcripción de tipo SEP y otros MADS-box, incluyendo los de tipo SHP.

Para finalizar cabe decir que el gen *Fc1185* resulta ser un factor de transcripción que por su comportamiento a nivel de transcritos en el fruto de *Fragaria chiloensis*, podría presentar un importante papel en la maduración de este fruto. Como se ha observado para el gen SHP de *Fragaria x ananassa*, su expresión está involucrada con la coloración del fruto, promueve la transcripción de enzimas que remodelan la pared celular, y en la producción de furaneol, importante metabolito en la generación del aroma del fruto (54). Por otro lado, los niveles de transcrito se ven influenciados por los niveles hormonales de auxina y ácido abscísico (54). Por lo anteriormente mencionado, creo que es importante efectuar más estudios para dilucidar el rol exacto que desempeñaría *Fc1185* en la maduración del fruto,

en cuanto a la relación con las hormonas encargadas del proceso de maduración, capacidad de unión a DNA y a otros MADS-box, y medir la expresión relativa de genes responsables de la acumulación de antocianinas, remodelación de la pared celular y acumulación de azúcares, en modelos que presenten una sobreexpresión o inhibición de *Fc1185*.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Osorio S, Scossa F, Fernie A. Molecular regulation of fruit ripening. *Frontiers in plant science*. 2013;4:198.
2. Bouzayen M, Latché A, Nath P, Pech J. Mechanism of Fruit Ripening Springer. 2010; *Biotechnological Perspectives* vol. 1. Chapter 16 , Berlin, Heidelberg, 2010. 319-339.
3. Giovannoni J., Genetic regulation of fruit development and ripening. *The plant cell*, 2004; 16, p. S170-S180.
4. Giovannoni J. Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. 2001;52:725-749.
5. Civello P, Powell A, Sabehat A, Bennett A. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology*. 1999;121(4):1273-1280.
6. Prusky D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual review of phytopathology*. 1996;34:413-434.
7. Cantu D, Vicente A, Labavitch J, Bennett A, Powell A. Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends in plant science*. 2008;13(11):610-617.
8. Rosin F, Hannapel D. RNA Localization of a Strawberry MADS-Box Gene (SAG1) Involved in Fruit Development. *Hort Science*, 1999;34(3):457.
9. Becerra V, Paredes C, Romero O, Lavín A. Diversidad Bioquímica y Molecular en Frutillas Chilenas (*Fragaria chiloensis* L. Duch.) y su Implicancia en el Mejoramiento Genético de la Especie, *The Journal Agricultura Técnica*. 2001;61:413-428.
10. Carrasco B, Garcés M, Rojas P, Saud G, Herrera R, Retamales J, et al. The Chilean Strawberry [*Fragaria chiloensis* (L.) Duch. Genetic Diversity and Structure. 2007;132(4):501-506.
11. Finn C, Retamales J, Lobos G, Hancock J, The Chilean Strawberry (*Fragaria chiloensis*): Over 1000 Years of Domestication. *Hort Science*, 2013;48(4):418-421.
12. Beattie J, Crozier A, Duthie G. Potential Health Benefits of Berries, *Current Nutrition and Food Science*, 2005. 71-86 p.
13. Ojeda L, Cárdenas R, Lobit P, Grageda O, Valencia E, Macías L. Efecto de la nutrición níttrica y sistemas de riego en el sabor de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) *Revista Chapingo. Serie horticultura*. 2008;14:61-70.
14. Zhang J, Wang X, Yu O, Tang J, Gu X, Wan X, et al. Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) during fruit development and maturation. *Journal of Experimental Botany*. 2011;62(3):1103-1118.
15. Carbone F, Preuss A, de Vos R, D'amico E, Perrota G, Bovy A, et al. Developmental, genetic and environmental factors affect the expression of flavonoid genes, enzymes and metabolites in strawberry fruits, *Plant, Cell & Environment*, 2009;32(8):1117-1131.

