
**CARACTERIZACIÓN DE UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA
NAC Y SU ROL EN EL PROCESO DE ABLANDAMIENTO EN FRUTOS DE
Fragaria chiloensis L. (Duch.)**

**CRISTIAN RICARDO CARRASCO ORELLANA
DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL**

RESUMEN

Fragaria chiloensis es una rosácea endémica de Chile, la cual genera un fruto con particulares características como atractivo sabor, agradable aroma, alta tasa fotosintética, resistencia a enfermedades, el cual ha sido propuesto como recurso agronómico de exportación dado el interés económico que este genera. Sin embargo, este fruto presenta un periodo de post-cosecha muy limitado y su ablandamiento es muy rápido. Este hecho, ha generado un desplazamiento del fruto de *F. chiloensis* por otros cultivares como Frutilla comercial (*F. x ananassa*) provenientes de Norte América, el cual presenta un ablandamiento menos acelerado. Como el mercado nacional e internacional ha aumentado la demanda de frutos más llamativos y exóticos, *F. chiloensis* se ha convertido en una nueva alternativa de exportación para nuestro país y ha emergido como una especie de estudio de eventos asociados a la maduración y ablandamiento de frutos. La madurez de un fruto se circunscribe en la sinergia de procesos tanto fisiológicos como bioquímicos dados en etapas de su desarrollo. La maduración de los frutos de especies de *Fragaria*, los cuales son clasificados como frutos no climatéricos, son regulados por la participación de diversos factores moleculares, entre ellos factores de transcripción, los cuales son familias de proteínas que coordinan y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes, y en muchos casos, regulan su propia expresión. Los factores de transcripción de la familia NAC (NAM, ATAF1,2 y CUC2) son específicos de plantas y realizan distintas funciones promoviendo la regulación transcriptional de diversos tipos de genes, entre ellos, algunos descritos que presentan relación directa con modificaciones fisiológicas y cambios en la pared celular que ocurren durante la maduración de los frutos, tales como Poligalacturonasas, Pectatoliasas, Endoglucanasas, Expansinas, Xiloglucano Endotransglicosilasas/hidrolasas, entre otros, los cuales presentan en sus zonas promotoras elementos en *cis* que son reconocidos por factores de transcripción de la familia NAC. El rol de los factores de transcripción de la familia NAC en el proceso de maduración y ablandamiento en frutilla chilena, es a la

fecha, desconocido y surge la necesidad de realizar estudios para poder entender este proceso. Por esta razón, el objetivo de esta tesis doctoral fue identificar, clonar y caracterizar un factor de transcripción de la familia NAC (*FcNAC1*) de *F. chiloensis*, el cual presentó un cDNA compuesto por 999 bp que codifica una proteína de 332 aminoácidos y que presenta en su zona amino terminal el dominio conservado de la familia NAC. Se realizaron análisis filogenéticos con miembros de esta familia con función conocida y fue posible apreciar que *FcNAC1* presenta cercanía evolutiva con SND2 (SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN 2), el cual está involucrado en la remodelación de la pared celular. Mediante transformación transiente de hojas de tabaco por agroinfiltración, fue posible determinar la localización sub-celular de nuestro factor de transcripción evidenciado que este se encuentra en el núcleo. También se determinó la variación en la expresión de *FcNAC1* durante el desarrollo y maduración del fruto, donde fue posible determinar que los niveles de transcritos aumentan concomitante al proceso de maduración y desarrollo del fruto, además fue posible apreciar que el perfil transcripcional en tejidos vegetativos presentó una mayor acumulación de estos en flores, paso previo a la formación del fruto, no así en otros tejidos como raíces, estolones, hojas y tallos. Mediante la técnica Genome-walker, fue posible obtener un fragmento de 1488 pb concerniente al promotor del gen *FcNAC1* y mediante análisis *in-silico* se pudo evidenciar putativos elementos en *cis* de respuesta a señales hormonales, como también sitios de reconocimiento para factores de transcripción de la familia NAC denominados SNBEs (Secondary wall NAC binding elements). Con el objetivo de entender sobre la regulación transcripción a nivel hormonal de *FcNAC1*, se realizaron ensayos de tratamientos hormonales en frutos, donde se pudo apreciar que existe un efecto de regulación positiva por ácido abscísico y una regulación negativa por parte de auxinas (IAA) en el experimento realizado. Para poder indagar sobre la conformación estructural del factor de transcripción *FcNAC1* y haciendo uso de herramientas bioinformáticas, fue posible obtener la estructura tridimensional de la proteína, su conformación como homodímero, su interacción en el reconocimiento del DNA y se describe aquellos residuos importantes que permiten la estabilización de esta interacción. Como se desconocía la función que podría estar realizando este factor de transcripción, se realizó una transactivación transcripcional mediante un ensayo de luciferasa dual, donde fue posible apreciar que *FcNAC1* presenta actividad

transcripcional contra la secuencia promotora de un gen relacionado a la remodelación de la pared celular, lo que permite inferir que *FcNAC1* estaría involucrado en el proceso de remodelación de pared celular, evento concomitante con el ablandamiento de los frutos de *F. chiloensis*. Además, fue posible identificar otro miembro de esta familia, denominando *FcNAC2*, compuesto de un cDNA de 1038 bp que codifica una proteína de 346 aminoácidos y que también presenta el dominio conservado de la familia NAC en su zona amino terminal. Al realizar análisis filogenéticos fue posible apreciar que *FcNAC2* presenta cercanía evolutiva con *AtNAC2* (NAC-REGULATED SEED MOPHOLOGY 1, NARS1), del cual se describe que podría estar involucrado en la incorporación de estímulos medioambientales y endógenos en el proceso de desarrollo de raíces laterales. Se evaluó la expresión relativa de *FcNAC2* en fruto y en tejidos vegetativos, donde fue posible apreciar que los niveles de transcritos aumentan conforme avanza el proceso de desarrollo y maduración del fruto y presentó un alto nivel de transcritos en raíces, tallos y estolones. Finalmente, ensayos de luciferasa dual nos sugieren que *FcNAC1* y *FcNAC2* podrían estar interactuando conjuntamente promoviendo la expresión de genes relacionados a la remodelación de la pared celular.