16. Cheel J, Theoduloz C, Rodriguez J, Saud G, Caligari P, Schmeda G. E-cinnamic acid derivatives and phenolics from Chilean strawberry fruits, *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(22):8512-8518.
17. Herrera R, Salvatierra A, Pimentel P, Moya-León M. Biosynthesis of flavonoids in achenes of *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2014. 406-414 p.
18. Paniagua C, Pose S, Morris V, Kirby A, Quesada M, Mercado J, Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Annals of botany*. 2014;114(6):1375-1383.
19. Brummell D, Harpster M. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant molecular biology*. 2001;47(1-2):311-340.
20. Koh T, Melton L, Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biology and Technology*, 2002;26(1):23-33.
21. Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, et al. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, New York,. 2004;306(5705):2206-2211.
22. Fry S, Plant cell walls. From chemistry to biology. *Annals of botany*. 2011;108(1):viii-ix.
23. Brummell D, Cell wall disassembly in ripening fruit, *Journal Functional Plant Biology*. 2006;33(2):103-119.
24. Biermann C, McGinnis G.D., *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*: Taylor & Francis, CRC press; Cleveland, 1988, pp. 157–216
25. Lerouxel O, Cavalier D, Liepman A, Keegstra K. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. *Current opinion in plant biology*. 2006;9(6):621-630.
26. Sainz M. Mecanismos moleculares de degradación de la pared celular vegetal: estructura y especificidad: Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
27. Rosli H, Degradación de pared celular en frutillas. Análisis de sus componentes, evolución de la actividad enzimática y expresión de genes asociados: Tesis Doctoral. Universidad Nacional de General San Martín, IBB-INTECH (Chascomús), Buenos Aires 2007, 120p; 2007.
28. Levy S, York W, Stuike R, Meyer B, Staehelin L, Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosylated sidechain in surface-specific sidechain folding. *The Plant Journal*, 1991;1(2):195-215.
29. Buchanan B, Gruissem W, Jones R. *Biochemistry & molecular biology of plants*: American Society of Plant Physiologists Rockville, MD; 2000. p. 1158-1202.
30. Yapo B, Lerouge P, Thibault J, Ralet M., Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*, 2007;69(3):426-435.
31. Togores J, *Tratado de enología*: Mundi-Prensa Libros; 2010.
32. Posé S, García J, Santiago N, Pliego F, Quesada M, Mercado J., et al. Strawberry fruit softening: role of cell wall disassembly and its manipulation in transgenic plants. *Genomes and Genomics*, 2011;5(1):40-8.

33. Villarreal N, Rosli H, Martínez G, Civello P., Polygalacturonase activity and expression of related genes during ripening of strawberry cultivars with contrasting fruit firmness. *Postharvest Biology and Technology*, 2008;47(2):141-150.
34. Sozzi G, Civello P, Fruit cell wall enzymes as targets for biotechnology. *Genetic Resources and Biotechnology*, 2005;1:214-249.
35. Cosgrove D, Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*. 2000;407(6802):321-326.
36. Wilkins M, et al. The physiology of plant growth and development. *The physiology of plant growth and development.*, 1969.
37. Given N, Venis M, Gierson D, Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta*. 1988;174(3):402-406.
38. Leshem, Y, Halevy A, Frenkel C. Fruit ripening. *Process and Control of Plant Senescence*. Leshem, YY (1986): 162-199
39. Jiang Y, Joyce D, ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regulation*, 2003;39(2):171-4.
40. Serrano J., Control transcripcional de la diferenciación celular. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 2009.
41. Tiessen A., *Fundamentos de mejoramiento genético vegetal: conceptos básicos de genética, biología molecular, bioquímica y fisiología vegetal*. Edit. Académica Española,, 2012.
42. Liu L, White M, MacRae T, Transcription factors and their genes in higher plants: functional domains, evolution and regulation. *European Journal of Biochemistry* 1999;262(2):247-257.
43. Manning K, Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta*. 1998;205(4):622-631.
44. Smaczniak C, Immink R, Angenent G, Kaufmann K. Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development (Cambridge, England)*. 2012;139(17):3081-3098.
45. Shore P, Sharrocks A, The MADS-box family of transcription factors. *European journal of biochemistry*. 1995;229(1):1-13.
46. Sehra B, Franks R, Redundant CARG Box Cis-motif Activity Mediates SHATTERPROOF2 Transcriptional Regulation during Arabidopsis thaliana Gynoecium Development. *Frontiers in plant science*. 2017;8:1712-.
47. Taylor M, Treisman R, Garrett N, Mohun T. Muscle-specific (CARG) and serum-responsive (SRE) promoter elements are functionally interchangeable in Xenopus embryos and mouse fibroblasts. *Development (Cambridge, England)*. 1989;106(1):67-78.
48. Salvatierra A, Pimentel P, Moya-Leon MA, Herrera R. Increased accumulation of anthocyanins in *Fragaria chiloensis* fruits by transient suppression of FcMYB1 gene. *Phytochemistry*. 2013;90:25-36.
49. Vallarino J, Osorio S, Bombarely A, Casanal A, Cruz-Rus E, Sanchez-Sevilla J, et al. Central role of FaGAMYB in the transition of the strawberry receptacle from development to ripening. *The New phytologist*. 2015;208(2):482-496.
50. Seymour G, Ryder C, Cevik V, Hammond J, Popovich A, King G, et al. A SEPALLATA gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria x*

- ananassa Duch.) fruit, a non-climacteric tissue. *Journal of Experimental Botany*. 2011;62(3):1179-1188.
51. Pimentel P, Salvatierra A, Moya-Leon MA, Herrera R. Isolation of genes differentially expressed during development and ripening of *Fragaria chiloensis* fruit by suppression subtractive hybridization. *Journal of plant physiology*. 2010;167(14):1179-1187.
52. Choudhury S, Roy S, Nag A, Singh S, Sengupta D. Characterization of an AGAMOUS-like MADS Box Protein, a Probable Constituent of Flowering and Fruit Ripening Regulatory System in Banana, *PLoS One*, 2012. e44361 p.
53. Ehlers K, Bhide A, Tekleyohans D, Wittkop B, Snowdon R, Becker A. The MADS Box Genes *ABS*, *SHP1*, and *SHP2* Are Essential for the Coordination of Cell Divisions in Ovule and Seed Coat Development and for Endosperm Formation in *Arabidopsis thaliana*. *PloS One*. 2016;11(10):e0165075-e.
54. Daminato M, Guzzo F, Casadoro G. A SHATTERPROOF-like gene controls ripening in non-climacteric strawberries, and auxin and abscisic acid antagonistically affect its expression. *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(12):3775-3786.
55. Chang S, Puryear J, Cairney J. A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees, *Plant molecular biology reporter*, 1993. 113-116.
56. Saedler H, Becker A, Winter KU, Kirchner C, Theissen G. MADS-box genes are involved in floral development and evolution. *Acta biochimica Polonica*. 2001;48(2):351-358.
57. Theiben G, Gramzow L. Structure and evolution of plant MADS domain transcription factors. *Plant Transcription Factors: Elsevier*; 2016. p. 127-38.
58. Molina F. Functional characterization of strawberry (*Fragaria x ananassa*) transcription factors and transcriptional regulator during the fruit ripening, and genes with biotechnological interest. 2017.
59. Lei H, Yuan H, Liu Y, Guo X, Liao X, Liu L, et al. Identification and characterization of FaSOC1, a homolog of Suppressor of Overexpression of Constans from strawberry. *Gene*. 2013;531(2):158-167.
60. Aharoni A, De Vos C, Wein M, Sun Z, Greco R, Kroon A, et al. The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *The Plant Journal*. 2001;28(3):319-332.
61. Pan I, McQuinn R, Giovannoni J, Irish V. Functional diversification of AGAMOUS lineage genes in regulating tomato flower and fruit development. *Journal of experimental botany*. 2010;61(6):1795-1806.
62. Pesaresi P, Mizzotti C, Colombo M, Masiero S. Genetic regulation and structural changes during tomato fruit development and ripening. *Frontiers in plant science*. 2014;5:124.
63. Liu J, Zhang J, Zhang J, Miao H, Wang J, Gao P, et al. Genome-wide analysis of banana MADS-box family closely related to fruit development and ripening. *Scientific reports*. 2017;7(1):3467.
64. Tadiello A, Pavanello A, Zanin D, Caporali E, Colombo L, Rotino G, et al. A PLENA-like gene of peach is involved in carpel formation and subsequent transformation into a fleshy fruit. *Journal of experimental botany*. 2009;60(2):651-661.

65. Liljegren S, Ditta G, Eshed Y, Savidge B, Bowman J, Yanofsky M. SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature*. 2000;404(6779):766-770.
66. Favaro R, Pinyopich A, Battaglia R, Kooiker M, Borghi L, Ditta G, et al. MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in Arabidopsis. *The Plant cell*. 2003;15(11):2603-2611.
67. Tani E, Polidoros A, Flemetakis E, Stedel C, Kalloniati C, Demetriou K, et al. Characterization and expression analysis of AGAMOUS-like, SEEDSTICK-like, and SEPALLATA-like MADS-box genes in peach (*Prunus persica*) fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009;47(8):690-700.
68. Pacheco M, Contreras C, Hernández O, Plascencia Y, Martina G, Martínez M, et al. Molecular modeling and expression analysis of a MADS-box cDNA from mango (*Mangifera indica* L.). *3 Biotech*, 2004, 4(4), 357-365.
69. Immink R, Tonaco I, de Folter S, Shchennikova A, van Dijk A, Busscher-Lange J, et al. SEPALLATA3: the 'glue' for MADS box transcription factor complex formation. *Genome biology*. 2009;10(2):R24-R.